



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

RENATA RODRIGUES BRASIL

UTILIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS GLUTAMATO, GLICINA E CISTEÍNA PARA
ATENUAR OS EFEITOS TÓXICOS DE CÁDMIO NO CULTIVO *IN VITRO* DE
BRASSICA RAPA L.

JOÃO PESSOA

2020

RENATA RODRIGUES BRASIL

UTILIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS GLUTAMATO, GLICINA E CISTEÍNA PARA
ATENUAR OS EFEITOS TÓXICOS DE CÁDMIO NO CULTIVO *IN VITRO* DE
BRASSICA RAPA L.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva

JOÃO PESSOA

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B823u Brasil, Renata Rodrigues.

Utilização dos aminoácidos glutamato, glicina e cisteína para atenuar os efeitos tóxicos de cádmio no cultivo in vitro de Brassica rapa L / Renata Rodrigues Brasil. - João Pessoa, 2020.

43 f. : il.

Orientação: Luciano Coutinho Silva.

TCC (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Biotecnologia. 2. Fitorremediação. 3. Hiperacumulação. 4. Metais pesados. I. Silva, Luciano Coutinho. II. Título.

UFPB/BC

CDU 60



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 seis dias do mês de novembro de 2020, às 10:00h, em sessão pública realizada de forma remota, na Plataforma Google Meet, em atendimento à Portaria N°232/GR/REITORIA/UFPB, de 16 de outubro de 2020 e a Resolução Consepe N° 19/2020, na presença da Banca Examinadora presidida pelo(a) Professor(a) Dr(a). Luciano Coutinho Silva (DBCM/CBIOTEC/UFPB) e composta pelo(a)s avaliadore(a)s: 1. Prof(a). Dr(a). Andréa Farias de Almeida (DB/CBIOTEC/UFPB); 2. Prof(a). Dr(a). Adna Cristina Barbosa de Sousa (DBCM/CBIOTEC/UFPB), o(a) discente Renata Rodrigues Brasil, matrícula 2016025720, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Utilização dos aminoácidos glutamato, glicina e cisteína para atenuar os efeitos tóxicos de cádmio no cultivo in vitro de *Brassica rapa* L.”**, 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(ao) discente e demais presentes e eu, Luciano Coutinho Silva, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelo(a)s demais avaliadore(a)s e pelo(a) discente.

Presidente da Banca Examinadora

Avaliador(a) 1

Discente

Avaliador(a) 2

João Pessoa/PB, 26 de novembro de 2020.

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai,
os grandes inspiradores ao meu sonhar alto e
trabalhar para a realização desses sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Rossana e Romilson pelo apoio e suporte no meu caminho acadêmico e ao meu irmão Arthur por ser a luz que aliviava momentos de maiores dificuldades. Em conjunto com eles, sou extremamente grata aos meus avós Maria José e Mariano, à minha madrinha Mirtes, meu padrinho Alexandre, minha tia Maria das Neves e à minha prima Natália que juntos formam tudo aquilo que podemos chamar de família para mim.

Agradeço também à Ele ou Ela, aquela energia poderosa que pode ser Deus para mim, mas que pode ter um nome diferenciado para outra pessoa de fé diferente. Agradeço à essa energia constante na minha vida por ter me dado tantos privilégios, força, sabedoria, empatia e esperança em seguir em frente.

Além dessa família, também sou grata à família que a vida me deu: Maria Eduarda, a melhor amiga e irmã que eu poderia sonhar em ter; Lucas que está sempre fazendo parte da minha vida desde o ensino fundamental; Matheus, meu fiel escudeiro em tantos momentos e Felipe, que se manteve sempre ao meu lado.

Também sou eternamente grata à família que conheci devido exatamente à esse curso que termina ao apresentar esse trabalho, sendo eles os melhores companheiros, no que tange ao âmbito universitário e todo o amadurecimento que acontece em meio à trabalhos, avaliações e projetos. Foram em muitos momentos de debates pós aulas ou entre aulas que eu pude repensar, crescer, compreender e, não à visão de Darwin, mas sim à visão de mundo, evoluir como um ser humano. Mariana e Junior, essa é para vocês.

Ainda sobre a família que conheci durante o curso e que tive a oportunidade de viver uma das experiências mais inesquecíveis e renovadoras da minha vida, Hyago e Izannery vocês também foram cruciais para a jornada até aqui e eu sou muito grata por todos os momentos compartilhados.

Me sinto muito sortuda por ter conhecido pessoas tão incríveis em meio à tanta competitividade no mundo acadêmico. Julyana uma das almas mais puras que já conheci na vida e João Gabriel que me ajudou tanto em momentos complicados

com um carisma radiante. Sou grata também a Dedé por tanta gentileza em meio à reagentes químicos. Muito obrigada.

Além dos companheiros de jornada, também sou muito grata a todos os professores que me ensinaram não só acerca de biotecnologia mas também acerca de vida em especial: Maria de Fátima Agra por todos os ensinamentos e bons momentos compartilhados; Sildivane Valcácia por estar sempre presente e ser não só professora mas uma pessoa incrível; Andrea por sua gentileza e simpatia gigante e Adna por toda a confiança depositada em minha pessoa. Me orgulho em tê-las como exemplo de vida.

Admiro e agradeço imensamente ao professor Luciano Silva pelo acolhimento e pela orientação mesmo em tempos tão delicados, por todos os seus ensinamentos que me permitiram chegar aqui e pela compreensão e empatia como professor e como pessoa.

Além disso, também sou grata aos laboratórios dos quais pude contribuir e aprender e a todo o Centro de Biotecnologia por ter sido o local no qual esse trabalho pôde ser realizado. Pessoas, professores, colegas: um imenso obrigada.

"Assim, lembre-se sempre de olhar para as estrelas, não para os próprios pés. Tente compreender o que vê e questione o que faz o universo existir. Seja curioso. E por mais que a vida pareça difícil, sempre há algo que você pode e consegue fazer. Nunca desista. Molde o futuro."

Stephen Hawking

RESUMO

O cádmio é um elemento considerado como metal pesado e utilizado em baterias de níquel-cádmio e em pigmentos. Seu descarte inadequado pode contaminar plantações e, conseqüentemente, alimentos. Dessa forma, as formas de descontaminação desses poluentes são atrativas, sendo a fitorremediação uma técnica de bom custo-benefício que tem como aliada a utilização de plantas naturalmente hiperacumuladoras para a remoção desses contaminantes nos solos. Dentro desse processo, o gênero *Brassica* L. apresentam características fitorremediadoras, sendo a *Brassica rapa* L, uma planta herbácea com bom crescimento em biomassa e especial tolerância ao cádmio. Assim, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a atenuação de efeitos tóxicos do cádmio pela suplementação exógena de glutamato, glicina e cisteína na espécie *Brassica rapa* L. cultivada *in vitro*. O experimento foi realizado a partir de um modelo fatorial das concentrações de 0, 50, 100 e 200 ppm de cádmio e dos três aminoácidos em conjunto, totalizando 16 tratamentos. No cultivo, foi utilizado meio base MS com pH ajustado 5,8. Em câmara de fluxo laminar as sementes foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio 1,25 % de cloro ativo antes da inoculação em meio previamente autoclavado. Após 45 dias os parâmetros de altura da plântula, comprimento da raiz, número de folhas, peso fresco da planta e diferenciação entre planta normal e anormal foram avaliados. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância no software SISVAR®, dos quais os tratamentos com diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foram submetidos ao teste de média de Tukey. Foram observadas diferenças significativas para número de folhas, comprimento de raiz e formação de plantas normais, demonstrando possível atenuação dos efeitos tóxicos do cádmio mediante suplementação com aminoácidos. A melhor concentração para a atenuação dos efeitos foi observada em 100 ppm de aminoácidos. Esse resultado fornece uma base para estudos acerca da concentração referida para um melhor refino da técnica de fitorremediação através da suplementação de aminoácidos.

Palavras-chave: Fitorremediação, hiperacumulação, metais pesados.

ABSTRACT

Cadmium is an element considered as heavy metal and used in nickel-cadmium batteries and in pigments. Improper disposal can contaminate crops and, consequently, food. Thus, the forms of decontamination of these pollutants are attractive, and phytoremediation is a cost-effective technique that has the use of naturally hyperaccumulating plants to remove these contaminants in the soil. Within this process, the genus *Brassica* L. has phytoremediation characteristics, being *Brassica rapa* L, a herbaceous plant with good growth in biomass and special tolerance to cadmium. Thus, the objective of this work was to evaluate the attenuation of toxic effects of cadmium by the exogenous supplementation of glutamate, glycine and cysteine in the species *Brassica rapa* L. grown in vitro. The experiment was carried out from a factorial model of concentrations of 0, 50, 100 and 200 ppm of cadmium and of the three amino acids together, totaling 16 treatments. In the culture, MS base medium with adjusted pH 5.8 was used. In a laminar flow chamber the seeds were disinfected with a 1.25% sodium hypochlorite solution of active chlorine before inoculation in a previously autoclaved medium. After 45 days, the parameters of seedling height, root length, number of leaves, fresh weight of the plant and differentiation between normal and abnormal plants were evaluated. The collected data were subjected to analysis of variance in the SISVAR® software, of which the treatments with significant differences ($p \leq 0.05$) were subjected to the Tukey average test. Significant differences were observed for number of leaves, length of root and formation of normal plants, demonstrating possible attenuation of the toxic effects of cadmium by supplementation with amino acids. The best concentration for attenuating the effects was observed in 100 ppm of amino acids. This result provides a basis for studies on the referred concentration for a better refinement of the phytoremediation technique through amino acid supplementation.

Key words: Phytoremediation, Hyperaccumulation, Heavy metals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Brassica rapa L subsp. oleifera	18
Figura 3 – Fórmula molecular da Cisteína.	23
Figura 4 – Fórmula molecular da Glicina.	24
Figura 5 - Desenho fatorial realizado para a combinação das concentrações de aminoácidos e Cd, com 10 tubos para cada tratamento.	27
Figura 6 - Plântulas com 10 dias de germinação em estante de fotoperíodo dispostas de forma aleatória em relação aos tratamentos, todos contendo meio MS e duas sementes.	29
Figura 7 - Interação de aminoácido dentro de cada nível de cádmio para a variação do número de folhas	31
Figura 7 - Alguns sintomas do Cd na B. rapa: clorose e dobramento ou enrolamento das folhas.	32
Figura 8 - Interação de aminoácido dentro de cada nível de Cd para a variação do comprimento de raiz.	33
Figura 9 - Interação de aminoácido dentro de cada nível de Cd para a variação da porcentagem de plântulas normais.	35
Figura 10 - Variação da altura em relação às concentrações de cádmio.	36
Figura 11 - Variação do peso fresco em relação às concentrações de cádmio.	37
Figura 12 - Variação do peso fresco em relação às concentrações de aminoácidos.	37

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
As	Arsênio
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> - Adenosina Trifosfato
Cd	Cádmio
Cd²⁺	Íon Cádmio
Cu	Cobre
EDDS	<i>Ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid</i> - Ácido etileno diamino di-succínico
GABA	<i>Gamma-Aminobutyric acid</i> - Ácido Gama-Aminobutírico
GOGAT	<i>Glutamine oxoglutarate aminotransferase</i> - Glutamato sintetase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa
HCl	Ácido Clorídrico
Hg	Mercúrio
MS	Meio Murashige e Skoog
N	Nitrogênio
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i> - Ácido Nitriloacético
OASTL	<i>O-acetylserine(thiol)lyase</i> - O-acetilserina(tiol)liase
PCs	Fitoquelatinas
Pb	Chumbo
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 FITORREMEDIAÇÃO	15
2.1.1 O gênero Brassica e a Brassica rapa.	16
2.2 CÁDMIO	18
2.3 AMINOÁCIDOS	20
2.3.1 Glutamato.....	21
2.3.2 Cisteína	22
2.3.3 Glicina	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 LOCAL E SEMENTES	26
4.2 AMINOÁCIDOS	26
4.3 DESENHO FATORIAL DO EXPERIMENTO	26
4.4 MEIO DE CULTURA	27
4.4 INOCULAÇÃO E CULTIVO IN VITRO	28
4.4.1 Assepsia das sementes e inoculação	28
4.4.3 Condições de cultivo	28
4.5 ANÁLISES	29
4.5.1 Análise do cultivo.....	29
4.5.2 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 CÁDMIO VERSUS AMINOÁCIDOS	31
5.1.1 Número de folhas	31
5.1.2 Comprimento de raiz	33
5.1.3 Formação de plantas normais	34
5.1.4 Altura da Parte Aérea	35
5.2 CÁDMIO ISOLADAMENTE	36
5.3 AMINOÁCIDOS ISOLADAMENTE	37
6 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A manipulação de metais pesados devido à extração de minérios e seu processamento levaram a liberação desses elementos no ambiente, tornando poluição ambiental por este tipo de poluente uma preocupação mundial. A relevância dessa situação é consequência de que, diferente de substâncias orgânicas, os metais pesados não são essencialmente biodegradáveis e, portanto, acumulam-se no meio ambiente e nos seres vivos, representando uma ameaça ao ambiente e à saúde humana (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; KHAN *et al.*, 2010).

O cádmio por sua vez é um metal de transição que pode ser considerado como metal pesado por conta de sua toxicidade. Sua maior disponibilidade no ambiente ocorreu por conta da maior atividade de mineração, sendo conhecido que o grande uso de baterias de níquel e cádmio a partir da década de 40 também contribuiu para o seu aumento no ambiente (GUIMARÃES *et al.*, 2008).. A preocupação com o descarte inadequado em dejetos industriais bem como o aumento da presença de cádmio em solos agrícolas por conta da utilização de fertilizantes com traços desse elemento tornou necessária a procura por métodos de descontaminação desse poluente. No entanto, ao longo dos anos, as técnicas de remediação convencionais de solo contaminado, por exemplo, eram feitas custando entre 50 e 500 dólares por tonelada de solo. Dessa forma, para a remediação de um local com em média 4000m² e 1 metro de profundidade, seriam necessários 250.000 dólares. Esse fator inferiu na procura de técnicas alternativas de remediação com melhor custo-benefício (CUNNINGHAM; OW, 1996).

Enquanto a necessidade por métodos de remediação eficazes e com bom custo-benefício crescia, também crescia a pesquisa acerca da resistência de algumas espécies de plantas em relação à poluentes. Essas pesquisas mostravam que alguns vegetais eram capazes de remover poluentes do solo e ao mesmo tempo sobreviverem através de mecanismos fisiológicos especializados. Assim, a procura por métodos alternativos de remediação e o estudo do ciclo de vida das plantas então coincidiram no ponto em que foi estudado a possibilidade da utilização de espécies vegetais para a descontaminação de solos e água, processo conhecido como fitorremediação (CUNNINGHAM; OW, 1996).

Um gênero de plantas conhecido por sua capacidade de hiperacumulação de metais pesados é o *Brassica*, sendo várias espécies como a *B. oleracea* L., *B. juncea* L., *B. napus* L., e *B. rapa* L. já utilizadas em estudos de fitorremediação (EHSAN, 2014). *B. rapa* já estudada por Jahangir *et al.* (2008), que demonstrou o acúmulo de diferentes metabólitos na espécie sob toxicidade de alguns metais pesados (MOURATO *et al.*, 2015).

O metabolismo do nitrogênio é essencial nas respostas de plantas a metais pesados, já sendo demonstrado que o Cd pode interferir no metabolismo deste nutriente nesses organismos. Quando expostas a metais pesados, as plantas normalmente sintetizam substâncias de baixo peso molecular, em especial aminoácidos livres que são conhecidos por sua função de moléculas sinalizadoras desempenhando papéis como a regulação do transporte de íons e modulação da abertura estomática para desintoxicação por metais pesados. Dessa forma, o metabolismo dos aminoácidos possui um papel central na resistência ao estresse de metais pesados das plantas (ZHU *et al.*, 2018).

Assim, tendo a *B. rapa* como espécie hiperacumuladora modelo, o objetivo deste trabalho foi de analisar a ação dos aminoácidos glicina, glutamato e cisteína combinadamente na fitorremediação de Cd *in vitro* pela espécie e, em seguida, a ação isolada de cada elemento que não teve diferença significativa de forma combinada.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FITORREMEDIAÇÃO

As plantas são normalmente consideradas como uma fonte de alimento, madeira, fibras e combustíveis para a sociedade. Além disso, as plantas também são fontes de metabólitos secundários amplamente utilizados na indústria farmacêutica. Nas últimas décadas, sua importância ecológica foi evidenciada, após fatores como a mudança climáticas ocasionadas pela industrialização por conta do seu consumo de CO₂ principalmente (CUNNINGHAM; OW, 1996; COUTINHO; BARBOSA, 2007).

As consequências da industrialização não só são observadas na emissão de poluentes gasosos, mas também na emissão de outros tipos de poluentes no solo e na água, sendo necessário técnicas de remediação para a retirada desses produtos do ambiente. Tendo essa realidade em evidência, nos últimos anos foram realizadas pesquisas na utilização de técnicas de remediação que apresentem eficiência na descontaminação, praticidade em sua utilização e, principalmente, viabilidade econômica visto que técnicas tradicionais de remediação como por exemplo substituição de solos, imobilização química, isolamento de solo e remediação eletrocinética embora eficientes, sejam custosas (CUNNINGHAM; OW, 1996; KHALID *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018).

A biorremediação é a utilização de organismos vivos como microrganismos e plantas na descontaminação do solo ou da água, e compreende os requisitos de praticidade de utilização e eficiência, além de sua viabilidade econômica (PIRES *et al.*, 2003). Dentro da biorremediação, uma das técnicas mais estudadas é a fitorremediação, que se caracteriza pela utilização da vegetação e sua microbiota associada *in situ* para o tratamento do solo ou da água contaminada (DIETZ; SCHNOOR, 2001).

A fitorremediação pode ser aplicada em locais que contenham poluentes como metais ou poluentes orgânicos que são disponíveis em acesso pelas raízes das plantas e, em seguida, sequestrados, degradados, imobilizados ou metabolizados no lugar (DIETZ; SCHNOOR, 2001).

A fitorremediação se tornou bastante popular nos últimos 10 anos em função de suas vantagens, das quais se destacam custo-benefício, sua aplicabilidade em

longo prazo, vantagens estéticas, possibilidade de descontaminação em “baixa-escala” para locais que precisam apenas de um tratamento complementar e utilização conjunta com outras técnicas (DIETZ; SCHNOOR, 2001). Em relação às limitações, as mais expressivas incluem o fator intrínseco à planta, que necessita de um local apropriado ao seu crescimento e desenvolvimento e a necessidade de um tempo maior para o processo de remediação (PILON-SMITS, 2005).

Dentro da fitorremediação, há subprocessos (estratégias) pelos quais a planta irá promover a descontaminação desejada, como por exemplo a fitodegradação e a fitoestimulação. Para metais, o processo de fitorremediação pelas plantas consiste, essencialmente, no potencial de fitoextração e fitoestabilização. Na fitoextração, as plantas sequestram os poluentes em seus tecidos (hiperacumulação) e na fitoestabilização que consiste na imobilização desses metais (SHARMA *et al.*, 2018).

O crescimento da pesquisa na fitorremediação nos últimos anos proporcionou o avanço no conhecimento adquirido à área, no entanto, ainda há muitos mecanismos e interações envolvidos no processo de fitorremediação que necessitam de estudos mais detalhados. Assim, a pesquisa na fitorremediação deve ser continuada de forma multidisciplinar envolvendo profissionais de diferentes áreas na contribuição do conhecimento necessário à técnica (PILON-SMITS, 2005).

2.1.1 O gênero *Brassica* e a *Brassica rapa*.

Para a eficiência do processo de fitorremediação, são necessárias algumas propriedades das plantas a serem escolhidas. Plantas com crescimento rápido, elevada produção de biomassa, tolerância ao poluente, competitividade e vigor são as preferenciais quando escolhidas (LAMEGO; VIDAL, 2007).

A pesquisa da utilização de plantas na hiperacumulação de metais se iniciou com Chaney em 1983 (JIANG; LIU; HOU, 2000) e passou por processos de evolução entre as espécies vegetais, se mostrando bastante presente na família Brassicaceae.

O gênero *Brassica*, família Brassicaceae, envolve cerca de 30 espécies, incluindo variedades e híbridos, das quais várias são utilizadas para diferentes propostas, como agricultura ou biocombustíveis. A utilização de espécies do gênero *Brassica* na fitorremediação, principalmente no processo de fitoextração, é mediante

ao fator intrínseco do gênero de boa tolerância a metais pesados, bem como sua produção relativa de biomassa (MOURATO *et al.*, 2015).

As principais espécies do gênero *Brassica* envolvidas com fitorremediação entre outras atividades economicamente importantes são *B. juncea*, *B. nigra* L., *B. napus*, *B. oleracea*, *B. carinata* e *B. rapa* L. Dentre essas, a *B. juncea*, conhecida como mostarda indiana, é importante na utilização como condimento, produção de óleo e nas suas propriedades medicinais (MOURATO *et al.*, 2015), sendo uma das principais espécies de estudo na fitorremediação, como já demonstrado a sua utilização na hiperacumulação de chumbo (Pb) (JIANG; LIU; HOU, 2000) e no estudo de toxicidade de zinco (Zn) e cobre (Cu) (EBBS; KOCHIAN, 1997). A mostarda negra (*B. nigra*), por sua vez, também é muito utilizada como condimento mundialmente e apresenta estudos quanto à bioacumulação de metais pesados e a sua distribuição nas partes vegetativas e reprodutivas da planta (ANGELOVA; IVANOV, 2009). *B. napus*, assim como *B. juncea*, é uma grande fonte de óleo e é cultivada em nível global, sendo a toxicidade do zinco e cobre (EBBS; KOCHIAN, 1997) estudada previamente nessa espécie, bem como a fitorremediação de Cd na adição de ácido cítrico (EHSAN *et al.*, 2014). O couve ornamental, *B. oleracea* foi recentemente utilizado na avaliação de remoção de Pb e Cd em solos salinos (HAGHIGHI *et al.*, 2016) enquanto que *B. carinata* foi estudada na fitoextração de metais de diferentes solos contaminados com arsênio (As), Cd, Cu, Pb e Zn na presença de ácido nitriloacético (NTA) ou ácido etileno diamino di-succínico (EDDS) (QUARTACCI *et al.*, 2007). A espécie *B. rapa*, popularmente conhecida como nabo, já foi estudada quanto à toxicidade de Zn e Cu e mais recentemente, por sua alta produção de biomassa, também foi analisada quanto ao seu potencial de fitoextração de metais pesados em solos derivados de sedimentos calcários (MEERS *et al.*, 2005).

B. rapa (Figura 1) é uma planta herbácea nativa da Eurásia e naturalizada em grande parte da América do Norte, que cresce em áreas revoltas, sendo uma espécie adaptável por se desenvolver tanto em solos arenosos como em solos argilosos e pesados, tolerando um pH de 4,8 a 8,5. Preferindo luminosidade alta, mas também sendo capaz de crescer em sombras moderadas a espécie é bastante utilizada como planta de cobertura, tendo potencial de prevenir erosões, além de técnicas etnobotânicas que utilizam partes da planta como medicamento popular para vários tipos de câncer (YOUNG-MATHEWS, 2012). Esta espécie apresenta

propriedades fitorremediadoras, sendo considerada uma espécie acumuladora de metais pesados, como por exemplo o zinco e o cobre e com boa capacidade de tolerância ao estresse por Cd (XIA *et al.*, 2016).

Figura 1 - *Brassica rapa* L subsp. *oleifera*



Fonte: species.wikimedia.org/wiki/Brassica_rapa_subsp._oleifera

2.2 CÁDMIO

Descoberto em 1817 pelo químico alemão F. Strohmeier, o Cd é um elemento atualmente considerado como de transição na tabela periódica, de número atômico 48. Esse elemento está no mesmo subgrupo da tabela periódica do Zn e do mercúrio (Hg), sendo o seu único íon a espécie 2^+ e encontrado em forma sólida (NORDBERG, 2009; BAIRD; CANN, 2011).

O Cd é naturalmente escasso na camada mais externa da terra, sendo sua principal fonte natural a partir da emissão de gases de atividade vulcânica. No entanto, a mineração e a revolução industrial em seu percurso e fases distribuídas no final do século XIX e início do século XX induziram uma maior liberação de Cd no ambiente. Estima-se que a contaminação antropogênica do Cd seja entre 3 e 10 vezes superior que a sua contaminação natural, sendo grande parte de sua produção o resultado, como subproduto, da fusão do zinco visto que os dois metais ocorrem juntos, sendo liberado também através da queima de carvão. É amplamente utilizado na galvanização, em pigmentos, estabilizadores de plástico, e

em baterias de níquel-cádmio, sendo liberado para o ambiente através do descarte inadequado destas pilhas e da incineração de plásticos que o contenham em seu estabilizador, ou como pigmentos. Os famosos girassóis de Van Gogh possuem a pigmentação amarela brilhante produzida através dos íons de Cd, acreditando-se que o envenenamento por esse metal tenha contribuído com o estado mental do pintor (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2008; NORDBERG, 2009; BAIRD; CANN, 2011).

As primeiras observações dos efeitos tóxicos consequentes da exposição ao Cd foram realizadas de forma clínica, em que Sovet em 1858 notou sintomas no sistema gastrointestinal e dificuldades respiratórias em pessoas que utilizavam o carbonato de cádmio como agente polidor, inalando e ingerindo este material. Stephens em 1920 relatou o envenenamento em trabalhadores expostos ao Cd. As contribuições toxicológicas acerca do Cd avançaram em 1919 e 1923 com Alsberg e Schwartze a partir de experimentos que demonstraram alterações morfológicas em órgãos de animais como cães e pássaros, aumentando o número de pesquisas acerca da toxicidade do elemento no ser humano (NORDBERG, 2009).

Quando presentes excessivamente no solo e na água, o Cd ou outros metais pesados essenciais e não-essenciais são potenciais causadores de problemas a todos os organismos expostos a esses elementos. Em relação às plantas, o conhecimento que envolve as interações entre as plantas e os metais pesados são importantes para o estudo da segurança do ambiente e, principalmente, para a redução de riscos relacionados à inserção de vestígios de metais pesados na cadeia alimentar (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005).

Nas plantas, a toxicidade do Cd é observada em consequência de mecanismos e interações celulares, também responsáveis pela desintoxicação da planta e pela sua tolerância ao estresse ocasionado (HALL, 2002). No organismo vegetal, as enzimas são os alvos principais dos metais pesados, podendo ser inibidas ou até mesmo desnaturadas em decorrência da interação com esses elementos em excesso (DAS; ROUT; SAMANTARY, 1997). Além disso, o Cd é também um grande indutor de formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio nas plantas (DIETX; BAIER; KRÄMER, 1999).

Afetando o crescimento e o desenvolvimento da planta, os principais sintomas visíveis da toxicidade por Cd são: a clorose, que é a redução ou perda anormal da cor verde das folhas, o enrolamento das folhas e a perda de vigor

(BENAVIDES; GALLEG0; TOMARO, 2005). Recentemente também foram observados outros sintomas como a perda do turgor, lesões necróticas e redução da biomassa (HUSSAIN *et al.*, 2015; RIZWAN *et al.*, 2016a, b). Diante disso, as plantas evoluíram resistências e mecanismos para amenizar a toxicidade do Cd, como o controle na captação, a desintoxicação e a acumulação (BENAVIDES; GALLEG0; TOMARO, 2005).

2.3 AMINOÁCIDOS

A exposição das plantas aos metais pesados geralmente induzem à síntese de substâncias de baixo peso molecular denominadas aminoácidos livres e também conhecidos como solutos compatíveis que desempenham função de sinalização e papel funcional como osmólitos, eliminadores de radicais livres, regulação no transporte de íons, modulação da abertura dos estômatos e desintoxicação de metais pesados. Aminoácidos ricos em grupos carboxila, amina, tióis e fenóis estão envolvidos também na síntese de glutathione e de fitoquelatinas, que formam cátions metálicos que diminuem a reatividade de metais pesados com outras moléculas celulares e são funcionais como quelantes de metálicos (SHARMA; DIETZ, 2006; IRTELLI *et al.*, 2009; GHNAYA *et al.*, 2010; RICHAU *et al.*, 2009; ZEMANOVÁ *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2018).

O metabolismo do nitrogênio lidera a resposta das plantas aos metais pesados. O acúmulo de Cd no organismo vegetal compromete o sistema de biosíntese de aminoácidos sendo demonstrado que este elemento pode, dessa forma, interferir no metabolismo do nitrogênio (N). Além disso, o Cd também inibe a atividade de algumas enzimas vegetais, causa estresse oxidativo e interfere no desequilíbrio metabólico do organismo (NAGAJYOTI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; CHAFFEI *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2018).

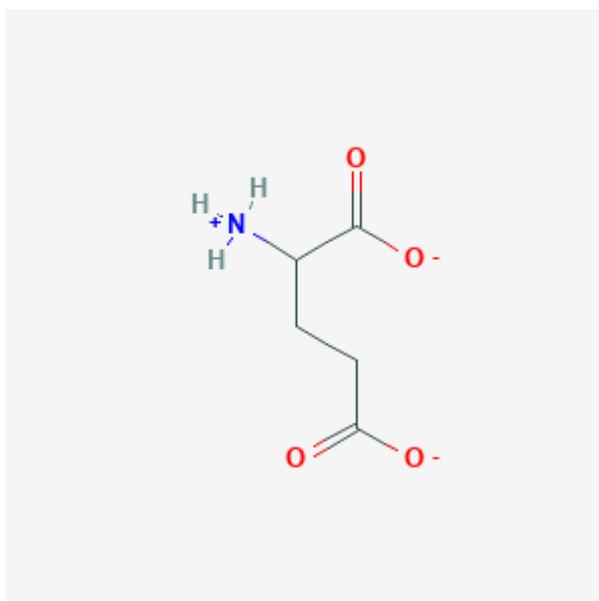
A glutathione (GSH) é um dos principais tripeptídeos envolvidos na defesa celular contra a ação tóxica de xenobióticos e cátions metálicos, também sendo capaz de proteger as células dos danos causados pelo estresse oxidativo, de alterar as taxas de absorção e eliminação de metais e de quelar íons metálicos em células (MEISTER; ANDERSON, 1983; GALLEG0; BENAVIDES; TOMARO, 1996; KANG; ENGER, 1987). Essa molécula de baixo peso molecular é composta por glutamato, cisteína e glicina. A síntese de GSH é catalisada por duas enzimas dependentes de

ATP, que são a γ -glutamilcisteína sintetase e glutathione sintetase. A glutathione é também um substrato para a síntese de fitoquelatina, que são polipeptídeos compostos de cisteína que se ligam a metais pesados, formando complexos com os íons metálicos tóxicos no citosol e os transportando para o vacúolo, tendo função de proteção da plantas contra os efeitos deletérios desses compostos (SALT; RAUSER, 1995; FREEMAN *et al.*, 2014; YADAV, 2010).

2.3.1 Glutamato

O glutamato (figura 1) é um aminoácido envolvido na resposta das plantas aos fatores ambientais e sua fórmula química é $C_5H_9NO_4$. A amônia é absorvida do solo é assimilada em Glutamato e Glutamina pelo ciclo da glutamato sintase (GOGAT) e glutamina sintetase (GS). Além disso, o glutamato também é um precursor de aminoácidos livres que são relacionados ao estresse do vegetal, como prolina, arginina, e ácido aminobutírico (GABA). Estudos recentes mostraram que a suplementação de glutamato em arroz (*Oryza sativa* L.) amenizou a toxicidade e diminuiu a acumulação de Cd, como também aumentou a atividade das enzimas antioxidantes catalase, peroxidase e glutathione transferase que diminuiu significativamente o estresse oxidativo provocado pelo Cd (JIANG *et al.*, 2019). Nesse mesmo estudo também foi demonstrado que a suplementação de glutamato foi responsável por induzir a expressão de genes transportadores de metais OsNramp1, OsNramp5, OsURT2, OsHMA2 e OsHMA3 nas raízes.

Figura 2 – Fórmula molecular do Glutamato.



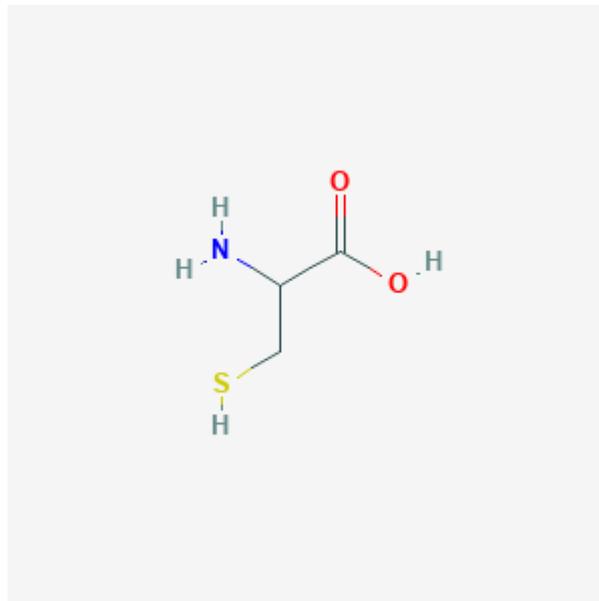
. Fonte: Pubchem.

2.3.2 Cisteína

Precursora para a síntese de glutathione, a cisteína (figura 2) é um aminoácido que possui o grupo tiol. Sua fórmula química é C₃H₇NO₂S e a presença desse tiol na molécula de glutathione é essencial à sua atividade. Domínguez-Solís *et al.* (2004) demonstraram que o aumento da disponibilidade de cisteína está diretamente ligado com a tolerância e a acumulação de Cd nas plantas. Esses mesmos autores haviam demonstrado que a primeira resposta ao estresse ocasionado pelo Cd em *Arabidopsis thaliana* é a indução de genes responsáveis pela biossíntese de cisteína e, nesse estudo, foi realizada uma engenharia genética na mesma espécie modelo *A. thaliana* para a superexpressão do gene *Atcys* que codifica uma das formas citosólicas da enzima O-acetilserina(tiol)liase OASTL mais conhecida atualmente como cisteína sintetase que é responsável pela última etapa na biossíntese de cisteína a partir da via de assimilação do sulfato. Dessa forma, foi observado que a planta modelo e a planta modificada demonstraram níveis similares de cisteína e glutathione em condições padrão de cultivo. Entretanto, na presença de Cd, a planta modificada demonstrou níveis substancialmente mais altos

de cisteína e glutathione. Esse aumento ainda possibilitou à espécie modificada a sobrevivência em condições severas de estresse por metais pesados e demonstrou um nível de acumulação de Cd semelhante ao visto em espécies naturalmente hiperacumuladoras.

Figura 2 – Fórmula molecular da Cisteína.



Fonte: Pubchem.

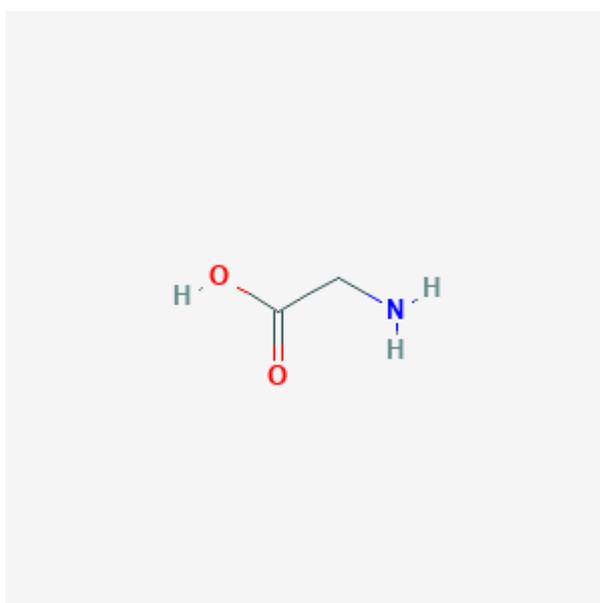
A cisteína também está presente na estrutura das fitoquelatinas. As fitoquelatinas são peptídeos responsáveis pelo sequestro dos metais pesados, permitindo uma maior tolerância a esses poluentes. Na ação de sequestro desses metais, a etapa limite na reação é a etapa do fornecimento da cisteína que é também realizada pela cisteína sintetase. Assim, similar ao trabalho realizado com *Arabidopsis thaliana*, Harada *et al.* em 2002 também realizaram a engenharia genética para a observação do comportamento das plantas em relação à presença de Cd. Nesse trabalho, a planta utilizada foi a espécie *Nicotiana tabacum* que foi modificada com o gene RCS1 do arroz (*Oryza sativa*). Os resultados mostraram que as plantas transgênicas possuem atividade três vezes maior de cisteína sintetase que as plantas controle e que, após a exposição ao Cd, ela apresentaram tolerância e crescimento superior que as plantas controle. O trabalho ainda mostrou que o nível de fitoquelatinas nas plantas transgênicas era maior e que a concentração de Cd no peso fresco dessas plantas foi 20 % menor do que no tratamento controle.

Os resultados desses trabalhos envolvendo a cisteína demonstra a importância dessa molécula tanto na tolerância ao Cd como na própria metabolização desse composto pelas plantas. Esse fator está diretamente ligado com a possibilidade da utilização deste aminoácido em plantas naturalmente hiperacumuladoras para uma melhoria na performance na fitorremediação do Cd.

2.3.3 Glicina

A glicina (Figura 3) é um aminoácido de fórmula $C_2H_4NO_2$ que compõe a glutathione em conjunto com o glutamato e a cisteína. A glicina e a cisteína estão intimamente envolvidas com a biossíntese de fitoquelatinas e metabólitos antioxidantes. Além disso, também é estudado o efeito de proteínas ricas em glicinas no crescimento e na função das paredes celulares. A diminuição do conteúdo de glicina em espécies não hiperacumuladoras parece estar envolvido com o processo de adaptação aos efeitos do Cd, enquanto em espécies hiperacumuladoras o conteúdo de glicina parece se manter estável (ZHU *et al.*, 2018).

Figura 3 – Fórmula molecular da Glicina.



Fonte: Pubchem.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a capacidade fitorremediadora da *B. rapa* na presença de Cd e com suplementação dos aminoácidos glutamato, glicina e cisteína combinados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar os efeitos positivos dos aminoácidos na capacidade fitorremediadora de Cd da *B. rapa* em concentrações diferenciadas; inferir os mecanismos fisiológicos que podem estar envolvidos nos resultados; e discutir os desdobramentos dos efeitos significativos da suplementação dos aminoácidos para a futura utilização desses suplementos como forma de melhoramento da capacidade fitorremediadora da espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E SEMENTES

As sementes de *B. rapa* foram advindas do município de Estiva, localizado no estado de Minas Gerais. As sementes foram mantidas em geladeira (± 8 °C) até a utilização.

4.2 AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos utilizados foram o glutamato na forma de ácido L-glutâmico ($C_5H_9NO_4$), cisteína na forma de cloridrato de L-cisteína anidra ($C_7H_7NO_2.HCl$) e glicina ($C_6H_6NO_2$), todos preparados em solução padrão de 1000 ppm.

4.3 DESENHO FATORIAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi feito em um desenho fatorial somando 16 tratamentos com concentrações de 0, 50, 100 e 200 ppm de Cd e 0, 50, 100 e 200 ppm para cada aminoácido, glutamato, glicina e cisteína, que foram utilizados de forma combinada para os tratamentos com a presença de aminoácidos. (Figura 4).

Figura 4 - Desenho fatorial realizado para a combinação das concentrações de aminoácidos e Cd, com 10 tubos para cada tratamento.

		Aminoácidos			
		0 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
Cádmio	0 ppm	T0  10 _x	T1  10 _x	T2  10 _x	T3  10 _x
	50 ppm	T4  10 _x	T5  10 _x	T6  10 _x	T7  10 _x
	100 ppm	T8  10 _x	T9  10 _x	T10  10 _x	T11  10 _x
	200 ppm	T12  10 _x	T13  10 _x	T14  10 _x	T15  10 _x

Fonte: autor.

4.4 MEIO DE CULTURA

Os meios de cultivo foram preparados conforme o meio base MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado. As modificações realizadas foram no nitrato de amônia e no nitrato de potássio que foram substituídos pelo Kristalon Comercial, reduzindo em 25 % a concentração em contraste com o original. Foi adicionado ainda 30 gL⁻¹ de sacarose. Os tratamentos foram preparados e o pH ajustado para 5.8 com o auxílio um phmetro de bancada e de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) ambos em concentração de 1 mol/L. Para cada tratamento foi adicionado 0,6 % de ágar bacteriológico. Ao final, cada tratamento foi dividido em 10 tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio base por tubo. Todos os meios foram devidamente autoclavados por 15 minutos a 121 °C e pressão de 1,5 atm.

4.4 INOCULAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO*

4.4.1 Assepsia das sementes e inoculação

As sementes selecionadas passaram por um processo de assepsia dentro da câmara de fluxo laminar que consistiu em um banho de 30 segundos em solução de álcool 70 % (v/v), seguido de imersão por cinco minutos em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial em proporção de 50 % (v/v) com água destilada autoclavada. Após isso, as sementes foram lavadas com água estéril por três vezes. Ainda na câmara de fluxo laminar, as sementes desinfestadas foram inoculadas nos tubos de ensaio com o auxílio de uma pinça autoclavada e esterilizada em chama de bico de bunsen. Para cada tratamento foi utilizado o mesmo processo de esterilização em chama. Cada tubo de ensaio conteve duas sementes posicionadas paralelamente, totalizando 20 sementes por tratamento e 320 para o experimento completo. Os tubos foram fechados com tampa plástica e vedados com filme de PVC.

4.4.3 Condições de cultivo

Os tubos de ensaio foram levados para uma estante de fotoperíodo e dispostos de forma aleatória sob a luz como mostrado na Figura 5. As condições de cultivo se mantiveram em 25 °C com 16 h de fotoperíodo e irradiância de $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

Figura 5 - Plântulas com 10 dias de germinação em estante de fotoperíodo dispostas de forma aleatória em relação aos tratamentos, todos contendo meio MS e duas sementes.



Fonte: autor.

4.5 ANÁLISES

4.5.1 Análise do cultivo

Após 45 dias de cultivo, as plântulas foram retiradas da estante de fotoperíodo e analisadas cada uma quanto aos parâmetros de: peso fresco (mg) com o auxílio de uma balança de precisão (0,0001 g); altura (mm) e comprimento (mm) da plântula, da parte aérea (mm) e das raízes (mm) com auxílio de uma régua milimetrada; número de folhas e diferenciação entre plântulas normais e anormais. Todos os dados foram coletados em uma Tabela.

4.5.2 Análise estatística

Os dados coletados de cada parâmetro foram submetidos à análise de variância a partir do software SISVAR® (FERREIRA, 2011) e os tratamentos que

apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) tiveram suas médias submetidas ao teste de média de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

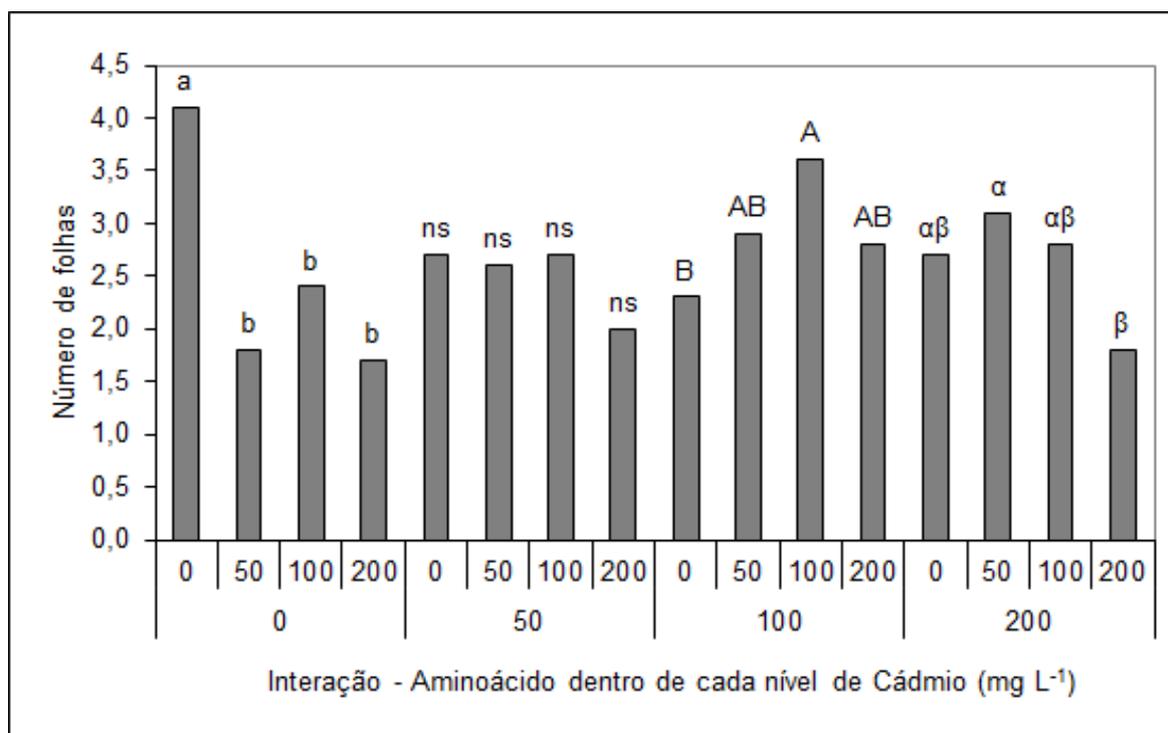
5.1 CÁDMIO *VERSUS* AMINOÁCIDOS

As concentrações de aminoácidos em contraste ao Cd obtiveram performances relevantes, apresentando resultados significativos para os parâmetros: número de folhas, comprimento de raiz e formação de plantas normais; e não significativos para altura da parte aérea.

5.1.1 Número de folhas

Este parâmetro apresentou interação significativa ($p < 0.0013$), estando suas performances apresentadas na Figura 6. A maior média geral foi observada no tratamento controle, 4.1 folhas. Na ausência de Cd, a presença de aminoácidos não influenciou significativamente o aumento no número de folhas.

Figura 6 - Interação de aminoácido dentro de cada nível de cádmio para a variação do número de folhas



Na concentração de 50 ppm de Cd a suplementação de aminoácidos se mostrou não significativa em todas as suas concentrações. Na presença de 100 ppm de Cd, a maior média do número de folhas (3,6 folhas) foi obtida com 100 ppm de aminoácidos. Já na concentração de 200 ppm de Cd, a maior média (3,1 folhas) foi observada com a utilização de 50 ppm de aminoácidos.

As folhas são uma das partes da planta mais afetadas com a presença de metais pesados no meio. Os sintomas mais observados em plantas acumuladoras devido à essa presença de metais pesados são clorose e dobramento ou enrolamento das folhas (Figura 7). Já foi demonstrado que a suplementação exógena de glutamato, glicina e cisteína em mudas de arroz (*O. sativa*) crescidas em solo contendo Cd influenciou na redução da translocação de Cd^{2+} das raízes para a parte aérea, diminuindo a peroxidação lipídica das plantas (WANG *et al.*, 2016). Assim, é possível inferir que a diferença significativa observada no parâmetro número de folhas para o teste aminoácidos x Cd pode estar envolvido com a redução da translocação do Cd^{2+} na *B. rapa*.

Figura 7 - Alguns sintomas do Cd na *B. rapa*: clorose e dobramento ou enrolamento das folhas.

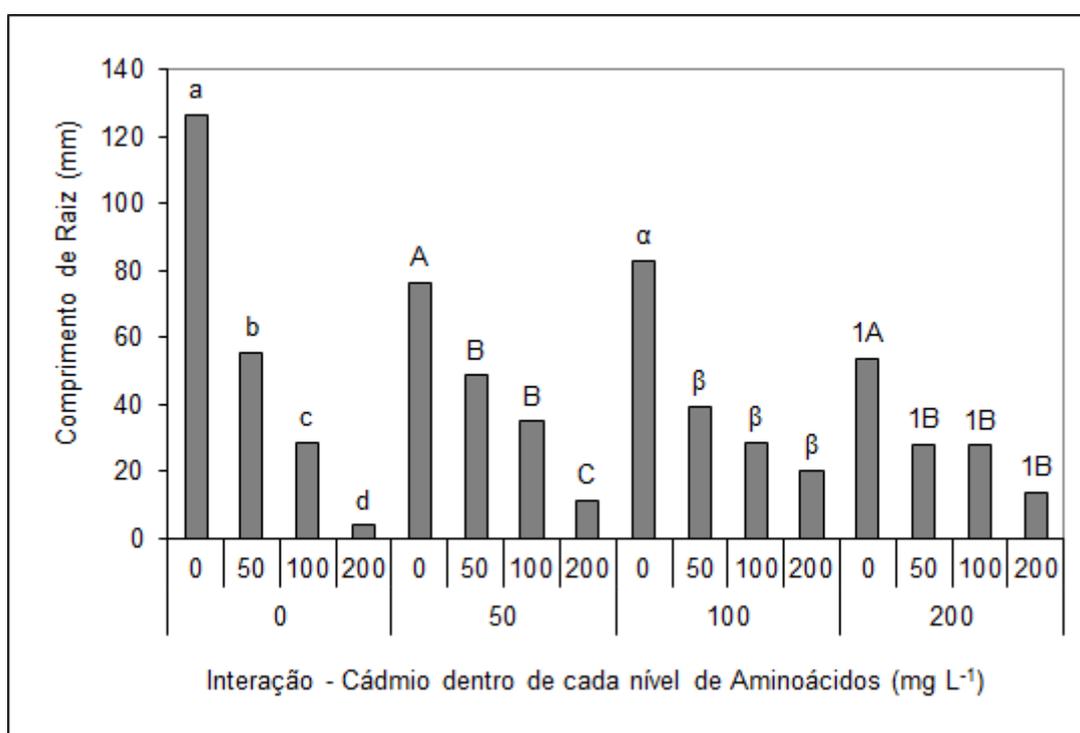


Fonte: autor.

5.1.2 Comprimento de raiz

A interação aminoácidos x Cd foi significativa para esse parâmetro ($p < 0,0001$). Nesse resultado, foi evidenciado que todas as concentrações de Cd diferiram na ausência de aminoácidos, e que a ausência de Cd também foi significativa dentro de cada concentração de aminoácidos (Figura 8).

Figura 8 - Interação de aminoácido dentro de cada nível de Cd para a variação do comprimento de raiz.



Nota-se que na ausência de aminoácidos, o comprimento da raiz é reduzido drasticamente na medida em que as concentrações de Cd vão aumentando, de 126 mm (0/0 ppm – aminoácidos x Cd) para 4 mm (0/200 ppm – aminoácidos x Cd). Padrão semelhante foi observado na concentração de 50 ppm de aminoácidos, muito embora nota-se uma redução significativa do comprimento da raiz na ausência de Cd (77 mm) em comparação ao controle geral (126 mm), mas um aumento no comprimento na maior concentração de Cd (11 mm) em comparação aos 4 mm obtidos com 200 ppm de Cd e ausência de aminoácidos. Entretanto, nas

concentrações de 100 e 200 ppm de aminoácidos, o aumento da concentração de Cd (50 - 200 ppm) não ocasionou uma redução gradativa do comprimento das raízes uma vez que não diferiram estatisticamente entre si, evidenciando o papel positivo da adição dos aminoácidos (Figura 8).

As raízes são o maior órgão de entrada de Cd na planta (RAUSER; MEUWLY, 1995). Já foi observado que plantas tolerantes a metais pesados possuem uma diminuição da concentração do metal nos brotos e um aumento do acúmulo nas raízes, diferentemente de plantas não tolerantes (DAS; ROUT; SAMANTARY, 1997). Essa maior retenção de metais pesados nas raízes implicam uma restrição da translocação do metal para a parte aérea da planta como forma de proteção do aparato fotossintético, como visto em relação ao parâmetro de número de folhas. Dessa forma, a diferença demonstrada em todos os níveis de aminoácidos x Cd se mostrou significativa e possivelmente está relacionada à toxicidade do Cd nas raízes da *B. rapa* a partir de uma maior produção de quelatinas e/ou proteínas com capacidade de ligação ao metal, responsáveis por reduzir a concentração de Cd livre que poderia ser translocado para as partes aéreas (ZOUARI *et al.*, 2016).

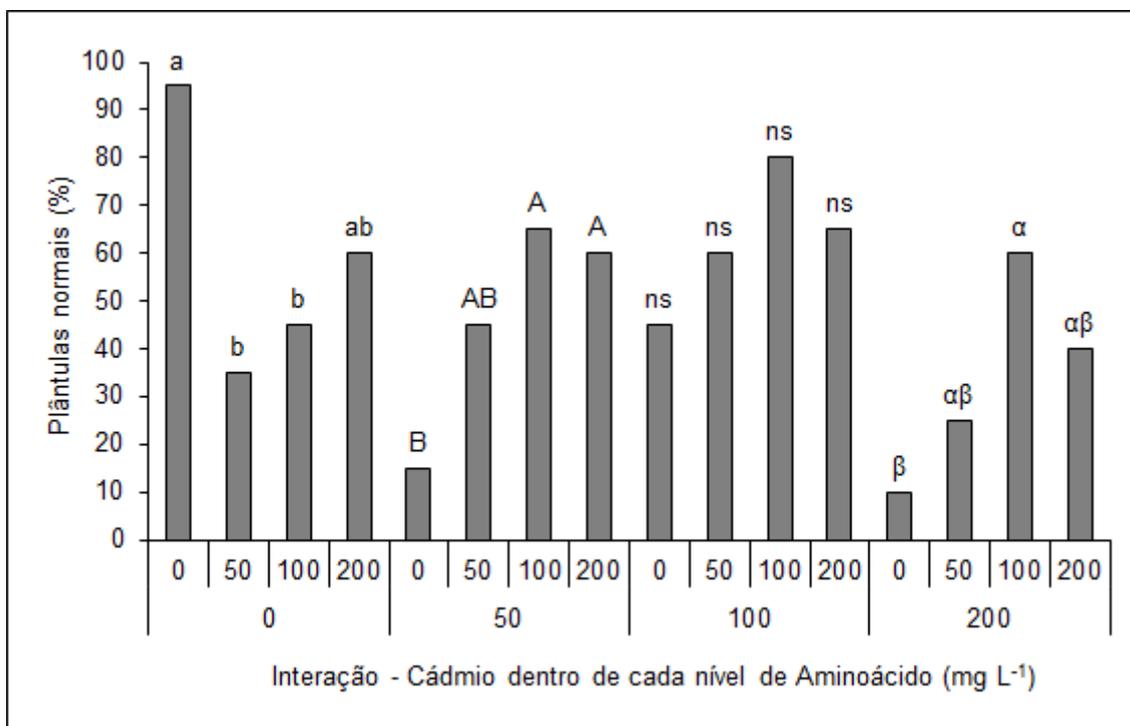
5.1.3 Formação de plantas normais

Para a porcentagem de plantas normais, ($p < 0,0018$) o resultado mais significativo esteve dentro da concentração de 100 ppm de aminoácidos, na qual todos os resultados possuíram efeitos de anulação da presença do Cd (Figura 9). Além disso, de forma geral a concentração de 100 ppm de aminoácidos apresentou a melhor média na porcentagem de plântulas normais comparadas aos outros tratamentos, estando apenas menor do que o controle geral.

A o aumento da concentração de Cd no meio influencia positivamente até certo ponto, na obtenção de um maior número de plantas normais. Foi observado em *Olea europaea* L. que o tratamento das plântulas com Cd induz à acumulação deste elemento nas raízes e nas folhas e diminui a realização da fotossíntese, da captação de alguns minerais e da biomassa. O tratamento das plântulas com outro aminoácido, a prolina exógena, atenuou esses efeitos, permitindo plantas com uma maior atividade de enzimas antioxidantes, maior atividade fotossintética e melhor

crescimento, sendo portanto os resultados referentes à porcentagem de plantas normais relacionado à presença da prolina exógena e dos outros aminoácidos na atenuação dos efeitos do Cd na atividade fotossintética e, portanto, na presença de plantas normais e anormais (ZOUARI *et al.*, 2016). A anulação estatística dos efeitos tóxicos do Cd dentro da concentração de 100 ppm de aminoácidos demonstra potencial de fitorremediação nesses parâmetros estabelecidos. A maior média em relação às porcentagens de plantas normais em relação à cada concentração de Cd também esteve dentro da concentração de 100 ppm de aminoácidos, que pode ser interpretado como outra evidência dessa concentração ter tido impacto significativo na anulação dos efeitos tóxicos do Cd.

Figura 9 - Interação de aminoácido dentro de cada nível de Cd para a variação da porcentagem de plântulas normais.



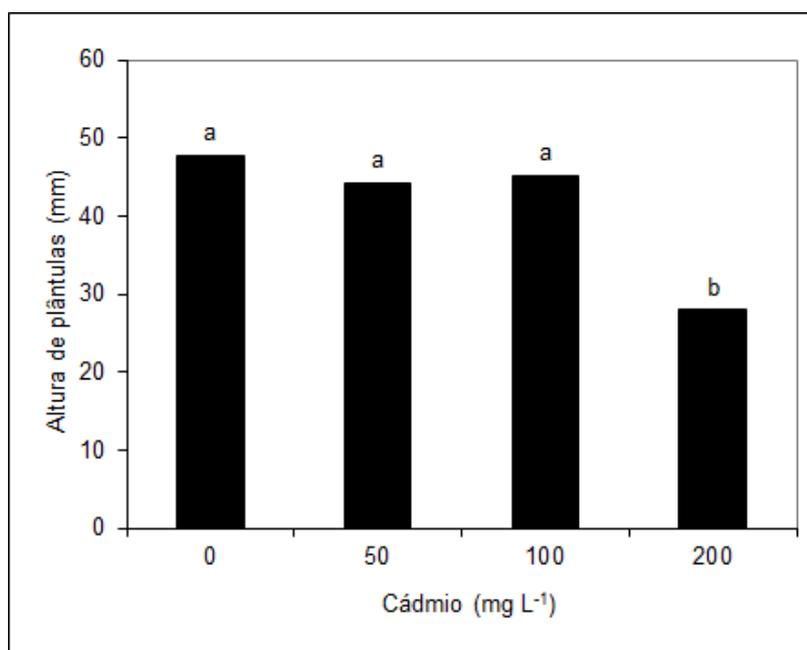
5.1.4 Altura da Parte Aérea

A altura da parte aérea para o teste de Cd x Aminoácidos (AA) não apresentou resultados significativos, sendo sua média geral de 41,24 mm.

5.2 CÁDMIO ISOLADAMENTE

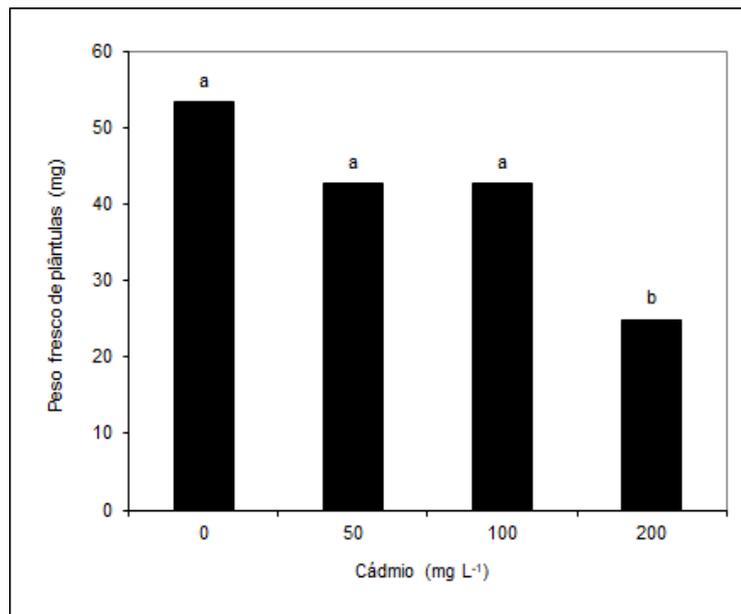
A altura de plântulas ($p < 0,0001$) bem como o peso fresco ($p < 0,0001$) apresentaram resultados significativos, na concentração de 200 ppm de Cd, com os menores valores de 27,8 mm para altura (Figura 10) e 24,9 mg para o peso fresco (Figura 11, respectivamente. Para as concentrações de 50 e 100 ppm de Cd, as médias estiveram bem próximas para os dois parâmetros. O tratamento controle apresentou a maior média de peso fresco (53,3 mg) e de altura (47,7 mm), como esperado.

Figura 10 - Variação da altura em relação às concentrações de cádmio.



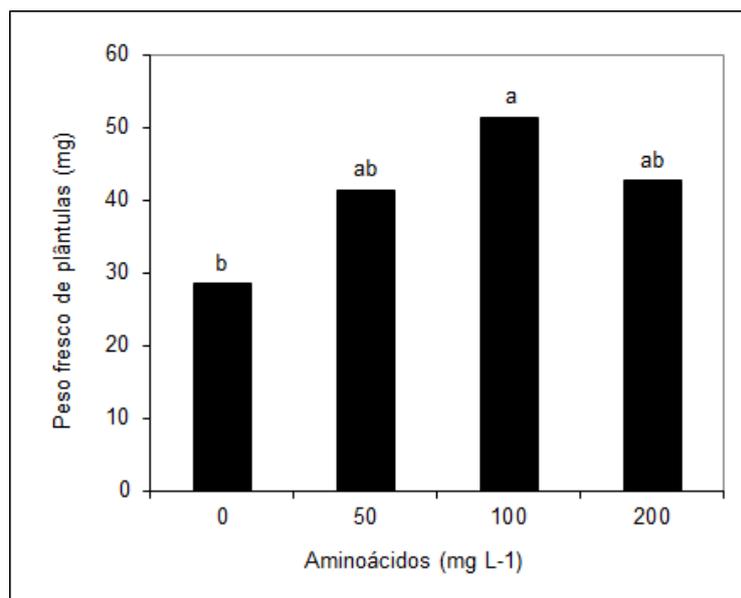
O Cd tem influência na atividade fotossintética, na captação de nutrientes e no crescimento das plântulas, dessa forma é possível inferir que em contraste com o tratamento controle, o tratamento com maior concentração de Cd teve seu desenvolvimento (altura) e sua biomassa (peso fresco) afetados.

Figura 11 - Variação do peso fresco em relação às concentrações de cádmio.



5.3 AMINOÁCIDOS ISOLADAMENTE

Figura 12 - Variação do peso fresco em relação às concentrações de aminoácidos.



Para a fonte de variação de aminoácidos, apenas o peso fresco foi significativo ($p < 0,0003$) sendo possível observar que a fonte exógena de aminoácidos para a concentração de 100 ppm, com valor de 51 mg, permitiu um maior desenvolvimento da biomassa da plântula (Figura 12). Todos as

concentrações de aminoácidos obtiveram médias de peso fresco maior que o controle, que foi de 28 mg. Esse resultado demonstra que na concentração de 100 ppm, os aminoácidos de forma isolada foram capazes de melhorar o desenvolvimento em biomassa da planta, contribuindo no seu metabolismo.

6 CONCLUSÕES

A suplementação de aminoácidos no meio com Cd apresentou resultados no desenvolvimento da plântula de *B. rapa* fundamentado os objetivos do trabalho. Os dados obtidos possibilitaram inferir que a suplementação exógena com os aminoácidos glutamato, glicina e cisteína combinadamente interferiu no desenvolvimento da espécie em relação ao meio com presença de Cd.

O aumento do número de folhas, o maior comprimento de raiz da planta e a maior formação de plantas normais foram parâmetros significativamente influenciados pela suplementação de aminoácidos.

Esses resultados estão de acordo com as pesquisas mais recentes em relação aos efeitos positivos da suplementação exógena de aminoácidos no processo de fitorremediação e permite, de forma geral, que a incorporação de aminoácidos nesse processo seja feita com fins de aperfeiçoar e refinar a técnica, através do estudo mais amplo acerca do metabolismo no nitrogênio para sua possível suplementação e indução da síntese desses aminoácidos, mantendo o bom custo benefício da técnica.

REFERÊNCIAS

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869-881, 2013.

ALSBERG, C. L., Schwartz, E. W. Pharmacological action of cadmium. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 13, p. 504–505, 1919.

ANGELOVA, V.; IVANOV, K. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in black mustard (*Brassica nigra* Koch). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 153, n. 1-4, p. 449-459, 2009.

BAIRD C.; CANN M. **Química Ambiental**. 4ª edição. São Paulo: Bookman, 16 de março de 2011.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGOS, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.

CHAFFEI, C. *et al.* Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 11, p. 1681-1693, 2004.

CHANEY, R.L. Plant Uptake of Inorganic Waste Constituents. **Land Treatment of Hazardous Wastes**, p. 50-76, 1983.

COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. **Silva Lusitana**, v. 15, n. 1, p. 103-117, 2007.

CUNNINGHAM, S. D.; OW, D. W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, v. 110, n. 3, p. 715, 1996.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, v. 98, n. 1, p. 29-36, 1997.

DIETZ, K.-J.; BAIER, M.; KRÄMER, U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. **Heavy Metal Stress in Plants**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 73-97, 1999.

DIETZ, A. C.; SCHNOOR, J. L. Advances in phytoremediation. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1, p. 163-168, 2001.

DOMÍNGUEZ-SOLÍS, J. R. *et al.* Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, n. 6, p. 469-476, 2004.

EBBS, S. D.; KOCHIAN, L. V. Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. **Journal of Environmental Quality**, v. 26, n. 3, p. 776-781, 1997.

EHSAN, S. *et al.* Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 106, p. 164-172, 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FREEMAN, J. L. *et al.* Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. **The Plant Cell**, v. 16, n. 8, p. 2176-2191, 2004.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, v. 121, n. 2, p. 151-159, 1996.

GUIMARÃES, M. *et al.* Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2 n. 2, 2008.

HAGHIGHI, M. *et al.* Using kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a phytoremediation plant species for lead (Pb) and cadmium (Cd) removal in saline soils. **Journal of Plant Nutrition**, v. 39, n. 10, p. 1460-1471, 2016.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002.

HARADA, E. *et al.* Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 4, p. 445-448, 2002.

HUSSAIN, M. M. *et al.* Differential responses of one hundred tomato genotypes grown under cadmium stress. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 13162-71, 2015.

IRTELLI, B.; NAVARI-IZZO, F. Uptake kinetics of different arsenic species by *Brassica carinata*. **Plant and Soil**, v. 303, n. 1-2, p. 105, 2008.

JAHANGIR, M. *et al.* Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 14, p. 1429-1437, 2008.

JI, P. *et al.* Strategies for enhancing the phytoremediation of cadmium-contaminated agricultural soils by *Solanum nigrum* L. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 3, p. 762-768, 2011.

JIANG, W.; LIU, D.; HOU, W. Hyperaccumulation of lead by roots, hypocotyls, and shoots of *Brassica juncea*. **Biologia Plantarum**, v. 43, n. 4, p. 603-606, 2000.

JIANG, M. *et al.* Glutamate alleviates cadmium toxicity in rice via suppressing cadmium uptake and translocation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, 2019.

KANG, Y. I.; Enger, M. D. Effect of cellular glutathione depletion on cadmium induced cytotoxicity in human lung carcinoma cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 3, p. 347-360, 1987.

KHALID, S. *et al.* A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 182, p. 247-268, 2017.

KHAN, R. U. *et al.* Influence of feed supplementation with *Cannabis sativa* on quality of broilers carcass. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 30, n. 1, p. 34-38, 2010.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, 2007.

LIU, L. *et al.* Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: principles and applicability. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 206-219, 2018.

LIU, X. *et al.* Metabolic profiling of cadmium-induced effects in one pioneer intertidal halophyte *Suaeda salsa* by NMR-based metabolomics. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1422-1431, 2011.

MEERS, Erik *et al.* Potential of *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils. **Chemosphere**, v. 61, n. 4, p. 561-572, 2005.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 711-760, 1983.

MOURATO, M. P. *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.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 3, p. 199-216, 2010.

NORDBERG, G. F. Historical perspectives on cadmium toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 192-200, 2009.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 15-39, 2005.

PIRES, F. R. *et al.* Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de tebutiuron. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 451-458, 2003.

PURAKAYASTHA, T. J. *et al.* Phytoextraction of zinc, copper, nickel and lead from a contaminated soil by different species of *Brassica*. **International Journal of Phytoremediation**, v. 10, n. 1, p. 61-72, 2008.

QUARTACCI, M. F. *et al.* The use of NTA and EDDS for enhanced phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by *Brassica carinata*. **Chemosphere**, v. 68, n. 10, p. 1920-1928, 2007.

RAUSER, W. E.; MEUWLY, P. Retention of cadmium in roots of maize seedlings (role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides). **Plant Physiology**, v. 109, n. 1, p. 195-202, 1995.

RICHAU, K. H. *et al.* Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, v. 183, n. 1, p. 106-116, 2009.

RIZWAN, M. *et al.* Cadmium minimization in wheat: a critical review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 43-53, 2016.

RIZWAN, M. *et al.* Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 17859-17879, 2016.

RIZWAN, M. *et al.* Cadmium phytoremediation potential of *Brassica* crop species: a review. **Science of the Total Environment**, v. 631, p. 1175-1191, 2018.

SALT, D. E.; RAUSER, W. E. MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. **Plant Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1293-1301, 1995.

SHARMA, R. *et al.* Phytoremediation in Waste management: hyperaccumulation diversity and techniques. In: **Plants Under Metal and Metalloid Stress**. Springer, Singapore, p. 277-302, 2018.

SHARMA, S. S.; DIETZ, KJ. 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.

SOVET, U. Poisoning caused by powder used in the cleaning of Silver. **Press Medicale** v. 9, p. 69–70, 1958.

STEPHENS, G. A. Cadmium poisoning. **The Journal of Industrial Hygiene and Toxicology**, 1920.

WANG, W. *et al.* Exogenous amino acids increase antioxidant enzyme activities and tolerance of rice seedlings to cadmium stress. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 36, n. 1, p. 155-161, 2016.

XIA, S. *et al.* Variations in the accumulation and translocation of cadmium among pak choi cultivars as related to root morphology. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9832-9842, 2016.

YADAV, S. K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 2, p. 167-179, 2010.

YOUNG-MATHEWS, A. Plant guide for field mustard (*Brassica rapa* var. *rapa*). **USDA-Natural Resources Conservation Service**, Corvallis Plant Materials Center, 2012.

ZEMANOVÁ, V. *et al.* The significance of methionine, histidine and tryptophan in plant responses and adaptation to cadmium stress. **Plant, Soil and Environment**, v. 60, n. 9, p. 426-432, 2014.

ZEMANOVÁ, V.; PAVLÍK, M.; PAVLÍKOVÁ, D. Cadmium toxicity induced contrasting patterns of concentrations of free sarcosine, specific amino acids and selected microelements in two *Noccaea* species. **Plos One**, v. 12, n. 5, 2017.

ZHU, G. *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.

ZOUARI, M. *et al.* Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 100-108, 2016.

ZOUARI, M. *et al.* Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 195-205, 2016.