

CLAUDIO SERGIO MARINATO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ELEMENTOS METÁLICOS NO
METABOLISMO DE *Cassia grandis* L. (Fabaceae)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M337a
2021
Marinato, Claudio Sergio, 1972-
Avaliação da toxicidade de elementos metálicos no
metabolismo de *Cassia grandis* L. (Fabaceae) [recurso
eletrônico] / Claudio Sergio Marinato. – Viçosa, MG, 2021.
1 tese eletrônica (93 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.008>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Plantas - Efeito dos metais pesados. 2. Fitorremediação.
3. Barragens de rejeitos. 4. Tolerância. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 583.74

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima Alves CRB6/2578

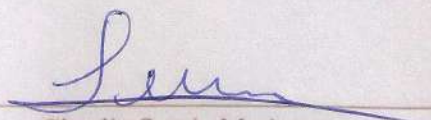
CLAUDIO SERGIO MARINATO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ELEMENTOS METÁLICOS NO
METABOLISMO DE *Cassia grandis* L. (Fabaceae)

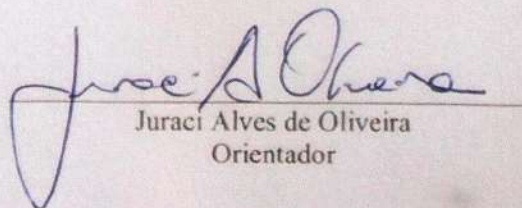
Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de março de 2021.

Assentimento:



Claudio Sergio Marinato
Autor



Juraci Alves de Oliveira
Orientador

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.
(Simone de Beauvoir)

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho demandou grande esforço e dedicação, no entanto, essa caminhada teria sido muito mais difícil sem o apoio de inúmeras pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram a atingir esse objetivo.

A minha esposa, Alessandra, pela paciência e apoio em toda essa caminhada. A minha mãe, Ana, e meu pai, Djalma, (*in memoriam*) por todo amor e carinho ao longo da minha vida. Aos meus irmãos, Djalma e Édson, por tudo que representam para mim.

Ao meu orientador, professor Juraci, agradeço por todo apoio, incentivo, conselhos, paciência e atenção durante o desenvolvimento deste trabalho. À Taline por todo auxílio prestado no laboratório. À Beth que sempre estava à disposição, com um sorriso. A todos os professores com quem tive o prazer de trabalhar, em especial o professor Cleberson, Eduardo Borges, Luzimar e Sebastian.

Aos colegas com quem convivi no Laboratório de Biofísica Ambiental. Daniel, Vinícius, Pedro, Fernando, entre outros, sempre com companheirismo, tanto no trabalho, quanto no café com simpatia. À Heloísa, um ser humano fantástico, que tive o prazer de conhecer e passar a admirar cada vez mais. À Letícia, por ter tornado essa caminhada muito mais leve e agradável, sendo uma pessoa especial que levarei sempre comigo.

Aos alunos da professora Luzimar, em especial Michel e Hugo, por todo auxílio.

Aos técnicos e terceirizados que, com seu trabalho, permitem o funcionamento de todas os setores, mesmo nos momentos mais corridos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural (BIOCEL), ao Instituto Federal do Espírito Santo e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte durante toda essa jornada.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO GERAL

MARINATO, Claudio Sergio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Avaliação da toxicidade de elementos metálicos no metabolismo de *Cassia grandis* L. (Fabaceae).** Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Áreas impactadas por rejeitos de mineração, apresentam-se contaminadas por misturas complexas de elementos metálicos, que podem reduzir a eficiência dos processos de fitorremediação. Este trabalho avaliou os efeitos da combinação de elementos metálicos sobre diferentes fases de desenvolvimento da espécie arbórea *Cassia grandis*. Sementes e mudas foram expostas aos elementos metálicos ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As). A taxa de germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG), as concentrações de elementos minerais, de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de malondialdeído (MDA), a atividade enzimática antioxidante, as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila, as concentrações de pigmentos e alterações nos tecidos foram analisadas. A combinação dos elementos metálicos não afetou a porcentagem de germinação, mas o IVG foi superior ao controle. A combinação de elementos metálicos promoveu efeitos sinérgicos e antagônicos sobre a absorção dos diferentes elementos, estimulando a produção de antocianinas e a atividade de enzimas antioxidantes. A presença de As, isolado e em mistura com os outros elementos metálicos promoveu a inibição da fotossíntese e aumento das concentrações de MDA, denotando incremento da peroxidação lipídica e danos aos tecidos. Nas plantas expostas a elementos metálicos sem a presença de As ocorreu incremento do sistema antioxidante que minimizou os danos antioxidantes.

Palavras-chave: Fitoestabilização. Metais pesados. Mineração. Tolerância.

GENERAL ABSTRACT

MARINATO, Claudio Sergio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2021. **Toxicity evaluation of metallic elements in the metabolism of *Cassia grandis* L. (Fabaceae).** Advisor: Juraci Alves de Oliveira.

Areas impacted by mining tailings, are contaminated by complex mixtures of metallic elements, which can reduce the efficiency of phytoremediation processes. This work evaluated the combine effects of metallic elements on different stages of development of the tree species *Cassia grandis*. Seeds and seedlings were exposed to the metallic elements iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), lead (Pb), cadmium (Cd) and arsenic (As). The germination rate, the germination speed index (GSI), the concentrations of mineral elements, hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA), the antioxidant enzymatic activity, gas exchange, chlorophyll fluorescence, peppers and tissue changes were analyzed. The combination of the metallic elements did not affect the germination percentage, but the GSI was superior to the control. The combination of metallic elements promoted synergistic and antagonistic effects on the absorption of different elements, stimulating the production of anthocyanins and the activity of antioxidant enzymes. The presence of As, alone and in mixture with the other metallic elements, promoted the inhibition of photosynthesis and increased MDA concentrations, denoting an increase in lipid peroxidation and tissue damage. In plants exposed to metallic elements without the presence of As, an increase in the antioxidant system occurred, which minimized the antioxidant damage.

Keywords: Heavy metals. Mining. Phytostabilization. Tolerance.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	9
Capítulo 1: A germinação de sementes de <i>Cassia grandis</i> L. é afetada pelos elementos metálicos presentes em rejeitos de mineração?.....	11
RESUMO.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
Material vegetal.....	14
Teste de Germinação.....	14
Determinação de porcentagem e índice de velocidade de germinação (IVG)	15
Teste com embriões	15
Determinação da concentração de elementos minerais	15
Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	16
Determinação de peroxidação lipídica.....	16
Determinação da atividade enzimática antioxidante.....	17
Extração das enzimas	17
Atividade da superóxido dismutase (SOD)	17
Atividade da catalase (CAT)	17
Atividade das peroxidases (POX)	18
Atividade da peroxidase do ascorbato (APX)	18
Delineamento experimental e análise estatística	18
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO.....	22
CONCLUSÕES.....	25
REFERÊNCIAS.....	26
Capítulo 2: A espécie arbórea <i>Cassia grandis</i> L. é tolerante à ação conjunta de elementos metálicos?	33
RESUMO.....	33
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
Material vegetal.....	36
Condições experimentais	36

Determinação da concentração de elementos minerais	37
Determinação de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a e fotorrespiração	37
Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos e antocianinas	38
Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes	39
Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	40
Determinação da peroxidação lipídica.....	40
Análise anatômica	40
Delineamento experimental e análise estatística	41
RESULTADOS	42
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS	56
Capítulo 3: Toxicidade de elementos metálicos e arsênio em <i>Cassia grandis</i> L.: espécie arbórea com potencial para fitorremediação	63
RESUMO.....	63
INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
Material vegetal.....	66
Condições experimentais	66
Determinação da concentração de elementos minerais	67
Determinação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	67
Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos e antocianina	68
Determinação da peroxidação lipídica.....	69
Avaliação das atividades enzimáticas antioxidativas.....	69
Delineamento experimental e análise estatística	70
RESULTADOS	71
DISCUSSÃO.....	79
CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS	84
CONCLUSÃO GERAL.....	91
REFERÊNCIAS	92

INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação dos ecossistemas por elementos metálicos, decorrente do descarte inadequado de resíduos, oriundos de atividades domésticas, industriais e de mineração, é um grave problema ambiental. Como esses elementos não se degradam e tendem a ser incorporados nas cadeias alimentares, esses contaminantes colocam em risco diversas espécies, pois contaminam as cadeias tróficas, chegando a áreas de produção agrícola e cursos d'água, colocando em risco a população localizada no entorno dessas áreas e a saúde humana (Ali et al. 2013, Emamverdian et al. 2015, Singh et al. 2016).

Para remediar e recuperar as áreas contaminadas, diversos métodos têm sido propostos, entre elas a fitorremediação, na qual plantas são utilizadas para recuperar ou estabilizar uma área contaminada, por apresentarem relativa facilidade de implementação e custos mais baixos (Tanguhu et al. 2011).

No entanto, para uma maior eficiência no processo de fitorremediação, os efeitos dos elementos metálicos sobre os vegetais devem ser bem conhecidos, pois a exposição a esses elementos pode levar a danos aos tecidos. Algumas espécies de plantas, no entanto, possuem mecanismos de tolerância, que as capacitam a se desenvolverem em áreas contaminadas, por meio de processos que podem impedir a absorção do contaminante ou, uma vez absorvido, ter seus efeitos minimizados, por meio da ativação de sistemas de imobilização, sequestro no vacúolo ou metabolismo antioxidativo (Abercrombie et al. 2008, Sinha et al. 2018).

Em ambientes contaminados, normalmente os elementos metálicos não se encontram isolados, mas em associações de diferentes metais (Wong 2003, Thompson et al. 2020, Buch et al. 2021), os quais podem promover efeitos sinérgicos ou antagônicos dos mesmos sobre os vegetais (Aihemaiti et al. 2018). Apesar disso, a maioria das pesquisas realizadas envolvem o estudo de apenas um único elemento (Ghori et al. 2019), o que restringe a aplicabilidade destes estudos em processos de fitorremediação.

Esse problema se torna ainda maior quando se relaciona às respostas da ontogenia das plantas com metais pesados, pois a morfologia e o desenvolvimento vegetal são processos regulados por grande número de fatores, cuja modulação é dependente de fatores endógenos e ambientais, o que torna tais processos suscetíveis aos diferentes tipos de estresses, incluindo os causados por metais pesados (Wu et al. 2003). Comumente, os estudos são realizados em plantas de uma determinada idade ou tamanho, o que torna os resultados experimentais difíceis de serem reproduzidos em condições de campo, pois tem sido demonstrado, para outras

restrições ambientais, que a fisiologia de resistência ao estresse varia de acordo com a evolução fenológica da planta (Lutts et al. 1995).

Para utilização em processos de fitorremediação de elementos metálicos normalmente são selecionadas plantas hiperacumuladoras, sendo que a maioria dessas plantas estudadas são herbáceas e, embora possam acumular metais pesados em grandes concentrações em suas partes aéreas, a quantidade é limitada devido à baixa produção total de biomassa nessas plantas, comparadas com espécies arbóreas (Luo et al. 2016).

O acúmulo de poluente nas raízes de espécie arbórea pode não ser um fator limitante, uma vez que no indivíduo adulto, a proporção de tecidos da parte aérea é muito maior do que a de raízes. Dessa forma, mesmo plantas lenhosas não hiperacumuladoras possuem potencial para fitoestabilização ou extração de elementos metálicos em sítios contaminados, devido às suas características, como profundo sistema radicular e elevada produção de biomassa (Yadav et al. 2010, Marmiroli et al. 2011).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da combinação de elementos metálicos sobre diferentes fases de desenvolvimento da espécie arbórea *Cassia grandis* L. para estabelecer o potencial dessa espécie com finalidade de reabilitação de solos contaminados por elementos metálicos.

Capítulo 1: A germinação de sementes de *Cassia grandis* L. é afetada pelos elementos metálicos presentes em rejeitos de mineração?

RESUMO

Elementos metálicos, encontrados em áreas contaminadas, podem afetar a germinação de sementes reduzindo a eficiência da fitorremediação. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos conjuntos de elementos metálicos sobre sementes de *Cassia grandis* L. Sementes foram germinadas e embriões foram mantidos por 72 horas, em soluções contendo misturas de elementos metálicos em duas concentrações diferentes (T_1 e T_2). A porcentagem e velocidade da germinação das sementes, o aumento de tamanho, as concentrações de metais, nutrientes, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) bem como a atividade de enzimas antioxidativas nos embriões, foram avaliados. A porcentagem de germinação não foi afetada, mas o índice de velocidade (IVG) foi superior ao controle. As concentrações de Fe, Mg e Pi não diferiram do controle. As concentrações de Mn aumentaram e de Zn diminuíram com o aumento da concentração das soluções. As concentrações de Pb nos embriões expostos a T_2 foram 22 vezes maiores do que em T_1 . Foi detectado As apenas nos embriões expostos a T_1 , enquanto Cd não foi detectado. As concentrações de Ca aumentaram e os de K diminuíram em T_2 . A exposição às maiores concentrações promoveu redução da área dos embriões. As concentrações de H_2O_2 e MDA aumentaram, respectivamente, em T_1 e T_2 . A atividade da superóxido dismutase (SOD) não diferiu do controle. A atividade da POX diminuiu e da CAT aumentou com o aumento da concentração. A atividade da APX aumentou em T_1 . O aumento da velocidade de germinação foi afetada pela degradação dos tegumentos da semente em função do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). A absorção de Fe foi inibida pela interação com outros elementos, como o Mn. Os resultados de H_2O_2 e MDA indicam que os embriões que estavam submetidos a menores concentrações de metais em T_1 . A redução da atividade da POX e o aumento CAT indica maior importância desta última na defesa antioxidativa. atuou para proteger contra danos oxidativos.

Palavras chaves: Fitorremediação. Germinação. Metais pesados.

INTRODUÇÃO

Atividades industriais e de mineração, entre outras, liberam inúmeros contaminantes nos ecossistemas, entre os quais elementos metálicos que, por não serem biodegradáveis, tendem a se acumular no ambiente, contaminando plantas e animais, e colocando em risco a saúde humana (Singh et al. 2016, Ashraf et al. 2019).

Os impactos recorrentes e persistentes destes contaminantes nos ambientes podem ser minimizados por diferentes métodos, dentre os quais a fitorremediação, que se destaca pela relativa facilidade de implementação e menores custos (Ali et al. 2013, Awa & Hadibarata 2020). Porém, as plantas a serem utilizadas nestes processos devem possuir características específicas, como tolerância a contaminantes, capacidade de acumulação, propagação fácil e rápida, ampla distribuição, extenso sistema radicular e alto ganho de biomassa (Xia & Ma 2006).

As plantas introduzidas em áreas contaminadas por elementos metálicos, podem apresentar danos bioquímicos, fisiológicos e estruturais decorrentes da toxicidade de alguns desses contaminantes (Adrees et al. 2015, Ghori et al. 2019). Algumas espécies, no entanto, possuem mecanismos de tolerância baseados em processos de ativação de sistemas de imobilização, sequestro no vacúolo ou metabolismo antioxidante (Abercrombie et al. 2008). Esses mecanismos de tolerância, no entanto, podem ser influenciados por diversos fatores, como o estágio de desenvolvimento do vegetal, especialmente o processo de germinação, o qual, geralmente, é mais sensível ao estresse induzido por esses elementos (Seneviratne et al. 2019) do que o estágio vegetativo (Niinemets 2010).

Em áreas contaminadas por resíduos de mineração, os elementos metálicos encontram-se em misturas com diferentes concentrações e, raramente em formas isoladas (Buch et al. 2021). No entanto, a maioria das pesquisas envolvendo a ação desses elementos sobre espécies vegetais envolve o estudo de um único elemento (Ghori et al. 2019), em parte devido às dificuldades na avaliação dos danos biológicos resultantes da ação conjunta desses contaminantes. Além disso, a interação de diferentes elementos metálicos pode influenciar sua disponibilidade, velocidade de absorção e efeitos nos tecidos vegetais devido à promoção de efeitos sinérgicos ou antagônicos (Cherif et al. 2011, Gharaibeh et al. 2015, Aihemaiti et al. 2018).

A espécie arbórea *Cassia grandis* L. possui potencial de fitorremediação, apresentando capacidade de fixação de nitrogênio e crescimento em solos com baixa fertilidade, já tendo

demonstrado potencial para revegetação de áreas contaminadas por resíduos de mineração (Guimarães et al. 2017, Matos et al. 2020).

Dessa forma, este trabalho buscou avaliar os efeitos combinados de elementos metálicos, presentes em rejeito de mineração de ferro, sobre a germinação de sementes de *C. grandis*, buscando determinar o potencial efeito inibitório desses elementos no processo inicial de estabelecimento de plantas em áreas contaminadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes de *C. grandis*, adquiridas junto à Sociedade de Investigações Florestais (SIF/UFV), foram submetidas ao processo de quebra de dormência por imersão em ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 95%), por 15 minutos, seguida de lavagem em água desionizada, previamente ao início dos tratamentos no experimento. Inicialmente foi realizado o teste de viabilidade com tetrazólio (Porter et al. 1947), onde 100 sementes foram embebidas em água destilada por 24 horas, seguida de imersão em solução de tetrazólio (0,05%), no escuro, a 30°C, por 8 horas, lavadas com água destilada e analisadas. As sementes coradas pelo tetrazólio foram consideradas viáveis e as coradas parcialmente ou não coradas inviáveis.

Teste de Germinação

As sementes, com quebra de dormência previamente realizada, foram acondicionadas em caixas plásticas transparentes (10x18x4cm), contendo duas camadas de papel de germinação embebido com solução de Clark modificada, pH 6,5, contendo (mM): Ca (2,6), K (1,8), Mg (0,6), NH_4N (0,9), NO_3N (6,9), S (0,6), P (0,069), Mn (0,007), B (0,019), Zn (0,002), Mo (0,0006), Cu (0,0005) e Fe (0,038) na forma de ferro sódico (Fe^{3+}) ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os tratamentos consistiram, além do controle (apenas solução nutritiva), de duas composições de elementos metálicos (Tabela 1). As sementes foram mantidas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C, $230 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), sob fotoperíodo de 12 horas.

Tabela 1: Tratamentos e concentrações de elementos metálicos utilizados para análise de germinação de sementes de *C. grandis*

Tratamentos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Controle	Solução nutritiva (SN)
T ₁	SN + Fe (20), Mn (20), Zn (4), Pb (1,5), Cd (1,5) e As (1,5)
T ₂	SN + Fe (300), Mn (300), Zn (20), Pb (20), Cd (3) e As (3)

Formas químicas dos elementos: Fe (FeEDTA), Mn ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Zn ($\text{Zn}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Pb ($(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Cd ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e As ($\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Para definição dos elementos metálicos e concentrações utilizados nas soluções dos tratamentos T₁ e T₂, utilizou-se como base, dados referentes aos rejeitos provenientes do rompimento da Barragem de Fundão, que ocorreu em 2015, no município de Mariana, Minas

Gerais, Brasil. O rompimento dessa barragem liberou cerca de 50 milhões de m³ de rejeitos de mineração de ferro que se misturaram a outros rejeitos já presentes no leito dos rios. Para este trabalho considerou-se a biodisponibilidade atual e potencial dos diferentes elementos metálicos nas regiões afetadas (Renova 2019, Coelho et al. 2020, Orlando et al. 2020, Duarte et al. 2021).

Determinação de porcentagem e índice de velocidade de germinação (IVG)

O número de sementes germinadas foi registrado, diariamente, num período de 21 dias, sendo consideradas sementes germinadas aquelas com emissão de radícula de, aproximadamente, 1 mm. Após esse período não foram observadas novas emissões de radículas e, as sementes não germinadas, foram classificadas como dormentes ou deterioradas.

A partir dos dados de germinação obtidos, foram calculados a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG), sendo este índice estimado pela fórmula proposta por Maguire (1962).

$$IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$$

Onde:

$G_1, G_2 \dots G_n$ = número de sementes germinadas a cada dia

$N_1, N_2 \dots N_n$ = número de dias da semeadura

Teste com embriões

Sementes de *C. grandis*, com quebra de dormência previamente realizada, foram imersas em água destilada por 24 horas. Os embriões foram retirados, distribuídos em placas de Petri de poliestireno (130 mm) contendo duas folhas de papel de germinação, umedecidas com 3 mL das soluções utilizadas nos tratamentos (Tabela 1). As placas foram mantidas em incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h, por 72 h. Após esse período, os embriões foram fotografados e as imagens processadas com software ImageJ[®], sendo o resultado expresso em cm². Amostras foram utilizadas para determinação da concentração de elementos minerais, da concentração de peróxido de hidrogênio, da atividade enzimática e da peroxidação lipídica.

Determinação da concentração de elementos minerais

Para determinação da concentração de elementos minerais, embriões foram lavados com água destilada e secos em estufa a 80°C até peso constante. Aproximadamente 50 mg da massa

seca foram triturados e submetidos à mineralização com 1,5 mL de mistura nítrico-perclórica (2:1), à temperatura de 130 °C, até a completa oxidação da matéria orgânica (Marin et al. 1993). As amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 15 mL com água desionizada e, então, analisadas por espectrometria de emissão atômica, no caso do potássio (K), e por espectrometria de absorção atômica, para ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), em espectrofotômetro de absorção atômica (Modelo AA-6701F, Shimadzu). Para a determinação de arsênio (As) foi utilizado gerador de vapor de hidretos (HVG-1 Shimadzu). As concentrações de fosfato inorgânico (Pi) foram determinados pelo método do fosfomolibdato (Lindeman 1958).

Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para a análise da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), os embriões foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -85 °C. Amostras de 200 mg de embriões congelados foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração, o homogenato foi centrifugado a 10.000 g, por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado (Kuo & Kao 2003). Alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação com 100 µM de FeNH₄(SO₄), 25 mM de ácido sulfúrico, 250 µM de laranja de xilenol e 100 mM de sorbitol, num volume final de 2 mL (Gay & Gebicki 2000). As amostras foram mantidas no escuro, por 30 min, e a absorbância determinada a 560 nm. Brancos de cor dos reagentes e extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. As concentrações de H₂O₂ nas amostras foram estimados com base na curva de calibração preparada com padrões de H₂O₂ e expressos em µmol g⁻¹ MF.

Determinação de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Amostras de 200 mg de embriões congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -85 °C, foram homogeneizados em 5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), centrifugados a 12.000 g, por 15 min, e o sobrenadante (500 µL) foi adicionado a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,5%), em 20% (p/v) TCA. A mistura foi incubada a 95 °C durante 30 min, seguida de banho de gelo por 10 min, centrifugada a 10.000 g, por 5 min, e a absorbância do sobrenadante lida a 600, 532 e 400 nm. O valor para absorção não específica, a 600 nm e 400 nm, foi subtraído. A concentração do complexo

TBARS-TBA foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 532 nm), subtraindo-se o valor da absorvância não-específica (600 e 400 nm) (Hodges et al. 1999).

Determinação da atividade enzimática antioxidante

Extração das enzimas

Os extratos enzimáticos brutos, obtidos a partir de amostras de embriões congelados em nitrogênio líquido e liofilizados, foram utilizados para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POX) e ascorbato peroxidase (APX). Amostras de 300 mg de embriões (peso fresco) foram macerados em nitrogênio líquido, seguido da adição de 2 mL de meio de extração, composto por tampão de fosfato de potássio 0,1 M pH 6,8, ácido etilenodiaminotetraacético 0,1 mM (EDTA), fluoreto fenilmetilsulfônico 1 mM (PMSF) e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p / v), seguido de filtração e centrifugação a 12.000 g, por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas.

A concentração de proteínas foi determinada por meio do método de Bradford, utilizando a albumina do soro bovino (BSA) como padrão para expressar a atividade enzimática (Waterborg & Matthews 1984).

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade SOD foi determinada pela adição de 50 μL de extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação consistindo em tampão de fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 contendo 13 mM de metionina, azul p-nitro de tetrazólio (NBT) 75 μM , 0,1 mM de EDTA e 2 μM riboflavina. A reação foi conduzida, a 25 °C, em câmara de reação sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 min, a iluminação foi interrompida e o azul de formazana, produzido por fotorredução NBT, foi quantificado por espectrofotometria, no comprimento de onda de 560 nm. A absorvância do meio de reação, mantido no escuro pelo mesmo período, serviu como branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis & Ries 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução de NBT em 50% (Beauchamp & Fridovich 1971).

Atividade da catalase (CAT)

A atividade CAT foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, e H_2O_2

12,5 mM (Havir & Mchale 1987). A diminuição da absorvância em 240 nm, a 25 °C, foi medida durante o primeiro minuto de reação, com a atividade CAT determinada com base na inclinação da linha na faixa de 0,4 a 0,8 min após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al. 1995) e expressa em μmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Atividade das peroxidases (POX)

A atividade das POXs foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação consistindo de tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalo 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar & Mishra 1976). O aumento na absorvância a 420 nm a 25 °C foi medido durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina, e a atividade POX foi determinada com base na inclinação da inclinação na faixa de 0,4 a 0,8 min após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Maehley & Chance 1955) e expressa em μmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Atividade da peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade APX foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação consistindo em tampão de fosfato de potássio 50 mM pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM (Nakano & Asada 1981, modificado por Koshiba 1993). A diminuição da absorvância a 290 nm a 25 °C foi medida durante o primeiro minuto de reação, e a atividade de APX foi determinada com base na inclinação da linha no intervalo de 0,4 a 0,8 minuto após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano & Asada 1981) e expressa em μmol de ácido ascórbico (AA) min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delienamento inteiramente casualizado, compostos de 3 tratamentos e 7 repetições, sendo cada unidade experimental constituída de 20 sementes/embriões. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido por teste de médias de Tukey (p < 0.05), utilizando-se o programa R (R.CORE TEAM).

RESULTADOS

As sementes de *C. grandis*, utilizadas no experimento, apresentaram 90% de viabilidade no teste de tetrazólio. Após 8 dias de exposição aos tratamentos foram observadas as primeiras sementes germinadas, caracterizadas pela protrusão radicular. A exposição aos elementos metálicos não alterou a porcentagem de germinação das sementes, porém, alterou positivamente o índice de velocidade de germinação (IVG), sendo maior quando comparadas ao controle (Figura 1).

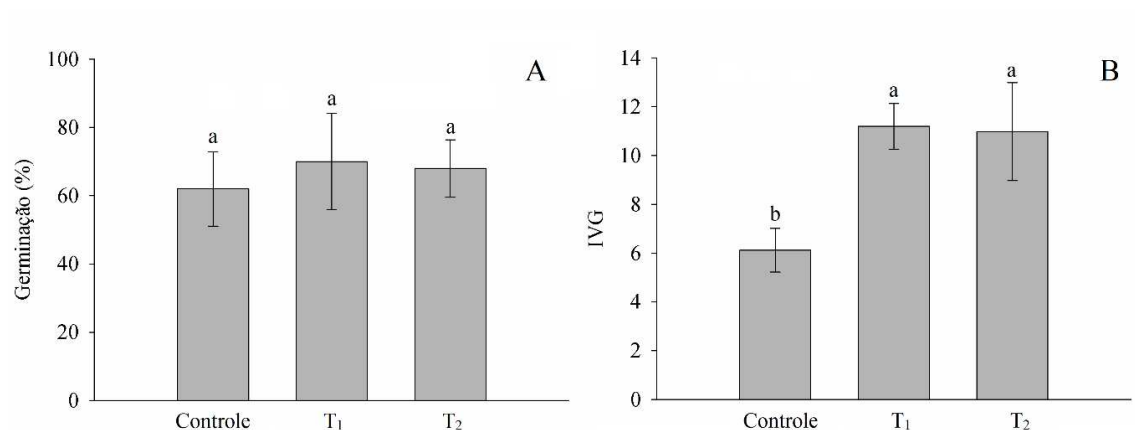


Figura 1: Porcentagem de germinação (A) e índice de velocidade de germinação - IVG (B) de sementes de *C. grandis* mantidas em solução nutritiva (Controle) e em solução nutritiva contendo elementos metálicos (T₁ e T₂). Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes a 5% de probabilidade.

Embriões extraídos de sementes de *C. grandis* e submetidos aos tratamentos por 72 horas apresentaram menor expansão da área quando expostos às maiores concentrações de elementos metálicos, representado pelo tratamento T₂ (Figura 2).

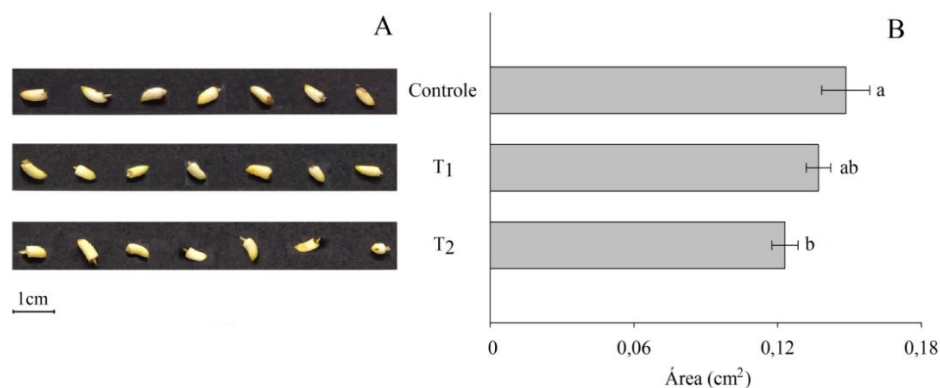


Figura 2: Aspecto visual (A) e área média (B) de embriões de *C. grandis* mantidos por 72 horas em solução nutritiva (Controle) e em solução nutritiva contendo elementos metálicos (T₁ e T₂). Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes a 5% de probabilidade.

Observa-se que as concentrações dos elementos minerais essenciais K, Ca, Mg e Pi tiveram pequenas alterações nos embriões expostos aos diferentes tratamentos, destacando-se apenas a redução nas concentrações de K no tratamento T₂ e de Ca em T₁ e T₂. Além disso, observou-se que as concentrações de Fe nos embriões, mesmo presente em elevadas concentrações nas soluções de T₁ e T₂, não diferiram em relação ao controle. As concentrações de Zn nos embriões, por sua vez, contrariamente aos acréscimos das concentrações nos tratamentos T₁ e T₂, tiveram reduções em ambos os tratamentos, comparados com o controle. Acréscimos significativos foram observados nas concentrações de Mn, os quais foram similares aos incrementos nos tratamentos T₁ e T₂. As concentrações de Pb nos embriões tiveram as maiores alterações com o aumento das concentrações nos tratamentos, sendo cerca de 22 vezes maiores em T₂ do que em T₁. Alterações nas concentrações de Cd nos embriões entre os tratamentos T₁ e T₂ não foram observadas, embora tenha ocorrido significativo acúmulo, diferente do As, cuja detecção só foi possível no T₁ (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração de elementos minerais em embriões de *C. grandis*, mantidos por 72 horas em solução nutritiva (Controle) e em solução nutritiva contendo elementos metálicos (T₁ e T₂)

($\mu\text{g g}^{-1}$ de MS)	Controle	T ₁	T ₂
Fe	134,40 ± 11,93 a	128,10 ± 16,95 a	136,59 ± 18,20 a
Mn	33,90 ± 4,32 c	102,77 ± 9,21 b	1.242,85 ± 107,72 a
Zn	102,83 ± 11,81 a	73,75 ± 7,52 b	70,36 ± 7,45 b
Pb	ND	0,61 ± 0,11 b	13,41 ± 1,21 a
Cd	ND	11,86 ± 2,32 a	13,31 ± 0,82 a
As	ND	1,04 ± 0,17 a	ND
(mg g^{-1} de MS)	Controle	T ₁	T ₂
K	14,34 ± 0,52 a	14,22 ± 0,71 a	11,45 ± 1,60 b
Ca	8,74 ± 0,90 b	11,60 ± 1,21 a	11,93 ± 1,29 a
Mg	6,85 ± 1,11 a	6,39 ± 0,71 a	6,22 ± 0,37 a
Pi	18,40 ± 1,65 a	21,46 ± 2,00 a	21,29 ± 2,22 a

Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não foram significativamente diferentes a 5% de probabilidade.

A exposição dos embriões aos elementos metálicos nos tratamentos T₁ e T₂ promoveu elevação das concentrações de H₂O₂ apenas em T₁, assim como na atividade da enzima APX, enquanto os danos às membranas, medidos por meio da análise de MDA, ocorreu apenas em T₂. Observa-se que esses danos observados no T₂, mesmo com o aumento na atividade das enzimas SOD e CAT, não puderam ser evitados. Em parte, isso pode ser devido à redução na atividade da POX nesse tratamento. A preservação da integridade das membranas dos embriões no tratamento T₁ pode ser considerada a partir da constatação da ativação das enzimas SOD, CAT e APX, com incrementos significativos na atividade antioxidante (Figura 3).

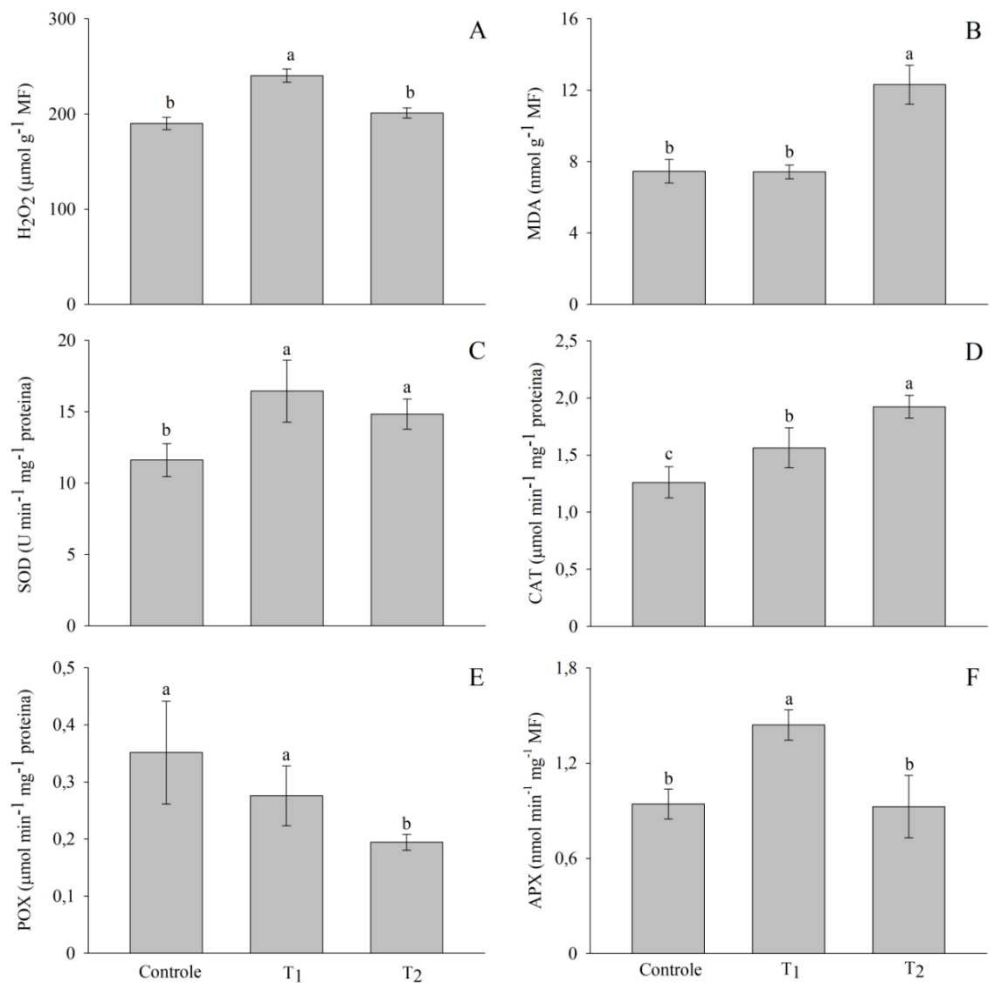


Figura 3: Concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (A), malondialdeído (MDA) (B), dismutase do superóxido (SOD) (C), catalase (CAT) (D), peroxidases (POX) (E) e APX (F) em embriões de *C. grandis* mantidos por 72 horas em solução nutritiva (Controle) e em solução nutritiva contendo elementos metálicos (T₁ e T₂). Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Contaminantes presentes em solos contaminados por rejeitos de mineração, podem afetar as plantas nos diferentes estágios de desenvolvimento, desde a germinação até indivíduo adulto. Os elementos metálicos podem causar danos diretos ou indiretos, por meio do desequilíbrio no balanço de espécies reativas de oxigênio (EROs) e alteração na atividade hormonal, respiração e fotossíntese (Silveira et al. 2015, Shao et al. 2017).

O processo de germinação é determinante no estabelecimento inicial da vegetação em áreas contaminadas, o qual pode ser influenciado por diferentes elementos metálicos, isolados ou em conjunto. Esses elementos, como o chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As), tem comprovada capacidade de reduzir a taxa germinativa em várias espécies vegetais, como *Oryza sativa*, *Daucus carota*, *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* e *Solanum lycopersicum* (He et al. 2014, Baruah et al. 2019, Paul et al. 2020). Essa inibição ocorre geralmente por estresse oxidativo, que afeta a cadeia de eventos do metabolismo germinativo (Mihoub et al. 2005).

Espécies vegetais tolerantes a elementos metálicos, por sua vez, apresentam poucos efeitos inibitórios sobre a germinação e desenvolvimento inicial (Silva et al. 2017). Dessa forma, o resultado observado na porcentagem de germinação nas sementes *C. grandis*, expostas aos tratamentos com metais, permite inferir a existência de mecanismos de tolerância desta espécie a esse tipo de estresse na germinação.

Não inibir a germinação não significa, no entanto, que o metabolismo e o desenvolvimento da planta não serão afetados. Elementos metálicos, podem promover danos às membranas celulares e influenciar na absorção de água pelos tecidos vegetais (Rucińska-Sobkowiak 2016), fato esse que pode ter influenciado no menor aumento de área nos embriões expostos às maiores concentrações desses elementos quando comparados com o controle.

Sementes de *C. grandis* se caracterizam por apresentar tegumento espesso e impermeável, o que restringe a difusão de água para o embrião e, em consequência, mantém a dormência (Rodrigues-Junior et al. 2020), caracterizada pela baixa atividade metabólica do embrião. A escarificação química, por meio da imersão das sementes em ácido sulfúrico, causou a degradação do tegumento e resultou na absorção mais rápida de água e, consequentemente, aceleração da germinação. Com a embebição observa-se rápida elevação da atividade metabólica (Rajjou et al. 2012) que está, em parte, associada ao aumento na produção de EROs (Mhamdi & Van Breusegem 2018). Dessa forma, fatores estressantes, como exposição a

elevadas concentrações de elementos metálicos, ao intensificarem a produção de EROs, podem promover a aceleração do processo germinativo.

A participação de EROs no processo germinativo se dá, também, pela alteração hormonal, por meio da sinalização para produção de ácido abscísico (ABA) e giberelinas (Kwak et al. 2006), e do estímulo à produção de enzimas e poliaminas que atuam na degradação do tegumento da semente (Bailly 2004).

Os elementos possuem interações entre si que podem afetar a absorção e acúmulo nos tecidos, como relatado na literatura para os elementos Fe, Zn e Mn (Soltan et al. 2019, Ding et al. 2020). Resultado dessas interações, constatou-se que as elevadas concentrações de manganês (Mn) nos embriões inibiram a absorção de Fe e Zn (Velooso et al. 1995, El-Jaoual & Cox 1998), como também, a presença de Fe e Mn no meio inibiu a absorção de As (Deschamps et al. 2003, Maguffin et al. 2020).

Ademais, elevadas concentrações de elementos metálicos nos tecidos, como foi observado com Mn nos embriões expostos aos elementos metálicos, podem induzir alterações nas membranas, afetando transportadores e canais iônicos, como a classe de transportadores de membrana da família ZIP, os quais estão envolvidos na captação e transporte de Zn (Ajeesh Krishna et al. 2020). Isso pode levar a desequilíbrio nas concentrações de nutrientes, como observado nas concentrações de Zn, em função do aumento da permeabilidade não-específica, em plantas submetidas a concentrações tóxicas de metais (Cambrollé et al. 2015).

Os mecanismos de absorção de elementos minerais pelo embrião permanecem, ainda, com muitas lacunas do conhecimento, em especial os relacionados com os mecanismos de transporte de Mn (Shao et al. 2017), o que dificulta, por exemplo, explicar o elevado acúmulo desse elemento observado na presente pesquisa. No entanto, as concentrações de Mn que promovem toxidez em plantas variam bastante conforme a espécie (Millaleo et al. 2010), como em *Oryza sativa*, que pode tolerar até 5000 mg⁻¹ kg de massa seca, sem sintomas de toxicidade (Vlamiš & Williams 1964).

Concomitante ao aumento nas concentrações de elementos metálicos nos tecidos, o desequilíbrio na geração de EROs pode ser minimizado pela atuação do sistema antioxidante, especialmente as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POXs) e peroxidase do ascorbato (APX) (Yusefi-Tanha et al. 2020). O aumento na atividade da SOD nos embriões expostos aos tratamentos com elementos metálicos está relacionado com essa proteção antioxidante, já que o mesmo promove a conversão do radical superóxido (O₂^{•-}) em O₂ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Ahmad et al. 2008). O H₂O₂, no entanto, é tóxico às

células e requer a participação de outras enzimas para a sua remoção, como a CAT e POXs (Willekens et al. 1997). Essas enzimas podem atuar simultaneamente e cooperativamente, de tal modo que a redução da atividade da POXs e o aumento da CAT, nos embriões expostos aos tratamentos T₁ e T₂, indica maior participação dessa última na remoção do H₂O₂.

A APX é outra enzima que atua na remoção do H₂O₂, nesse caso, utilizando ácido ascórbico como redutor (Srivastava et al. 2005, Ahmad et al. 2008). Dessa forma, o incremento da atividade dessa enzima nas plantas expostas ao T₁ indica a participação dessa enzima na defesa antioxidante dos embriões. No entanto, a atividade não diferiu do controle nos embriões expostos ao tratamento T₂, mesmo contendo concentração maior de elementos metálicos, o que pode indicar que essas concentrações inibiram a atividade desta enzima.

A medição de MDA, por sua vez, é um eficiente indicativo de peroxidação lipídica e perda da integridade das membranas celulares (Aguiar-Silva et al. 2016). Dessa forma, o aumento das concentrações de MDA nos embriões expostos as maiores concentrações de elementos metálicos, do tratamentos T₂, indicam que essas concentrações promoveram danos aos tecidos dos embriões, o que por sua vez explica a redução da atividade da APX, uma vez que o estresse superou os mecanismos antioxidativos que reduziriam esses danos.

CONCLUSÕES

Os resultados revelaram que a espécie *C. grandis* apresenta mecanismos de defesa que a capacitam a germinar em ambientes contaminados por rejeitos de mineração de ferro contendo mistura de elementos metálicos. Um desses mecanismos se relaciona com a atividade das enzimas SOD, CAT e APX, envolvidas com o metabolismo antioxidante.

No entanto, o aumento da peroxidação lipídica observado durante exposição à mistura com maiores concentrações de elementos metálicos, implica em limitações da utilização de *C. grandis*, em ambientes contaminados por esses elementos combinados em concentrações elevadas.

REFERÊNCIAS

- Abercrombie J., Halfhill M.D., Ranjan P., Rao M.R., Saxton A.M., Yuan J.S., Stewart Jr. C.N. (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) Stress. *BMC Plant Biology*, 8:87. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-87>
- Adrees M., Ali S., Rizwan M., Ibrahim M., Abbas F., Farid M., Zia-ur-Rehman M., Irshad M. K., Bharwana S.A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11):8148-8162. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>
- Aguiar-Silva C., Brandão S.E., Domingos M., Bulbovas P. (2016) Antioxidant responses of Atlantic Forest native tree species as indicators of increasing tolerance to oxidative stress when they are exposed to air pollutants and seasonal tropical climate. *Ecological Indicators*, 63:154-164. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.11.060>
- Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51: 167-173. <https://doi.org/10.1007/BF03030694>
- Aihemaiti A., Jianga J., Li D., Liu N., Yang M., Meng Y., Zou Q. (2018) The interactions of metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *Journal of Environmental Management*, 222:216-226. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.081>
- Ajeesh Krishna T. P., Maharajan T., Victor Roch G., Ignacimuthu S., Antony Ceasar S. (2020). Structure, Function, Regulation and Phylogenetic Relationship of ZIP Family Transporters of Plants. *Frontiers in plant science*, 11:662. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00662>
- Ali H., Khan E., Sajad M.A. (2013) Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91:869-881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Anderson M.D., Prasad T.K., Stewart C.R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109(4):1247-1257. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247>
- Ashraf S., Ali Q., Zahir Z.A., Ashraf S., Asghar H.N. (2019) Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174:714-727. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.068>

- Awa S.H., Hadibarata T. (2020) Removal of Heavy Metals in Contaminated Soil by Phytoremediation Mechanism: a Review. *Water Air Soil Pollut*, 231:47. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-4426-0>
- Bailly C. (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14(2):93-107. <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>
- Baruah N., Mondal S.C., Farooq M., Gogoi N. (2019) Influence of Heavy Metals on Seed Germination and Seedling Growth of Wheat, Pea, and Tomato. *Water Air Soil Pollut*, 230:273. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4329-0>
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44:276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Buch A.C., Niemeyer J.C., Marques E.D., Silva-Filho E.V. (2021) Ecological risk assessment of trace metals in soils affected by mine tailings. *Journal of Hazardous Materials*, 403:123852, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123852>
- Cambrollé J., GarcíaJ.L., Figueroa M.E., Cantos M., (2015) Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. *Chemosphere*, 120:171-178. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.044>
- Cherif J., Mediouni C., Ben Ammar W., Jemal F. (2011) Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Environmental Sciences*, 23(5):837-844. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(10\)60415-9](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(10)60415-9)
- Coelho D.G., Marinato C.S., Matos L.P., Andrade V.M., Neves P.H.S., Oliveira J.A. (2020) Evaluation of Metals in Soil and Tissues of Economic-Interest Plants Grown in Sites Affected by the Fundão Dam Failure in Mariana, Brazil. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5):596-607. <https://doi.org/10.1002/ieam.4253>
- Deschamps E., Ciminelli V.S.T., Weidler P.G., Ramos A.Y. Arsenic sorption onto soils enriched in Mn and Fe minerals. *Clays and Clay Minerals*, 51(2):197-204. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2003.0510210>
- Ding W., Clode P.L., Lambers H. (2020) Effects of pH and bicarbonate on the nutrient status and growth of three *Lupinus* species. *Plant Soil*, 447:9-28. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03980-8>
- Duarte E.B., Neves M.A., Oliveira F.B., Martins M.E., Oliveira C.H.R., Burak D.L., Orlando M.T.D., Rangel C.V.G.T. (2021) Trace metals in Rio Doce sediments before and after the

- collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. *Chemosphere*, 262:127879. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>
- El-Jaoual T., Cox D.A. (1998) Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2): 353-386. <https://doi.org/10.1080/01904169809365409>
- Gay C., Gebicki J.M. (2000) A critical evaluation of the effect on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry*, 281:217-220. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>
- Gharaibeh M.A., Marschner B., Heinze S. (2015) Metal uptake of tomato and alfalfa plants as affected by water source, salinity, and Cd and Zn levels under greenhouse conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(23):18894-18905. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5077-3>
- Ghori N.-H., Ghori T., Hayat M.Q., Imadi S.R., Gul A., Altay V., Ozturk M. (2019) Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16:1807-1828. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977) Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Guimarães L.A.D.O.P., Assis I.R., Dias L.E., Cordeiro A.L., Freire A.S. (2017) Espécies arbóreas potenciais para a revegetação de rejeito salino contaminado com arsênio. *Ciência Florestal*, 27:871-881. <https://doi.org/10.5902/1980509828637>
- Havir E.A., McHale N.A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84:450-455. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- He J., Ren Y., Chen X., Chen H. (2014) Protective roles of nitric oxide on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under cádmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108:114-119. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.021>
- Hodges D., DeLong J., Forney C., Prange R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207:604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Huybrechts M., Cuypers A., Deckers J., Iven V., Vandionant S., Jozefczak M., Hendrix S. (2019) Cadmium and Plant Development: An Agony from Seed to Seed. *International Journal of Molecular Sciences*, 20:3971. <https://doi.org/10.3390/ijms20163971>

- Kar M., Mishra D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315-319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- Koshiha T. (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant and Cell Physiology*, 34(5):713-721. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078474>
- Kumar S.K., Ghosh S. (2013) Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 4(2):272-275. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.116964>
- Kuo M., Kao C. (2003) Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Rice Leaves. *Biologia Plantarum*, 46:149-152. <https://doi.org/10.1023/A:1022356322373>
- Kwak J.M., Nguyen V., Schroeder J.I. (2006) The Role of Reactive Oxygen Species in Hormonal Responses. *Plant Physiology*, 141:323-329. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079004>
- Li, W., Khan, M., Yamaguchi, S., Kamiya Y. (2005) Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 46:45-50. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-6324-2>
- Lindeman W. (1958). Observations on the behaviour of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light. Proc. IInd Int. Conf. Of the U.N. on the peaceful uses of atomic energy. 24:8-15.
- Maguffin S.C, Abu-Ali L., Tappero R.V., Pena J., Rohila J.S., McClung A.M., Reid M.C. (2020) Influence of manganese abundances on iron and arsenic solubility in rice paddy soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 276:50-69. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2020.02.012>
- Maehley A.C., Chance B. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2: 764-775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Maguire J. D. (1962) Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2:176-177. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
- Mhamdi A., Frank Van Breusegem F. (2018) Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145:164376. <http://doi.org/10.1242/dev.164376>

- Marin A.R., Pezeshki S.R., Masschelen P.H., Choi H.S. (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *Journal of Plant Nutrition*, 16:865-880. <https://doi.org/10.1080/01904169309364580>
- Matos L.P., Andrade H.M., Marinato S.M., Prado I.G.O., Coelho D.G., Montoya S.G., Kasuya M.C.M, Oliveira J.A. (2020) Limitations to Use of *Cassia grandis* L. in the Revegetation of the Areas Impacted with Mining Tailings from Fundão Dam. *Water Air Soil Pollut*, 231:127. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04479-0>
- Millaleo R., Reyes-Díaz M., Ivanov A.G., Mora M.L., Alberdi M. (2010) Manganese as essential and toxic element for plants: Transport, accumulation and resistance mechanism. *J. Soil Sci. Plant Nutr*, 10:470-481. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162010000200008>
- Mihoub A., Chaoui A., El Ferjani E. (2005) Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies*, 328(1):33-41. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.10.003>
- Nakano Y., Asada K., (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5):867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Niinemetes U. (2010) Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management*, 260:1623-1639. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.07.054>
- Orlando M.T.D., Galvão E.S., Cavichini A. S., Rangel C.V.G.T., Orlando C.G.P., Grilo C.F., Soares J., Santos Oliveira K.S.S., Sá F., Junior A.C., Bastos A.C., Quaresma V.S. (2020) Tracing iron ore tailings in the marine environment: An investigation of the Fundão dam failure. *Chemosphere*, 257:127184. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127184>
- Paul S., Upadhyay S.K., Singh N. (2020) Geogenic source of arsenic and their effect on vegetable seed germination. *Tropical Plant Research*, 7(1):110–116. <https://doi.org/10.22271/tpr.2020.v7.i1.015>
- Porter R.H., Durrell M., Romm H.J. (1947) The use of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a measure of seed germinability. *Plant Physiology*, 22:149-159. <https://doi.org/10.1104/pp.22.2.149>
- Rajjou L., Duval M., Gallardo K., Catusse J., Bally J., Job C., Job D. Seed Germination and Vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63:507-533. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>

- Renova Foundation (2019) Relatório de avaliação da qualidade do rejeito presente na Barragem do Fundão, em Mariana – MG, e na Usina Hidrelétrica Risoleta Neves (aterro de Candonga), em Rio Doce – MG. <https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2017/10/r001170373finalmcofundacaorenovafundaoecandongad09.pdf>
- Rodrigues-Junior A.G., Santos M.T.A., Hass J., Paschoal B.S.M., De-Paula O.C. (2020) What kind of seed dormancy occurs in the legume genus *Cassia*?. *Sci Rep*, 10:12194. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69215-4>
- Rucińska-Sobkowiak R. (2016) Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. *Acta Physiol Plant*, 38:257. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2277-5>
- Seneviratne M., Rajakaruna N., Rizwan M., Madawala H. M. S. P., Ok Y.S., Vithanage M. (2019) Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. *Environ Geochem Health*, 41:1813-1831. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-0005-8>
- Shao J.F., Yamaji N., Shen R.F., Ma J.F. (2017) The key to Mn homeostasis in plants: regulation of Mn transporters. *Trends in Plant Science*, 22:215-224. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.005>
- Silva E., Guilherme M.F., Oliveira H, Viana Z., Santos V.L. (2017) Caracterização morfológica e efeitos ecotoxicológicos do chumbo na germinação de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84:e0272016. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000272016>
- Silveira N.M., Oliveira J.A., Ribeiro C., Canatto R.A., Siman L., Cambraia J., Farnese F. (2015) Nitric oxide attenuates oxidative stress induced by arsenic in lettuce (*Lactuca sativa*) leaves. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226:e379. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2630-0>
- Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. (2016) Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6:ID1143 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Soltan M.E., Al-ayed A.S., Ismail M.A. (2019) Effect of pH values on the solubility of some elements in different soil samples, *Chemistry and Ecology*, 35(3):270-283. <https://doi.org/10.1080/02757540.2018.1546294>
- Srivastava M., Ma L.Q., Singh N., Singh S. (2005) Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *Journal of Experimental Botany*, 56:1335-1342. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri134>

- Veloso C.A.C., Muraoka T., Malavolta E., de Carvalho J.G (1995) Effect of manganese on mineral nutrition and growth of black pepper (*Piper nigrum*, L.). *Scientia Agricola*, 52(2):376-383. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161995000200028>
- Vlamis J., Williams D.E. Iron and manganese relations in rice and barley. *Plant and Soil*, 20(2): 221-231. <https://doi.org/10.1007/BF01376451>
- Waterborg J.H., Matthews H.R. (1984) The Lowry method for protein quantitation. In: Walker JM (eds) Proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:1>
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Montagu M.V., Inzé D., Camp W.V. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal*, 16:4806-4816. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4806>
- Xia H., Ma X. (2006) Phytoremediation of ethion by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) from water. *Biosource Technology*, 97:1050-1054. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.039>
- Yusefi-Tanha E., Fallah S., Rostamnejadi A., Pokhrel L.R. (2020) Particle size and concentration dependent toxicity of copper oxide nanoparticles (CuONPs) on seed yield and antioxidant defense system in soil grown soybean (*Glycine max* cv. Kowsar). *Science of The Total Environment*, 715:136994. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136994>

Capítulo 2: A espécie arbórea *Cassia grandis* L. é tolerante à ação conjunta de elementos metálicos?

RESUMO

Elementos metálicos podem influenciar o desenvolvimento e o metabolismo das plantas utilizadas em processos de fitorremediação, reduzindo sua eficiência. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos conjuntos de elementos metálicos sobre plantas de *Cassia grandis* L. Plantas com 40 dias foram mantidas por 48 horas expostas a soluções com misturas de elementos metálicos (T₁ e T₂). Foram analisadas as concentrações de metais e nutrientes, taxas de trocas gasosas, fluorescência da clorofila, concentrações de pigmentos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA), atividade de enzimas antioxidantes e alterações morfológicas nos tecidos de folhas e raízes. Ocorreu acúmulo de metais nas raízes, baixa translocação de As para as folhas e ausência de translocação de Pb e Cd. As trocas gasosas, a transpiração, o rendimento do FSII e as taxas de transporte de elétrons foram reduzidas. As concentrações de clorofila *a*, carotenóides e antocianinas aumentaram. Nas raízes ocorreu redução da atividade de dismutase do superóxido (SOD) e catalase (CAT). Nas folhas SOD, peroxidase (POX) e redutase da glutatona (GR) diminuíram e CAT aumentou. Foram observados colapso de células e alteração em tecidos de folhas e raízes. Os valores de trocas gasosas denotam promoção do fechamento estomático. Os resultados de fluorescência e fotorrespiração indicam inibição do sistema fotossintético. O aumento das concentrações de carotenóides e antocianinas e o sistema SOD/POX/CAT atuou na proteção contra danos oxidativos. No entanto, esses sistemas de defesa não foram suficientes para inibir os danos, indicados pelo aumento das concentrações de MDA e pelas alterações observadas nos tecidos de folhas e raízes das plantas expostas aos elementos metálicos.

Palavras-chave: Fitorremediação, fisiologia vegetal, metais pesados, mineração.

INTRODUÇÃO

Ações antrópicas, como as atividades de mineração, promovem a liberação e consequente acúmulo de elementos tóxicos nos ecossistemas. Dentre os contaminantes, os elementos metálicos vêm se tornando um problema cada vez maior, uma vez que não são degradados e, por este motivo, passíveis de acumulação no ambiente, colocando em risco a qualidade ambiental, a saúde humana e a segurança alimentar (Singh et al. 2016, Ashraf et al. 2019).

A remediação de ambientes contaminados é importante para o equilíbrio dos sistemas biológicos e, para tanto, há uma diversidade de técnicas passíveis de serem empregadas, como a utilização de métodos físicos e químicos. A utilização de vegetais como método remediador, a fitorremediação, tem se mostrado como uma alternativa a esses processos de mitigação de contaminantes ambientais (Ali et al. 2013), apresentando vantagens sobre outras técnicas, como menores custos de implementação (Awa & Hadibarata 2020). No entanto, concentrações elevadas de elementos metálicos podem limitar o uso da técnica, pois, em concentrações tóxicas, podem provocar danos fisiológicos, bioquímicos e estruturais, resultado em grande parte da ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), cuja produção é aumentada na presença desses elementos tóxicos (Ghori et al. 2019).

Embora diversos mecanismos de proteção antioxidante sejam ativados, para minimizar esses efeitos deletérios, nem sempre conseguem evitar que os danos se concretizem (Silveira et al. 2015). Além disso, a capacidade de resistir a esses danos, varia entre as diferentes espécies vegetais, com algumas apresentando mecanismos de tolerância mais eficientes, seja por estratégias de imobilização do elemento tóxico ou por meio de um sistema antioxidante mais eficiente (Abercrombie et al. 2008). Outro aspecto a ser considerado, é que cada elemento metálico apresenta características próprias que induzem efeitos específicos sobre os vegetais, como clorose, alteração nas concentrações de clorofila, danos celulares, entre outros (Maleki et al. 2017).

A maior parte das pesquisas com plantas, com potencial fitorremediador, se baseia na utilização de elementos isolados ou na combinação de dois ou três elementos (Wong 2003, Pilon-Smits 2005, Ghori et al. 2019). No entanto, em áreas contaminadas, principalmente por resíduos de mineração, os elementos metálicos raramente são encontrados isolados, mas sim em misturas com diferentes concentrações (Buch et al. 2021).

Quando um vegetal é exposto a uma mistura de elementos metálicos, os efeitos de cada elemento podem ser reduzidos ou aumentados, dependendo da interação entre eles, devido à promoção de efeitos sinérgicos ou antagônicos que afetam o processo de absorção e acúmulo (Cherif et al. 2011, Gharaibeh et al. 2015, Aihemaiti et al. 2018).

Dessa forma, a utilização de uma espécie com potencial para fitorremediação e revegetação de áreas impactadas por múltiplos elementos, especialmente aquelas afetadas por rejeitos de mineração, como a leguminosa *Cassia grandis* L. (Guimarães et al. 2017, Matos et al. 2020), deve levar em consideração os efeitos dessa combinação de elementos sobre a planta.

Assim, este trabalho visou analisar os efeitos da ação conjunta de elementos metálicos, detectados em rejeito de mineração de ferro, em plantas de *C. grandis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes de *C. grandis*, adquiridas na Sociedade de Investigações Florestais (SIF/UFV), foram submetidas ao processo de quebra de dormência por imersão em ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 95%), por 15 minutos, seguida de lavagem em água desionizada, previamente ao início dos tratamentos no experimento. Inicialmente foi realizado o teste de viabilidade com tetrazólio (Porter et al. 1947), onde 100 sementes foram embebidas em água destilada por 24 horas, seguida de imersão em solução de tetrazólio (0,05%), no escuro, a 30°C, por 8 horas, lavadas com água destilada e analisadas. As sementes coradas pelo tetrazólio foram consideradas viáveis e as coradas parcialmente ou não coradas inviáveis.

Condições experimentais

As sementes, com quebra de dormência previamente realizada, foram dispostas em rolos de papel de germinação embebido com solução de Clark modificada, pH 6,5, contendo (mM): Ca (2,6), K (1,8), Mg (0,6), $\text{NH}_4\text{-N}$ (0,9), $\text{NO}_3\text{-N}$ (6,9), S (0,6), P (0,069), Mn (0,007), B (0,019), Zn (0,002), Mo (0,0006), Cu (0,0005) e Fe (0,038) como ferro sódico (Fe^{3+}) ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Após a emissão de radículas e cotilédones, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 2 L, contendo a solução nutritiva, anteriormente descrita, com sistema de aeração e mantidas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $230 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), sob fotoperíodo de 12 horas, por 40 dias. Após esse período, foram aplicados os tratamentos, que consistiram, além do controle (apenas solução nutritiva), de duas composições de elementos metálicos (Tabela 1). As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $230 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), sob fotoperíodo de 12 horas, por 48 horas.

Tabela 1: Tratamentos e concentrações de elementos metálicos utilizados para análise de aspectos morfológicos e fisiológicos de plantas de *C. grandis*

Tratamentos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Controle	Solução nutritiva (SN)
T ₁	SN + Fe (20), Mn (20), Zn (4), Pb (1,5), Cd (1,5) e As (1,5)
T ₂	SN + Fe (300), Mn (300), Zn (20), Pb (20), Cd (3) e As (3)

Formas químicas dos elementos: Fe (FeEDTA), Mn ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Zn ($\text{Zn}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Pb ($(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Cd ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e As ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Para definição do pH utilizado nos experimentos, assim como as concentrações dos elementos metálicos nos tratamentos T₁ e T₂, utilizou-se como base, dados referentes ao rompimento da Barragem de Fundão, que ocorreu em 2015, no município de Mariana, Minas Gerais, Brasil. O rompimento dessa barragem liberou cerca de 50 milhões de m³ de rejeitos de mineração de ferro que se misturaram a outros rejeitos já presentes no leito dos rios. Para este trabalho considerou-se a biodisponibilidade atual e potencial dos diferentes elementos metálicos nas regiões afetadas (Renova 2019, Coelho et al. 2020, Orlando et al. 2020, Duarte et al. 2021).

Determinação da concentração de elementos minerais

Amostras de folhas e raízes foram lavadas em água destilada e secas em estufa a 80 °C, até peso constante. Aproximadamente 100 mg de massa seca foram triturados e submetidos à mineralização com 1,5 mL de mistura nítrico-perclórica (2:1), à temperatura de 130 °C, até a completa oxidação da matéria orgânica (Marin et al. 1993). As amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, analisadas por espectrometria de emissão atômica, no caso do K, e por espectrometria de absorção atômica, para ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), em espectrofotômetro de absorção atômica (Modelo AA-6701F, Shimadzu). Para a determinação de arsênio (As) foi utilizado gerador de vapor de hidretos (HVG-1 Shimadzu). As concentrações de fosfato inorgânico (Pi) foram determinados pelo o método do fosfomolibdato (Lindeman 1958).

Determinação de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a e fotorrespiração

As taxas de assimilação de CO₂ (A - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E - $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s - $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a concentração interna de CO₂ na câmara subestomatal (C_i - $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram avaliadas em folíolos da porção mediana da primeira folha completamente desenvolvida, utilizando um analisador de gases em infravermelho (IRGA LICOR Li-6400 XT), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho modelo LI-6400-02B (LICOR), com intensidade luminosa de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 380 ppm de CO₂, temperatura da câmara 28 °C, sendo a área ocupada na câmara igual a 5,35 cm².

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando-se fluorômetro integrado à câmara do analisador (IRGA LICOR Li-6400 XT). Após serem adaptados ao escuro, por 30 min, folíolos foram expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para a determinação da fluorescência inicial (F₀). Em seguida, um pulso de luz saturante, com

irradiância de 6000 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, duração de 0,8 s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida (F_m). Foi realizada, ainda, a estimacão da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), do rendimento quântico do transporte de elétrons (ϕ_{FSII}), a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), o *quenching* fotoquímico (qP) e o *quenching* não-fotoquímico (NPQ), conforme descrito em DaMatta et al. (2002) e Lima et al. (2002).

A taxa de fotorrespiração (P_R) das plantas submetidas aos tratamentos por 2 dias foi calculada utilizando-se os dados obtidos com o analisador de gases a infravermelho e aplicando na seguinte fórmula (Epron et al. 1995, Valentini et al. 1995):

$$PR = 1/12[ETR_t - 4(A + R_D)]$$

Onde, ETR_t é a taxa de transporte de elétrons, A taxa de assimilação de CO_2 expressa por área e R_D respiração mitocondrial durante o dia calculada pela fórmula:

$$R_D = RNQ10^{(T_d - T_n)/10}$$

$Q_{10} = 2,2$ e T_n é a temperatura foliar no qual a R_n foi medida e T_d é a temperatura foliar na qual a R_D foi calculada.

O fluxo de elétrons utilizado para a carboxilação (ETR_c) e para oxigenação (ETR_o) pela Rubisco (ribulose-1, 5-bisphosphate oxigenase/carboxilase) também foram calculados, de acordo com as seguintes fórmulas:

$$ETR_c = 1/3[ETR_t + 8(A + R_D)]$$

$$ETR_o = 2/3[ETR_t + 4(A + R_D)]$$

Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos e antocianinas

Para a determinação da concentração de clorofila *a*, *b* e carotenóides, aproximadamente 100 mg de material vegetal fresco foram obtidos de folíolos da primeira folha completamente expandida. As amostras foram incubadas em 2 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio, em tubos de ensaio tampados e revestidos com papel alumínio. Após 24 horas de incubação, os tubos foram colocados em banho-maria a 65 °C, por 45 min, para solubilização dos pigmentos (Wellburn 1994). Após esse período, as absorvâncias da solução foram lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm, e utilizadas para a estimativa das concentrações dos pigmentos, calculados segundo as equações propostas por Arnon (1949), sendo os resultados expressos em mg g^{-1} MF (massa fresca).

Para determinação das concentrações de antocianinas, 100 mg de massa fresca de folíolos foram homogeneizadas em 5 mL de metanol- HCl 1% (v/v), em banho de gelo, e centrifugadas a 10.000 g por 30 min, a 4 °C. O teor total de antocianina foi determinado pela

diferença entre a absorvância a 536 e 600 nm (Hodges et al. 1999) e os resultados expressos em mg g^{-1} MF, como equivalentes de cianidina-3-glucosídeo, utilizando o coeficiente de extinção molar ($26900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Amostras de 300 mg de folhas e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL dos seguintes meios de extração das enzimas:

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto et al. 1999), para dismutases do superóxido (SOD), catalases (CAT) e peroxidases (POX).

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético) 1 mM, triton 0,02%, DTT (ditiotreitól) 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP (polivinil pirrolidona) 1% (Carlberg & Mannervik 1985) para a enzima redutase da glutatona (GR).

Os homogeneizados, depois de filtrados através de quatro camadas de gaze, foram centrifugados a 12.000 g por 15 min, a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto e as atividades enzimáticas foram determinadas pela adição do extrato aos seguintes meios de reação: tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM , para a SOD (Giannopolitis & Ries 1977); tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM, para a CAT (Havir & McHale 1987); tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM, para a POX (Kar & Mishra 1976) e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5, GSSG 1 mM, NADPH 0,1 mM, para a GR (Carlberg & Mannervik 1985).

Para a determinação da atividade da SOD, as amostras foram expostas a iluminação por 5 min e a absorvância foi medida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich 1971). As atividades das enzimas CAT, POX e GR foram estimadas pela leitura da absorvância durante o primeiro minuto de reação. Os seguintes coeficientes de extinção molar foram utilizados: CAT (240 nm, ϵ : $36 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Anderson et al. 1995), POX (420 nm, ϵ : $2,47 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Maehley & Chance, 1955) e GR (340 nm, ϵ : $6,22 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A concentração de proteínas foi determinada por meio do método de Bradford, utilizando a albumina do soro bovino (BSA) como padrão para expressar a atividade enzimática (Waterborg & Matthews 1984).

Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Amostras de 0,2 g de raízes e folhas foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2,0 mL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração, o homogenato foi centrifugado a 10.000 g, por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado (Kuo & Kao 2003). Aliquotas de 50 µL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação que consiste em 100 µM de FeNH₄ (SO₄), 25 mM de ácido sulfúrico, 250 µM de laranja de xilenol e 100 mM de sorbitol em um volume final de 2 mL (Gay & Gebicki 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorbância determinada a 560 nm. Brancos de cor dos reagentes e extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. As concentrações de H₂O₂ nas amostras foram estimados com base na curva de calibração preparada com padrões de H₂O₂ e expressos em µmol g⁻¹ MF (massa fresca).

Determinação da peroxidação lipídica

Para análise de malondialdeído (MDA) com eliminação de interferente (antocianina) foram macerados 100 mg de folhas e raízes, em nitrogênio líquido e adicionados 2 mL de mistura etanol:água (80:20). Após a homogeneização e centrifugado 3000 g por 10 min, 4 °C, foi retirada alíquota de 0,5 mL do sobrenadante e adicionado a 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. Outra alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 0,5 mL da mistura TCA 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. As amostras foram mantidas em banho de aquecimento colocadas no banho, a 90°C, por 1 hora, seguido de resfriamento em banho de gelo. Realizou-se nova centrifugação, a 3000 g, por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante obtido foi utilizado para análises das absorvâncias a 440, 532 e 600 nm. Os resultados foram estimados utilizando as seguintes equações (Hodges et al. 1999):

$$[(\text{Abs } 532+\text{TBA})-(\text{Abs } 600+\text{TBA}) - (\text{Abs } 532-\text{TBA} - \text{Abs } 600-\text{TBA})] = A$$

$$[(\text{Abs } 440+\text{TBA} - \text{Abs } 600+\text{TBA}) 0.0571] = B$$

$$\text{MDA equivalentes (nmol a ml}^{-1}\text{)} = (A -B/157\ 000) 10^{-6}$$

Os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ MF (massa fresca).

Análise anatômica

Folíolos da região intermediária de folhas do terceiro nó foram coletadas, fixadas em FAA (formalina, ácido acético, etanol 50%, 1:1:18 por volume) e armazenadas em etanol 70% (Johansen 1940) Os fragmentos foram desidratados em séries etílicas, incluídos em metacrilato

(Historesin, Leica Instruments) e seccionados em um micrótomo rotativo de avanço automático. As seções foram coradas com 0,05% de azul de toluidina O (pH 4,0) (O'Brien et al. 1964) e montadas em lâminas usando resina sintética (Permound, Fisher Scientific, New Jersey, EUA). As imagens digitalizadas foram obtidas em microscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-Photo, acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com captura de imagens do programa Spot Basic.

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, compostos de 3 tratamentos e 5 repetições, sendo cada unidade experimental constituída de 2 plantas. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido por teste de médias de Tukey ($p < 0.05$), utilizando-se o programa R (R.CORE TEAM).

RESULTADOS

Em condições normais de cultivo (controle) observou-se que a maior parte dos elementos se acumulou nas folhas, como o ferro (Fe), manganês (Mn), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Entretanto, em exposição a maiores concentrações dos elementos metálicos, como em T₁ e T₂, esse padrão de distribuição se altera, passando a apresentar maior acúmulo nas raízes. As concentrações de Fe, Mn e zinco (Zn) nas folhas das plantas expostas aos tratamentos T₁ e T₂ foram similares em relação ao controle, diferentemente das raízes, que apresentaram as maiores concentrações desses elementos, à exceção do Zn em T₂, em que foi similar ao controle. De modo geral, as concentrações dos elementos utilizados nos tratamentos foram maiores nas raízes de plantas expostas ao T₁ do que em T₂, à exceção do Pb (Tabela 2). Em relação aos macronutrientes, observa-se que as concentrações de K, Ca, Mg e Pi nas folhas e nas raízes das plantas expostas aos tratamentos T₁ e T₂ sofreram poucas alterações significativas quando comparadas com o controle.

Tabela 2: Concentrações de Fe, Mn, Zn, Pb, Cd e As ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) e de K, Ca, Mg e Pi (mg g^{-1} MS) em folhas e raízes de *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução nutritiva contendo elementos metálicos (T₁ e T₂)

Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MS)	Folhas			Raízes		
	Controle	T ₁	T ₂	Controle	T ₁	T ₂
Fe	277,04±81,21 a	386,99±79,66 a	332,35±37,33 a	46,34±8,36 b	2272,27±328,07 a	3103,78±997,37 a
Mn	140,03±24,00 a	194,87±76,47 a	183,07±28,57 a	32,26±7,95 c	805,55±41,83 b	1756,13±267,47 a
Zn	59,36±12,39 a	74,97±21,22 a	63,80±7,82 a	76,25±18,07 b	212,67±42,94 a	76,08±23,05 b
Pb	ND	ND	ND	ND	208,24±45,82 b	513,18±75,69 a
Cd	ND	ND	ND	ND	138,00±11,65 a	9,17±4,62 b
As	ND	4,97±1,32 a	2,51±0,62 b	ND	169,90±15,36 a	46,72±15,35 b
Concentração (mg g⁻¹ de MS)						
K	14,58±2,41 a	18,68±3,11 a	16,58±2,43 a	30,98±6,75 a	12,14±2,48 b	14,27±1,73 b
Ca	14,81±0,60 a	15,47±1,29 a	12,76±1,25 b	5,79±0,72 b	7,38±0,32 a	5,54±0,44 b
Mg	6,32±0,85 b	9,86±2,00 a	7,55±1,96 ab	2,77±0,93 a	4,23±1,00 a	3,98±1,42 a
Pi	1,27±0,14 a	1,38±0,23 a	1,15±0,42 a	1,08±0,15 a	0,81±0,20 b	0,83±0,17 b

Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey 5% de probabilidade.

A exposição das plantas aos elementos metálicos influenciou significativamente nos parâmetros de trocas gasosas avaliados. Embora esses parâmetros sejam avaliados nas folhas, observa-se que as alterações nas concentrações dos metais foram mais expressivas nas raízes, especialmente para os elementos não essenciais. De modo geral, os resultados demonstram que os parâmetros foram reduzidos a valores iguais ou próximos a zero nos tratamentos T₁ e T₂, conforme dados da taxa de fotossíntese líquida (A), da condutância estomática (g_s) e da transpiração (E). A exceção foi a concentração interna de CO₂ (C_i), que apresentou significativa alteração apenas em T₁ (Tabela 3).

Tabela 3: Taxa de fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração interna de CO₂ (C_i) em plantas de *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução contendo elementos metálicos (T₁ e T₂)

	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	g _s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	C _i ($\mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Controle	6,74 a	0,18 a	323,11 b	2,58 a
T₁	0,00 b	0,00 b	572,05 a	0,00 b
T₂	0,00 b	0,02 b	347,68 b	0,31 b

Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey 5% de probabilidade.

Os valores do rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm) e *quenching* não fotoquímico (NPQ) não foram afetados pela exposição das plantas aos elementos metálicos, no entanto, a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (ϕ_{FSII}) e os valores de *quenching* fotoquímico (qP) foram menores nas plantas expostas aos metais em relação ao controle (Figura 1)

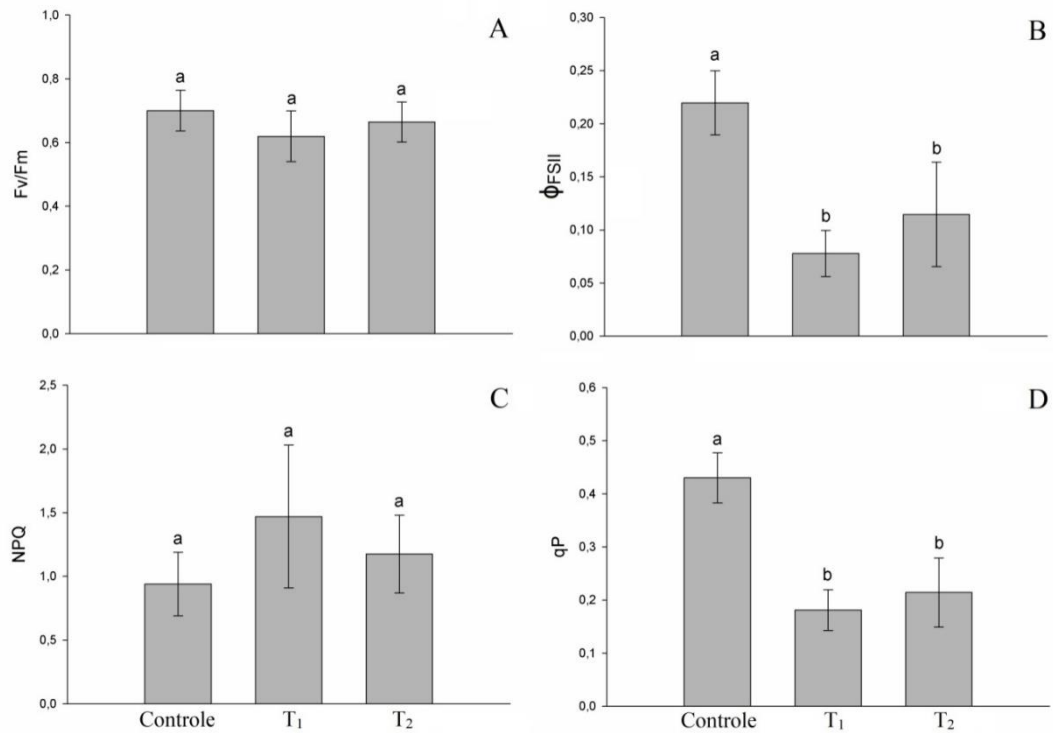


Figura 1: Rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm) (A), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (Φ_{FSII}) (B), *quenching* não fotoquímico (NPQ) (C) e *quenching* fotoquímico (qP) (D) em plantas de *C. grandis* mantidas, por 48 h, em solução nutritiva (controle) e solução nutritiva contendo elementos metálicos (T₁ e T₂). Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A exposição das plantas de *C. grandis* aos tratamentos com metais e As não afetou a taxa fotorrespiratória (P_R), no entanto, reduziu as taxas de transporte de elétrons para carboxilação da Rubisco (ETR_C) e as taxas de transporte de elétrons para oxigenação da Rubisco (ETR_O) em relação às plantas do controle. Essa redução foi mais expressiva em ETR_C , com decréscimo médio de 75% em relação ao controle (Figura 2).

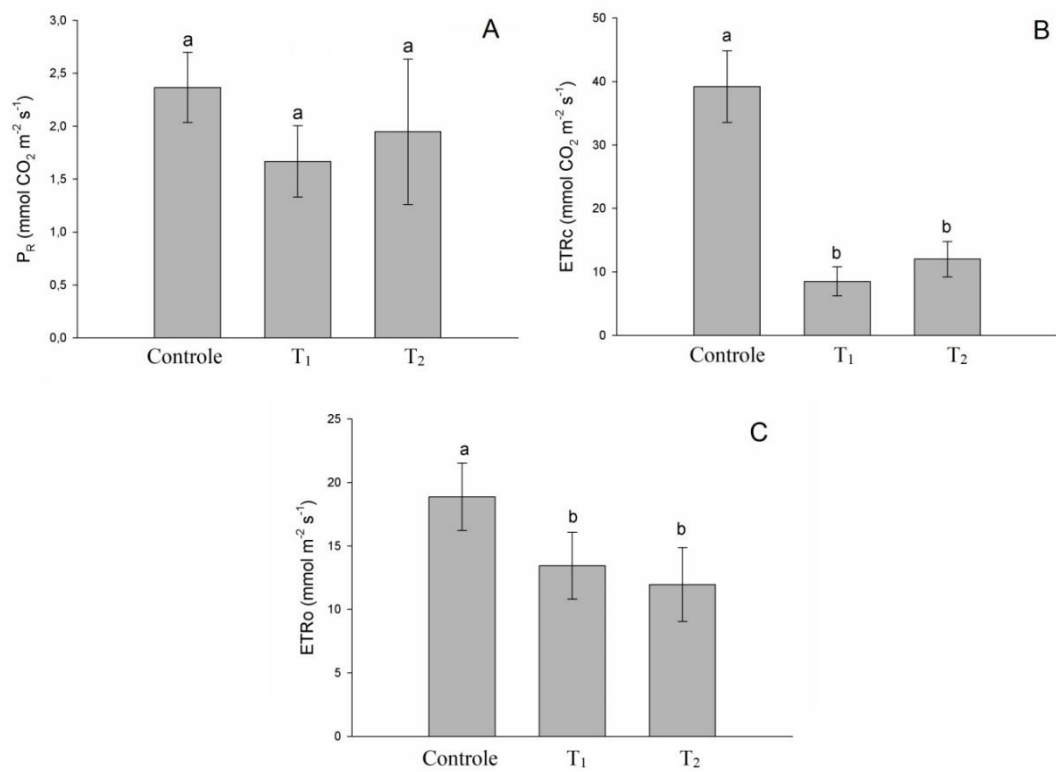


Figura 2: Fotorrespiração (P_R) (A), taxa de transporte de elétrons para carboxilação da Rubisco (ETR_C) (B) e taxa de transporte de elétrons para oxigenação da Rubisco (ETR_O) (C) em *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução elementos metálicos (T₁ e T₂). Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ocorreu aumento das concentrações de clorofila *a* e *b* no tratamento T₁, mantendo-se valores similares ao controle em T₂. As alterações de carotenoides e antocianinas diferiram significativamente em relação ao controle, nos dois tratamentos com metais (Figura 3).

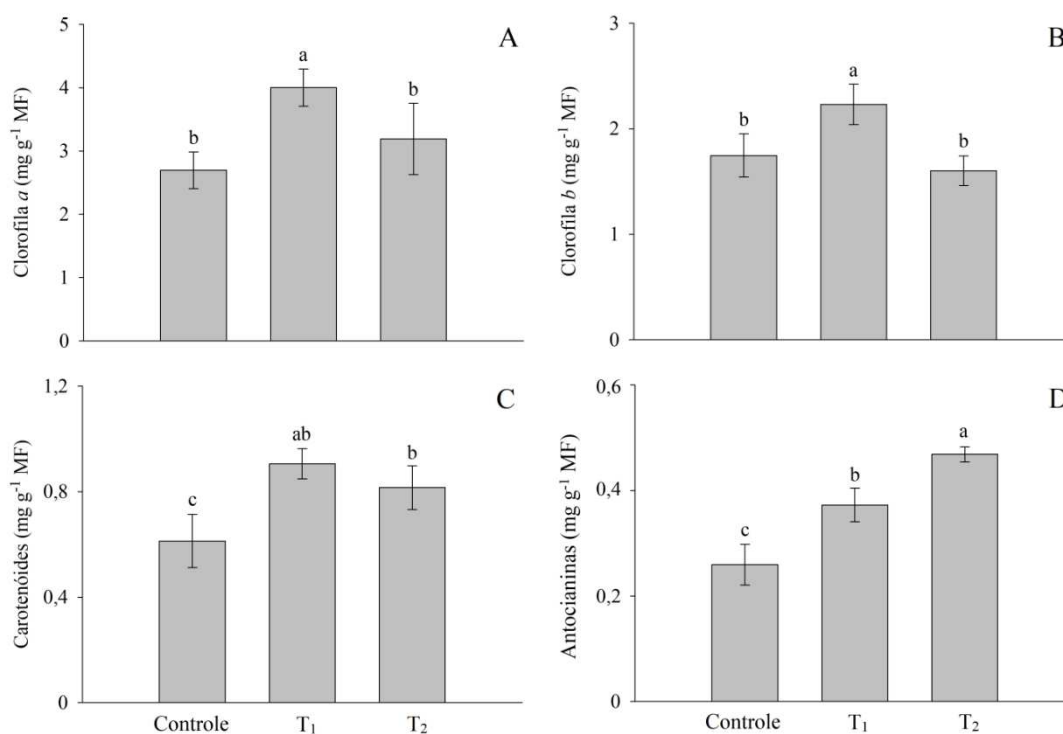


Figura 3: Concentrações de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), carotenóides (C) e antocianinas (D) em *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução contendo elementos metálicos (T₁ e T₂). Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Antocianinas (mg⁻¹ MF)

As concentrações de H₂O₂ nas folhas das plantas submetidas a T₂ e nas raízes das submetidas a T₁ e T₂ aumentaram em relação ao controle. Já as concentrações de MDA foram maiores nas folhas das plantas em T₁ em relação ao controle. Nas raízes, as concentrações de MDA aumentaram em todas as plantas expostas a metais, sendo maior no tratamento com as maiores concentrações de metais (Figura 4).

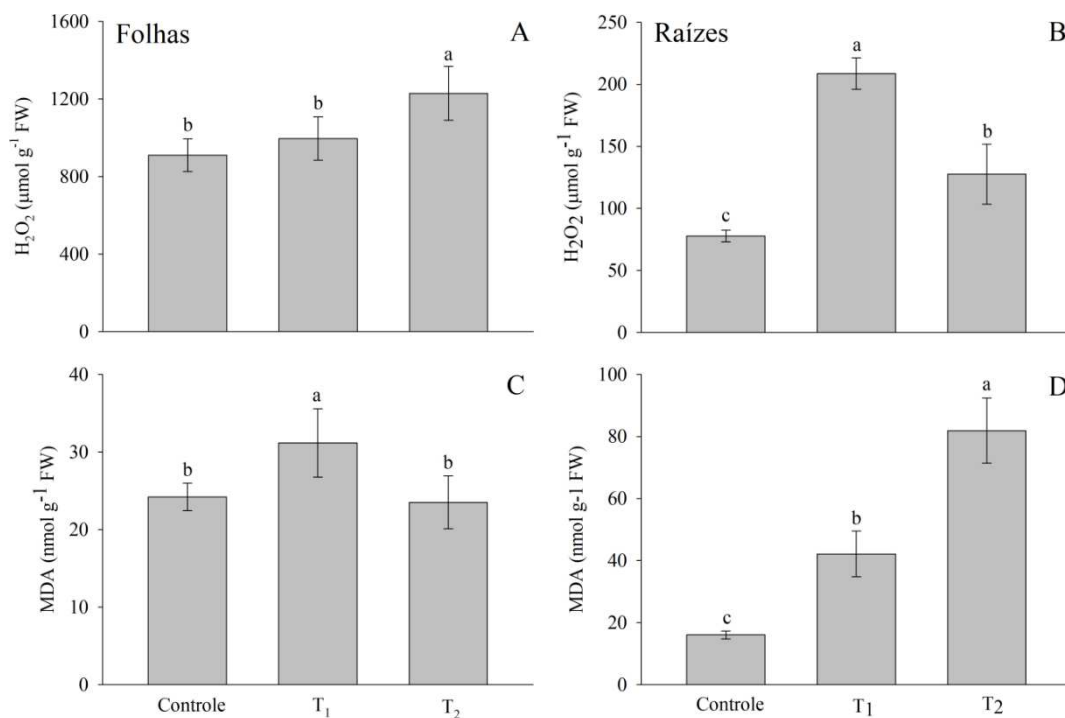


Figura 4: Concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (A e B) e malondialdeído (MDA) (C e D) em folhas e raízes de plantas de *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução contendo elementos metálicos (T₁ e T₂). Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade da SOD reduziu significativamente nas raízes em função dos tratamentos aplicados e, para as demais enzimas, esse efeito não foi observado, à exceção da atividade da CAT em T₁. Nas folhas, no entanto, as atividades das enzimas SOD, POX e GR tiveram redução em função dos metais e As presentes em solução. Somente a atividade da CAT nas folhas teve acréscimo quando as plantas foram expostas aos metais (Figura 5).

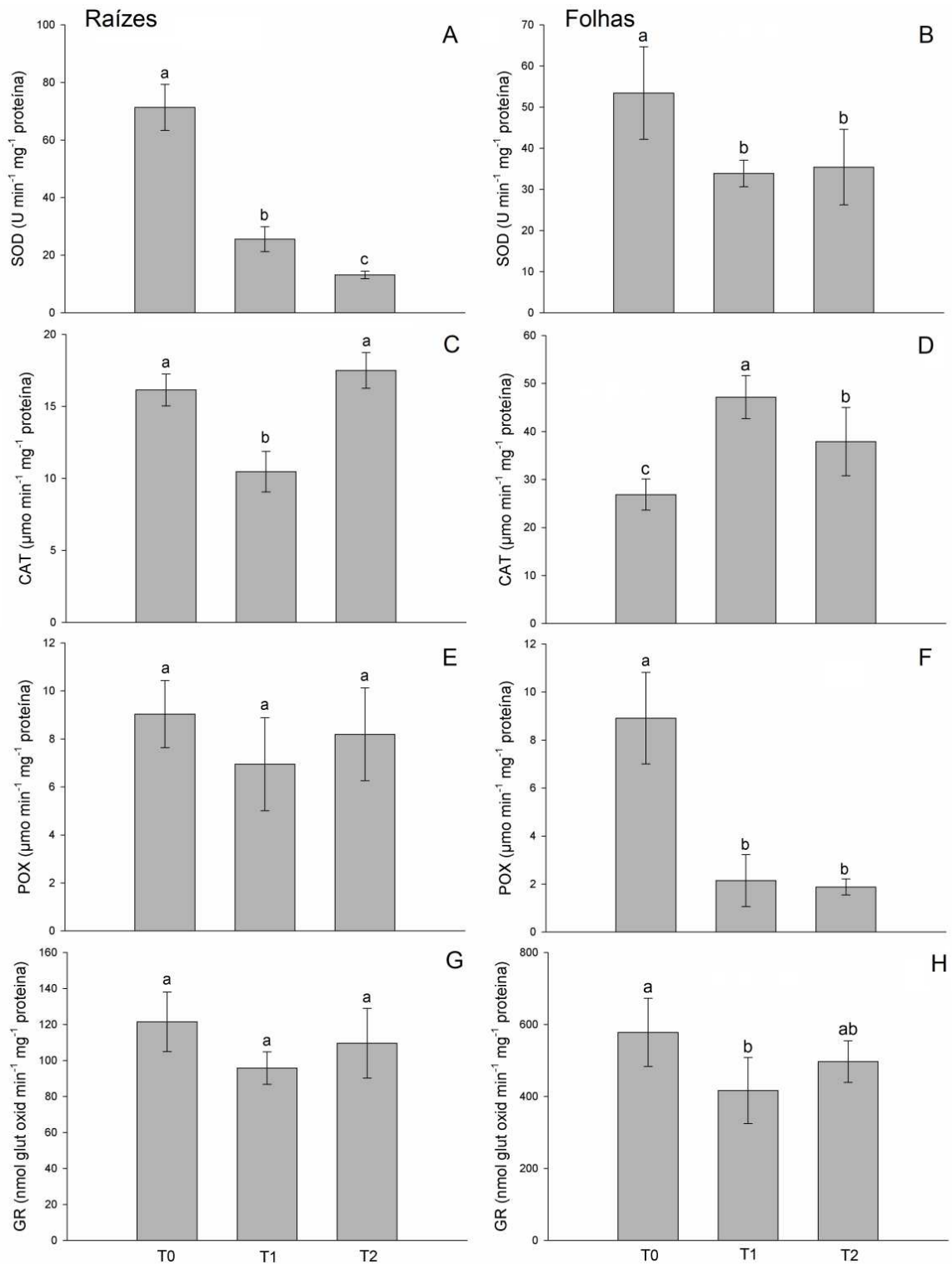


Figura 5: Atividade da dismutases do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POX) e redutase da glutaciona (GR) em raízes (A, C, E e G) e folhas (B, D, F e H) de *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução contendo elementos metálicos (T₁ e T₂). Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto às análises anatômicas, verificou-se que as folhas e raízes de *C. grandis* expostas aos elementos metálicos apresentaram células colapsadas e alteração na organização dos tecidos. Adicionalmente observou-se que a técnica de coloração empregada, utilizando azul de toluidina, não foi eficiente nas plantas expostas aos tratamentos com elementos metálicos (Figura 6).

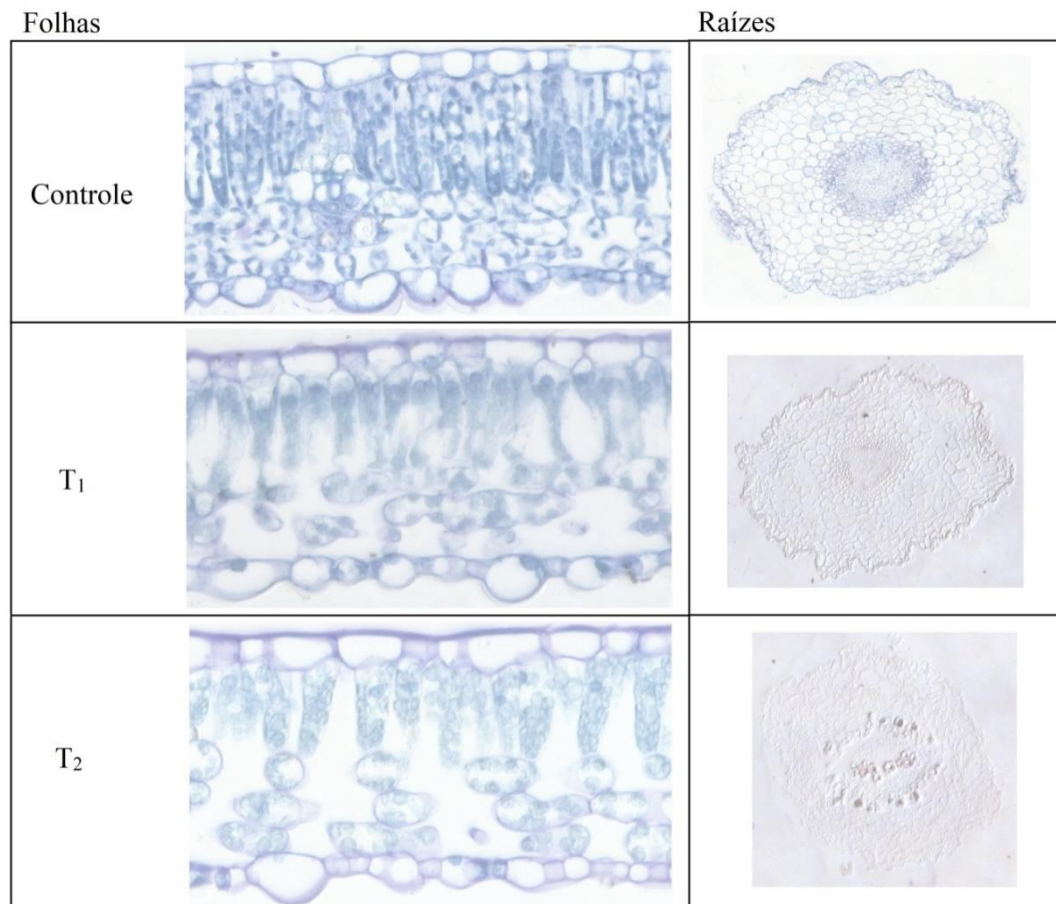


Figura 6: Fotomicrografias de seções transversais do limbo foliar e raízes de plantas *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução contendo elementos metálicos (T₁ e T₂).

DISCUSSÃO

Elementos metálicos, em concentrações tóxicas, afetam processos bioquímicos, fisiológicos e estruturais das plantas, com ações diretas sobre os processos biológicos ou indiretas, por meio do estímulo à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Silveira et al. 2015, Shao et al. 2017).

Em geral, os íons metálicos, ao serem absorvidos, apresentam dificuldades em se mover através das membranas celulares, necessitando de transportadores de membrana. Dessa forma, a maior parte desses elementos tende a ficar complexados em estruturas celulares nas raízes, com reduzida translocação para a parte aérea (Lasat 2000). Essa retenção nas raízes, que envolve diversos processos, como adsorção aos sítios da parede celular, formação de placas de elementos metálicos nas paredes celulares, entre outros (Liu et al. 2009, Peng et al. 2018), corresponde ao que foi observado nas plantas de *C. grandis* que, de modo geral, apresentaram maior acúmulo de elementos metálicos nas raízes.

Alguns elementos, como o manganês (Mn) e o cádmio (Cd) possuem facilidade de transporte para a parte aérea (Garbisu & Alkorta 2001), no entanto, a ausência de Cd nas folhas das plantas de *C. grandis*, expostas aos tratamentos com metais, pode ser um indicativo da presença de barreiras fisiológicas ao transporte desse metal para a parte aérea. Além disso, a associação com outros elementos metálicos pode afetar a absorção de Cd, como já observado em *Triticum aestivum*, onde a presença de Zn inibiu a absorção de Cd (Zhou et al. 2019). Constata-se que a presença de vários elementos em solução, como nos tratamentos T₁ e T₂, resulta em processos interativos que afetam a disponibilidade e a absorção pelas plantas (Jan & Parray 2016). Resultante desses processos verificou-se reduzida concentração de alguns elementos, tanto nas raízes como nas folhas. Ainda assim, em função da ação conjunta desses elementos, potencializando a ação tóxica, os processos bioquímicos, fisiológicos e estruturais foram significativamente afetados, quer seja pela ação direta ou indireta, mediada pelas espécies reativas de oxigênio.

O desequilíbrio no balanço de concentração de EROs, induzido pela ação tóxica dos metais, afeta a fotossíntese, com implicações diretas no crescimento e desenvolvimento das plantas (Singh et al. 2017). Os valores observados para a fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s) e a transpiração (E), nas plantas expostas aos elementos metálicos, confirmam que as trocas gasosas foram severamente afetadas, com fechamento estomático e,

consequentemente, redução da entrada de CO₂ para a fotossíntese, assim como a taxa de transpiração.

Além de afetar significativamente a disponibilidade de CO₂ nos sítios de carboxilação, os danos celulares por agentes tóxicos envolvem, também, alterações nos processos fotoquímicos e bioquímicos da fotossíntese (Romero-Puertas *et al.* 2002). Parâmetros como fluorescência da clorofila *a*, rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) e *quenching* fotoquímico (qP) são importantes na avaliação da atividade de transporte de elétrons, os quais podem indicar alterações na fase fotoquímica da fotossíntese (Meyer & Genty 1999). Dessa forma, a redução no rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{FSII}) e do *quenching* fotoquímico (qP) permitem inferir que a exposição das plantas aos elementos metálicos promoveu inibição da dissipação de energia por transporte de elétrons. Esse efeito inibitório foi observado, também, sobre a fase bioquímica da fotossíntese, com significativa redução na taxa de carboxilação da Rubisco. Dessa análise, portanto, é possível constatar que os tratamentos impostos às plantas, pela exposição a um pool de elementos metálicos e As, promoveram danos ao sistema fotossintético das plantas como um todo, afetando a disponibilidade de CO₂, a fase fotoquímica e a bioquímica.

As análises dos elementos metálicos nas folhas indicam, no entanto, que as concentrações desses elementos foram relativamente baixas, insuficientes para, isoladamente, causar as alterações no metabolismo fotossintético. Dessa forma, os resultados nos permitem inferir que, além da ação sinérgica dos elementos, as alterações observadas nas trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e fotorrespiração ocorreram de forma indireta, resultantes do acúmulo desses elementos nas raízes. Os efeitos tóxicos desses elementos podem causar danos estruturais, incluindo alterações nos transportadores e canais iônicos nas membranas celulares, que limitam a absorção e distribuição da água e nutrientes para as folhas (Ajeesh Krishna *et al.* 2020). Além disso, os resultados indicam que ocorreu sinalização de longa distância, onde sinalizadores gerados nas raízes das plantas sob estresse geraram respostas nas folhas, como já observado em outros experimentos (Ghori *et al.* 2019).

Associado aos processos fotossintéticos e aos mecanismos de proteção aos danos oxidativos, os pigmentos clorofilas, carotenoides e antocianinas se destacam como bons indicadores de alterações decorrentes da ação tóxica de elementos metálicos (Stahl & Sies 2003, Singh *et al.* 2006). Com relação às variações das concentrações das clorofilas observados nos tratamentos, percebe-se uma relação entre as concentrações desses pigmentos e as concentrações de Mg encontrados nas folhas, o que já foi evidenciada em outras espécies, como

Glycine max, em que o aumento das concentrações de Mg proporcionou aumento da síntese de clorofilas (Nascimento 2009). Os carotenoides e antocianinas, pigmentos constituintes dos mecanismos não enzimáticos antioxidantes (Davies et al. 2018), tiveram significativos incrementos nas plantas expostas aos elementos metálicos, evidenciando que os mesmos atuam em conjunto com outros mecanismos antioxidantes, em resposta ao estresse, buscando atenuar a ação tóxica conjunta desses elementos metálicos.

A geração de EROs nem sempre apresenta aspectos deletérios nos vegetais, sendo que, em muitas situações, apresentam papéis no metabolismo e como sinalização para a regulação de respostas aos estresses, estando envolvidos em processos de adaptação e aclimação das plantas ao ambiente (Huang et al. 2019). No entanto, a produção excessiva de EROs é capaz de causar danos metabólicos e estruturais, resultantes da ação tóxica sobre enzimas, DNA e lipídios de membranas (Waszczak et al. 2018). Como forma de mitigar esses danos, os organismos dispõem de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos, os quais são ativados ou têm a produção aumentada, em resposta ao desequilíbrio na concentração celular de EROs (Reis et al. 2019).

Os mecanismos enzimáticos baseiam-se na atuação conjunta de uma cascata de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), que promove a conversão do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em O_2 e H_2O_2 (Ahmad et al. 2008), a catalase (CAT) e as peroxidases (POX), que degradam o H_2O_2 , e a redutase da glutatona (GR), que é responsável pela regeneração de glutatona reduzida (GSH) (Ozfidan-Konakci et al. 2018). Embora façam parte dos processos de proteção celular, essas enzimas são susceptíveis, também, à ação inibitória causada por agentes tóxicos, conforme evidenciado para a SOD, cuja atividade foi significativamente reduzida nas plantas expostas aos elementos metálicos. Essa redução pode ser devido à ação direta dos elementos metálicos na estrutura das enzimas e/ou oxidação causada pelo excesso de EROs (Khan et al. 2009, Ackova 2018).

As enzimas POX e GR mantiveram as atividades nas raízes das plantas expostas aos tratamentos em valores similares ao controle, indicando maior tolerância à ação tóxica dos metais. Nas folhas, entretanto, essas enzimas demonstraram grande sensibilidade, com reduções significativas das atividades quando as plantas foram expostas aos metais e As. Contrariamente, as enzimas catalases foram as únicas a apresentarem incrementos da atividade nas folhas quando as plantas de *C. grandis* foram expostas a elementos metálicos e As. Nas raízes, entretanto, devido às elevadas concentrações de metais e de ROS, a atividade foi reduzida em T1, como já relatado em raízes de *Phaseolus aureus* (Singh et al. 2007).

Os danos aos tecidos, promovidos por EROs, podem ser avaliados de forma mais segura pela medição das concentrações de malondialdeído (MDA), que são importantes indicadores de peroxidação de lipídios de membrana (Aguiar-Silva et al. 2016). Dessa forma, o aumento das concentrações de MDA, observado, especialmente nas raízes das plantas expostas aos elementos metálicos, evidencia a ocorrência de danos estruturais às membranas celulares, sendo maiores nas plantas expostas às maiores concentrações desses elementos no tratamento T₂. Dessa forma, mesmo que alguns parâmetros indicadores de proteção antioxidativa tenham sido ativados, não foram suficientes para mitigar os danos celulares decorrentes do estresse provocado pelo conjunto de elementos utilizados no experimento. Como já relatado, isoladamente, as concentrações dos metais são relativamente baixas para causar esses danos, o que evidencia a potencialização dos efeitos tóxicos quando as plantas são expostas a vários elementos, em concentrações tóxicas, simultaneamente.

Adicionalmente, o estresse ao qual as plantas foram expostas pode ser evidenciado pela análise anatômica dos tecidos das folhas e raízes das plantas expostas aos elementos metálicos, onde foi observado alterações na organização dos tecidos e colapso de células, que são comuns e já foram observados em outras espécies vegetais (Yadav et al. 2021).

Dessa forma, os resultados observados com a fotossíntese, concentrações de MDA e análise anatômica permitem concluir que as concentrações de elementos metálicos às quais as plantas foram expostas promoveram danos severos comprometendo seu metabolismo.

CONCLUSÕES

A combinação dos elementos metálicos propiciou um maior acúmulo de metais nas raízes, induzindo a produção de EROs e influenciando na atividade das enzimas antioxidantes. No entanto, os mecanismos não foram suficientes para evitar os danos, evidenciados pela inibição de trocas gasosas, aumento da peroxidação lipídica e pelos danos observados nos tecidos de folhas e raízes.

Esses resultados sugerem que a espécie *C. grandis*, ao ser exposta a combinação de elementos metálicos, similares às utilizadas neste trabalho, apresenta restrições ao seu desenvolvimento, dificultando sua utilização como planta fitorremediadora em ambientes com esse tipo de contaminação.

REFERÊNCIAS

- Abercrombie J., Halfhill M.D., Ranjan P., Rao M.R., Saxton A.M., Yuan J.S., Stewart Jr. C.N. (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) Stress. *BMC Plant Biology*, 8:87. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-87>
- Ackova D.G. (2018) Heavy metals and their general toxicity on plants. *Plant Science Today*, 5(1):15-19. <https://dx.doi.org/10.14719/pst.2018.5.1.355>
- Aguiar-Silva C., Brandão S.E., Domingos M., Bulbovas P. (2016) Antioxidant responses of Atlantic Forest native tree species as indicators of increasing tolerance to oxidative stress when they are exposed to air pollutants and seasonal tropical climate. *Ecological Indicators*, 63:154-164. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.11.060>
- Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51:167-173. <https://doi.org/10.1007/BF03030694>
- Aihemaiti A., Jiang J., Li D., Liu N., Yang M., Meng Y., Zou Q. (2018) The interactions of metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *Journal of Environmental Management*, 222:216-226. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.081>
- Ajeesh Krishna T. P., Maharajan T., Victor Roch G., Ignacimuthu S., Antony Ceasar S. (2020). Structure, Function, Regulation and Phylogenetic Relationship of ZIP Family Transporters of Plants. *Frontiers in plant science*, 11:662. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00662>
- Ali H., Khan E., Sajad M.A. (2013) Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91:869-881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Anderson M.D., Prasad T.K., Stewart C.R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109(4):1247-1257. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247>
- Arnon D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1):1-15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Ashraf S, Ali Q, Zahir ZA, Ashraf S, Asghar HN (2019) Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174:714-727. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.068>

- Awa SH, Hadibarata T (2020) Removal of Heavy Metals in Contaminated Soil by Phytoremediation Mechanism: a Review. *Water Air Soil Pollut*, 231:47. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-4426-0>
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44:276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Buch A.C., Niemeyer J.C., Marques E.D., Silva-Filho E.V. (2021) Ecological risk assessment of trace metals in soils affected by mine tailings. *Journal of Hazardous Materials*, 403:123852, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123852>
- Carlberg I., Mannervik B. (1985) Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113:484-495. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4)
- Coelho D.G., Marinato C.S., Matos L.P., Andrade V.M., Neves P.H.S., Oliveira J.A. (2020) Evaluation of Metals in Soil and Tissues of Economic-Interest Plants Grown in Sites Affected by the Fundão Dam Failure in Mariana, Brazil. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5):596-607. <https://doi.org/10.1002/ieam.4253>
- DaMatta F.M., Loos R.A., Silva E.A., Loureiro M.E. (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*, 159:975-981. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00807>
- Davies, K. M., Albert, N.W., Zhou, Y., & Schwinn, K. E. (2018). Functions of flavonoid and betalain pigments in abiotic stress tolerance in plants. *Annual Plant Reviews*, 1:1-41. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0604>
- Duarte E.B., Neves M.A., Oliveira F.B., Martins M.E., Oliveira C.H.R., Burak D.L., Orlando M.T.D., Rangel C.V.G.T. (2021) Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. *Chemosphere*, 262:127879. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>
- Epron D., Godard D., Cornic G., Genty B. (1995) Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistances to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant, Cell and Environment*, 18, 43-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00542.x>
- Garbisu C., Alkorta I. (2001) Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77:229-236. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(00\)00108-5](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(00)00108-5)

- Gay C., Gebicki J.M. (2000) A critical evaluation of the effect on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry*, 281:217-220. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>
- Ghori N.-H., Ghori T., Hayat M.Q., Imadi S.R., Gul A., Altay V., Ozturk M. (2019) Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16:1807-1828. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977) Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59:309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Guimarães L.A.D.O.P., Assis I.R., Dias L.E., Cordeiro A.L., Freire A.S. (2017) Espécies arbóreas potenciais para a revegetação de rejeito salino contaminado com arsênio. *Ciência Florestal*, 27:871-881. <https://doi.org/10.5902/1980509828637>
- Havr E.A., McHale N.A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84:450-455. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- Hodges D., DeLong J., Forney C., Prange R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207:604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Huang H., Ullah F., Zhou D. X., Yi M., Zhao Y. (2019). Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in plant science*, 10:800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Jan S., Parray J.A. (2016) Metal Tolerance Strategy in Plants. In: Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1693-6_2
- Kar M., Mishra D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315-319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- Khan I., Ahmad A., Iqbal M. (2009) Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72:626-634. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.016>
- Kumar S.K., Ghosh S. (2013) Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 4(2):272-275. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.116964>

- Kuo M., Kao C. (2003) Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Rice Leaves. *Biologia Plantarum*, 46:149-152. <https://doi.org/10.1023/A:1022356322373>
- Kwak J.M., Nguyen V., Schroeder J.I. (2006) The Role of Reactive Oxygen Species in Hormonal Responses. *Plant Physiology*, 141:323-329. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079004>
- Lasat M.M. (2000) Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2:5-25. <https://doi.org/10.4148/1090-7025.1015>
- Liu W.X., Liu J.W., Wu M.Z., Li Y., Zhao Y., Li S.R. (2009) Accumulation and translocation of toxic heavy metals in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) growing in agricultural soil of Zhengzhou, China. *Bull Environ Contam Toxicol*, 82(3):343–347. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9575-6>
- Lima A.L.S., DaMatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R., Loureiro M.E. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canéfora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47(3):239-247. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00130-7)
- Maehley A.C., Chance B. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2:764-775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Maleki M., Ghorbanpour M., Kariman K. (2017) Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress, *Plant Gene*, 11(B):247-254. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.006>
- Marin A.R., Pezeshki S.R., Masschelen P.H., Choi H.S. (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *Journal of Plant Nutrition*, 16:865-880. <https://doi.org/10.1080/01904169309364580>
- Matos L.P., Andrade H.M., Marinato S.M., Prado I.G.O., Coelho D.G., Montoya S.G., Kasuya M.C.M, Oliveira J.A. (2020) Limitations to Use of *Cassia grandis* L. in the Revegetation of the Areas Impacted with Mining Tailings from Fundão Dam. *Water, Air & Soil Pollution*, 231:127. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04479-0>
- Meyer S., Genty B. (1999) Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic component by limitation of CO₂ diffusion. *Planta*, 210, 126-131. <https://doi.org/10.1007/s004250050661>

- Nascimento R., Deuner S., Ferreira L.S., Badinelli P.G., Kerber R.S. (2009) Crescimento e teores de clorofila e carotenoides em três cultivares de soja em função da adubação com magnésio. *Ceres*, 56, 364-369.
- Orlando M.T.D., Galvão E.S., Cavichini A. S., Rangel C.V.G.T., Orlando C.G.P., Grilo C.F., Soares J., Santos Oliveira K.S.S., Sá F., Junior A.C., Bastos A.C., Quaresma V.S. (2020) Tracing iron ore tailings in the marine environment: An investigation of the Fundão dam failure. *Chemosphere*, 257:127184. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127184>
- Ozfidan-Konakci C., Yildiztugay E., Bahtiyar M., Kucukoduk M. (2018) The humic acid-induced changes in the water status, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense systems of wheat leaves with cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 155:66-75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.071>
- Peixoto P.H.P., Cambraia J., Sant'ana R., Mosquim P.R., Moreira M.A. (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11:137-143.
- Cheng Peng C., Chen S., Shen C., He M., Zhang Y., Ye J., Liu J., Shi J. (2018) Iron Plaque: A Barrier Layer to the Uptake and Translocation of Copper Oxide Nanoparticles by Rice Plants. *Environ. Sci. Technol.* 52(21):12244-12254. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02687>
- Porter R.H., Durrell M., Romm H.J. (1947) The use of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a measure of seed germinability. *Plant Physiology*, 22:149-159. <https://doi.org/10.1104/pp.22.2.149>
- Pilon-Smits E. (2005) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol*, 56, 15-39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>
- Reis I.N.R.S., Oliveira J.A., Ventrella M.C., Otoni W.C., Marinato C.S., Matos L.P. (2019) Involvement of glutathione metabolism in *Eichhornia crassipes* tolerance to arsenic. *Plant Biology*, 22(2):346-350. <https://doi.org/10.1111/plb.12988>
- Renova Foundation (2019) Relatório de avaliação da qualidade do rejeito presente na Barragem do Fundão, em Mariana – MG, e na Usina Hidrelétrica Risoleta Neves (aterro de Candonga), em Rio Doce – MG. <https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2017/10/r001170373finalmcofundacaorenovafundaoecandongad09.pdf>
- Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gomez M., Del Rio L.A., Sandalio L.M. (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell and Environment*, 25:677–686. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00850.x>

- Shao J.F., Yamaji N., Shen R.F., Ma J.F. (2017) The key to Mn homeostasis in plants: regulation of Mn transporters. *Trends in Plant Science*, 22:215-224. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.005>
- Silveira N.M., Oliveira J.A., Ribeiro C., Canatto R.A., Siman L., Cambraia J., Farnese F. (2015) Nitric oxide attenuates oxidative stress induced by arsenic in lettuce (*Lactuca sativa*) leaves. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226:e379. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2630-0>
- Singh R., Parihar P., Singh S., Mishra R.K., Singh V.P., Prasad S.M. (2017) Reactive oxygen species signaling and stomatal movement: Current updates and future perspectives. *Redox Biology*, 11:213-218. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.006>
- Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. (2016) Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6:1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Singh H.P., Batish D.R., Kohli R.K., Arora K. (2007) Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation*, 53:65-73. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9205-z>
- Singh N., Ma L.Q., Srivastava M., Rathinasabapathi B. (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*, 170:274-282. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.08.013>
- Srivastava M., Ma L.Q., Singh N., Singh S. (2005) Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *Journal of Experimental Botany*, 56:1335-1342. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri134>
- Stahl W., Sies H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6):345-351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- Valentini R., Epron D., de Angelis P., Matteucci G. Dreyer E. (1995) In situ estimation of net CO² assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell & Environment*, 18(6), 631-640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00564.x>
- Waszczak C., Carmody M., Kangasjarvi J. (2018) Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 69:209-236. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>

- Waterborg J.H., Matthews H.R. (1984) The Lowry method for protein quantitation. In: Walker JM (eds) *Proteins. Methods in Molecular Biology*, 1. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:1>
- Wellburn A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wong M. (2003) Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50:775-780. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00232-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00232-1)
- Yadav V., Arif N., Kováč J., Singh V.P., Tripathi D.K., Chauhan D.K., Marek Vaculík M. (2021) Structural modifications of plant organs and tissues by metals and metalloids in the environment: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 159:100-112. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.047>
- Zhou Z., Zhang B., Liu H., Liang X., Ma W., Shi Z., Yang S. (2019) Zinc effects on cadmium toxicity in two wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) differing in grain cadmium accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183:109562. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109562>

Capítulo 3: Toxicidade de elementos metálicos e arsênio em *Cassia grandis* L.: espécie arbórea com potencial para fitorremediação

RESUMO

A interação de diferentes elementos metálicos pode promover efeitos sinérgicos ou antagônicos nos vegetais. O objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos da exposição de plantas de *C. grandis*, a diferentes elementos metálicos isolados e em misturas. Plantas com 40 dias foram mantidas por 48 horas em soluções nutritivas contendo elementos metálicos, isolados e em misturas. Foram analisados a composição mineral, taxas de trocas gasosas, fluorescência da clorofila, concentrações de pigmentos e de malondialdeído (MDA) e atividade de enzimas antioxidantes. Ocorreu tendência de acúmulo de metais nas raízes com baixa translocação de As para as folhas. As trocas gasosas, a transpiração, o rendimento do FSII e as taxas de transporte de elétrons foram reduzidas na presença de As isolado ou em mistura com outros elementos. As concentrações de clorofila *a* aumentaram nas plantas expostas aos elementos metálicos isolados e em misturas, já as concentrações de antocianinas aumentaram, especialmente, nos tratamentos que continham As. A presença de As reduziu a atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POX) e, aumentou a concentração de MDA. O aumento das concentrações de antocianinas atuou como parte do sistema antioxidante. Nas plantas expostas a combinação de elementos metálicos sem As ocorreu incremento da atividade de CAT e POX, sem alteração das concentrações de MDA. Os valores de trocas gasosas, fluorescência e concentrações de MDA, indicam que, na presença de As os sistemas de defesa antioxidante não foram suficientes para evitar os danos oxidativos.

Palavras-chave: Fitorremediação, metais pesados, interação.

INTRODUÇÃO

A crescente liberação, decorrente de diferentes atividades humanas, de elementos metálicos, como ferro (Fe), manganês (Mn) e chumbo (Pb) nos ecossistemas promove uma série de problemas ambientais, em especial pelo fato desses elementos não se degradarem com o tempo, permanecendo no ambiente e contaminando as cadeias alimentares, podendo inclusive contaminar populações humanas (Emamverdian et al. 2015, Singh et al. 2016).

A fitorremediação, que consiste na utilização de plantas na recuperação de ambientes contaminados, é uma técnica empregada por apresentar características como baixos custos, facilidade de implementação e adaptabilidade a diferentes situações (Ali et al. 2013). Porém, para que esse método seja eficiente, as plantas selecionadas necessitam apresentar características específicas, como a tolerância aos contaminantes, a capacidade de acúmulo, propagação fácil e rápida, sistema radicular extenso e alto ganho de biomassa (Xia & Ma 2006).

Porém, quando as plantas utilizadas no processo de fitorremediação são expostas a concentrações tóxicas de um elemento metálico, ocorre uma série de efeitos sobre os vegetais, como o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e alterações morfológicas e fisiológicas, podendo levar a danos e morte dos tecidos vegetais (Adrees et al. 2015). Cada elemento metálico, no entanto, apresenta características próprias como toxidez e solubilidade (Jiang et al. 2019) podendo influenciar de forma diferenciada a absorção e os efeitos nas plantas (Maleki et al. 2017).

Em geral, estudos envolvendo o efeito de elementos metálicos sobre plantas envolvem o estudo de um único elemento ou na combinação de poucos elementos (Ghori et al. 2019). No entanto, em áreas contaminadas raramente o elemento contaminante está isolado e, em alguns casos, como em regiões contaminadas por rejeitos de mineração, por exemplo, são encontrados vários elementos metálicos misturados em diferentes concentrações (Buch et al. 2021). Quando uma planta, utilizada na recuperação dessas áreas, é exposta a essas condições, a interação dos diferentes elementos pode promover efeitos sinérgicos ou antagônicos nos vegetais (Aihemaiti et al. 2018).

Várias espécies arbóreas já apresentaram potencial de fitorremediação de ambientes contaminados por rejeitos de mineração, como a leguminosa arbórea *Cassia grandis* L., que apresenta capacidade de fixação de nitrogênio e crescimento em solos contaminados (Guimarães et al. 2017, Matos et al. 2020).

Diante do exposto, este trabalho buscou analisar os efeitos da exposição de plantas de *C. grandis*, aos elementos metálicos ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As), isolados e em misturas, visando avaliar a capacidade de tolerância dessa espécie em relação a esses estressores.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes de *C. grandis*, adquiridas na Sociedade de Investigações Florestais (SIF), foram imersas em H₂SO₄ (95%), por 15 minutos, para quebra de dormência. Posteriormente foi realizado o teste de viabilidade com tetrazólio (Porter et al. 1947), onde 100 sementes foram embebidas em água destilada por 24 horas, imersas em solução de tetrazólio (0,05%), no escuro, a 30°C, por 8 horas, lavadas com água destilada e analisadas. As sementes coradas pelo tetrazólio foram consideradas viáveis e as coradas parcialmente ou não coradas inviáveis. Observou-se que as sementes apresentaram 90% de viabilidade.

Condições experimentais

Sementes de *C. grandis* foram imersas em H₂SO₄ (95%), por 15 minutos, para quebra de dormência, e germinadas em rolos de papel de germinação umedecidos com solução nutritiva de Clark modificada contendo (mM): Ca (2,6), K (1,8), Mg (0,6), NH₄-N (0,9), NO₃-N (6,9), S (0,6), P (0,069), Mn (0,007), B (0,019), Zn (0,002), Mo (0,0006), Cu (0,0005) e Fe (0,038) como ferro sódico (Fe³⁺) ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH 6,5. Após a emissão de radículas e cotilédones, as plântulas foram transplantadas para potes plásticos com capacidade de 2 L, contendo solução nutritiva com sistema de aeração e mantidas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2°C, 230 μmol s⁻¹ m⁻²), sob fotoperíodo de 12 horas, por 40 dias. Após esse período, foram aplicados os tratamentos, que consistiram, além do controle (apenas solução nutritiva), de tratamentos com acréscimo de elementos metálicos isolados ou em misturas (Tabela 1). As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C, 230 μmol s⁻¹ m⁻²), sob fotoperíodo de 12 horas, por 48 horas.

Tabela 1: Tratamentos e concentrações de elementos metálicos utilizados para análise de aspectos morfológicos e fisiológicos de plantas de *C. grandis*

Tratamento	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Controle	Solução nutritiva de Clark (SN)
T _{Fe}	SN + Fe (20)
T _{Mn}	SN + Mn (20)
T _{Zn}	SN + Zn (4)
T _{Pb}	SN + Pb (1,5)
T _{Cd}	SN + Cd (1,5)
T _{As}	SN + As (1,5)
T _{T-As}	SN + Fe (20), Mn (20), Zn (4), Pb (1,5) e Cd (1,5)
T _{T+As}	SN + Fe (20), Mn (20), Zn (4), Pb (1,5), Cd (1,5) e As (1,5)

Formas químicas dos elementos: Fe (FeEDTA), Mn (MnCl₂.4H₂O), Zn (Zn (SO₄).7H₂O), Pb ((CH₃CO₂)₂Pb.3H₂O), Cd (Cd (NO₃)₂.4H₂O) e As (Na₂HAsO₄.7H₂O).

Para definição dos elementos metálicos, suas concentrações e o pH utilizado nas soluções dos tratamentos, utilizou-se como base, dados referentes ao rompimento da Barragem de Fundão, que ocorreu em 2015, no município de Mariana, Minas Gerais, Brasil. O rompimento dessa barragem liberou cerca de 50 milhões de m³ de rejeitos de mineração de ferro que se misturaram a outros rejeitos já presentes no leito dos rios (Renova 2019, Coelho et al. 2020, Orlando et al. 2020, Duarte et al. 2021).

Determinação da concentração de elementos minerais

Amostras de folhas e raízes foram lavadas em água destilada e secos em estufa a 80 °C até peso constante. Aproximadamente 100 mg de massa seca foram triturados e submetidos à mineralização com 1,5 mL de mistura nítrico-perclórica (2:1), à temperatura de 130 °C, até a completa oxidação da matéria orgânica (Marin et al. 1993). As amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, analisadas por espectrometria de emissão atômica, no caso do potássio (K), e por espectrometria de absorção atômica, para ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), em espectrofotômetro de absorção atômica (Modelo AA-6701F, Shimadzu). Para a determinação de arsênio (As) foi utilizado gerador de vapor de hidretos (HVG-1 Shimadzu). As concentrações de fosfato inorgânico (Pi) foram determinados pelo o método do fosfomolibdato (Lindeman 1958).

Determinação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As taxas de assimilação de CO₂ (A - $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E - $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (gs - $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a concentração interna de CO₂ na câmara

substomatal ($C_i - \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram avaliadas em folíolos da porção mediana da primeira folha completamente desenvolvida, utilizando um analisador de gases em infravermelho (IRGA LICOR Li-6400 XT), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho modelo LI-6400-02B (LICOR), com intensidade luminosa de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 380 ppm de CO_2 , temperatura da câmara 28°C , sendo a área ocupada na câmara igual a $5,35 \text{ cm}^2$.

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando-se fluorômetro integrado à câmara do analisador (IRGA LICOR Li-6400 XT). Após serem adaptados ao escuro, por 30 min, folíolos foram expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de $6000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e duração de 0,8 s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida (F_m). Foi realizada, ainda, a estimativa da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), do rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}), a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), o *quenching* fotoquímico (qP) e o *quenching* não-fotoquímico (NPQ), conforme descrito em DaMatta et al. (2002) e Lima et al. (2002).

Determinação da concentração de pigmentos cloroplásticos e antocianina

Para a determinação da concentração de clorofila *a*, *b* e carotenóides, aproximadamente 100 mg de material vegetal fresco foram obtidos de folíolos da primeira folha completamente expandida. As amostras foram incubadas em 2 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio, em tubos de ensaio tampados e revestidos com papel alumínio. Após 24 horas de incubação, os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C , por 45 min, para solubilização dos pigmentos (Wellburn 1994). Após esse período, as absorvâncias da solução foram lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm, e utilizadas para a estimativa das concentrações dos pigmentos, calculados segundo as equações propostas por Arnon (1949), sendo os resultados expressos em mg g^{-1} MF (massa fresca).

Para determinação das concentrações de antocianinas, 100 mg de massa fresca de folíolos foram homogeneizadas em 5 mL de metanol- HCl 1% (v/v), em banho de gelo, e centrifugadas a 10.000 g por 30 min, a 4°C . O teor total de antocianina foi determinado pela diferença entre a absorvância a 536 e 600 nm (Hodges et al. 1999) e os resultados expressos em mg g^{-1} MF, como equivalentes de cianidina-3-glucosídeo, utilizando o coeficiente de extinção molar ($26900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

Determinação da peroxidação lipídica

Para análise de malondialdeído (MDA) com eliminação de interferente (antocianina), 100 mg de folhas e raízes, do controle, T_{T-As} e T_{T+As}, foram macerados em nitrogênio líquido e adicionados 2 mL de mistura etanol:água (80:20). Após a homogeneização e centrifugado 3000 g por 10 min, 4 °C, foi retirada alíquota de 0,5 mL do sobrenadante e adicionado a 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. Outra alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 0,5 mL da mistura TCA 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. As amostras foram mantidas em banho de aquecimento colocadas no banho, a 90°C, por 1 hora, seguido de resfriamento em banho de gelo. Realizou-se nova centrifugação, a 3000 g, por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante obtido foi utilizado para análises das absorvâncias a 440, 532 e 600 nm. Os resultados foram estimados utilizando as seguintes equações (Hodges et al. 1999):

$$[(\text{Abs } 532+\text{TBA})-(\text{Abs } 600+\text{TBA}) - (\text{Abs } 532-\text{TBA} - \text{Abs } 600-\text{TBA})] = A$$

$$[(\text{Abs } 440+\text{TBA} - \text{Abs } 600+\text{TBA}) 0.0571] = B$$

$$\text{MDA equivalente (nmol a ml}^{-1}\text{)} = (A - B/157\ 000) 10^{-6}$$

Os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ MF (massa fresca).

Avaliação das atividades enzimáticas antioxidativas

Amostras de 300 mg de folhas e raízes, do controle, T_{T-As} e T_{T+As}, foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL do meio de extração Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto et al. 1999), para dismutases do superóxido (SOD), catalases (CAT) e peroxidases (POX).

Os homogeneizados, depois de filtrados através de quatro camadas de gaze, foram centrifugados a 12.000 g por 15 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto e as atividades enzimáticas foram determinadas pela adição do extrato aos seguintes meios de reação: tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM, para a SOD (Giannopolitis & Ries 1977); tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM, para a CAT (Havir & McHale 1987) e tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM, para a POX (Kar & Mishra 1976).

Para a determinação da atividade da SOD, as amostras foram expostas a iluminação por 5 min e a absorvância foi medida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp &

Fridovich 1971). As atividades das enzimas CAT e POX foram estimadas pela leitura da absorvância durante o primeiro minuto de reação. Os seguintes coeficientes de extinção molar foram utilizados: CAT (240 nm, $\epsilon:36 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Anderson et al. 1995) e POX (420 nm, $\epsilon:2,47 \text{ mM L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Maehley & Chance, 1955).

A concentração de proteínas foi determinada por meio do método de Bradford, utilizando a albumina do soro bovino (BSA) como padrão para expressar a atividade enzimática (Waterborg & Matthews 1984).

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, compostos de 9 tratamentos e 4 repetições, sendo cada unidade experimental constituída de 2 plantas. Os resultados foram submetidos a teste de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk) e os considerados normais a análise de variância (ANOVA) seguido por teste de médias Scott-Knott ou de Tukey ($p < 0.05$). Os dados não paramétricos foram analisados por teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Os testes foram realizados utilizando-se o programa R (R.CORE TEAM).

RESULTADOS

O entendimento dos efeitos biológicos dos elementos metálicos atuando conjuntamente requer, previamente, o conhecimento da ação individualizada desses elementos. Assim, torna possível descrever, dentre aqueles utilizados nos tratamentos, qual ou quais têm maior toxicidade e, conseqüentemente, causam os maiores danos biológicos.

De modo geral, a exposição das plantas aos elementos, isoladamente, resultou em maiores concentrações desse elemento nas folhas e ou raízes. Contudo, outros elementos tiveram significativas reduções das concentrações nas raízes e folhas. As plantas expostas a T_{Fe} mostraram expressivas reduções nas concentrações de Mn e Zn, em folhas e raízes, o que pode ser devido ao elevado acúmulo de Fe nas raízes, dificultando a absorção desses elementos (Tabela 2). A exposição ao Mn também causou significativa redução no acúmulo de Zn e, em menor proporção, na absorção de Fe, Pi, Zn e Mg. O tratamento com Zn, por sua vez, resultou em maiores acúmulos de Mn e Fe nas folhas, com efeito negativo sobre o acúmulo de Mn nas raízes. Assim, observa-se que, de modo geral, esses elementos interagem entre si ocasionando, na maior parte das vezes, efeitos negativos sobre a absorção e acúmulo.

Outros elementos minerais, não utilizados como tratamentos no experimento, se beneficiaram da maior disponibilidade de Fe, Mn e Zn em solução, resultando em maiores concentrações de Ca e K nas raízes e folhas (Tabela 3). De modo geral, os efeitos dos elementos isoladamente apresentaram pequenas interferências nas concentrações dos minerais Ca, Mg, K e Pi., fazendo com que a homeostase nutricional se mantivesse similar ao controle.

Observa-se que os elementos tóxicos utilizados nos tratamentos, Pb, Cd e As, apresentaram significativa retenção nas raízes, com a retenção da quase totalidade do elemento absorvido, à exceção do As, em que, aproximadamente, 10% acumularam-se nas folhas. Nas plantas expostas a esses elementos, isoladamente, foi possível verificar uma tendência geral de efeitos, ocasionando, nas raízes, redução significativa nas concentrações dos elementos Mn e Zn e incremento na concentração de Fe. Nas folhas, no entanto, houve aumento na concentração de Mn e redução na concentração de Zn nos três tratamentos com elementos tóxicos. A concentração de Fe nas folhas teve acréscimo nos tratamentos com Pb e Cd e redução nas plantas expostas ao As.

Para os demais nutrientes, os efeitos tóxicos do Pb, Cd e As foram relativamente menos pronunciados, destacando-se os acréscimos nas concentrações de Ca, nas folhas e raízes, e a redução na concentração de Mg nas raízes (Tabela 3).

A exposição das plantas ao tratamento contendo a mistura de elementos metálicos sem As (T_{T-As}) ocorreu aumento nas concentrações de Fe, Mn, Zn, Pb e Cd nas plantas, à exceção da redução na concentração de Fe e ausência detectável de Cd nas folhas. Nas raízes dessas plantas, entretanto, a interação entre os elementos promoveu significativa redução nas concentrações de Pb e Cd em comparação aos tratamentos com os respectivos elementos utilizados isoladamente, diminuindo 80% e 45%, respectivamente (Tabela 2). De modo geral, para os demais elementos minerais, representados na Tabela 3, ocorreram interferências negativas no acúmulo de Ca, Mg e Pi, em folhas e raízes, diferentemente do K, cujas concentrações aumentaram nesse tratamento.

Nas plantas expostas à mistura de elementos metálicos com As (T_{T+As}), as concentrações de Fe (folhas e raízes), Mn (raízes) e Zn (folhas e raízes) aumentaram significativamente, alcançando valores superiores àqueles dos tratamentos com os elementos utilizados separadamente. A concentração de Pb teve redução significativa em relação aos tratamentos com Fe isoladamente e na mistura sem As, sendo detectado apenas nas raízes. A concentração de Cd foi, aproximadamente, duas vezes maior do que nas plantas expostas ao T_{T-As} , alcançando valores semelhantes àqueles das plantas expostas somente ao Cd. Da mesma forma que ocorreu com os demais elementos, observou maior acúmulo de As nas raízes, mas, no tratamento com a mistura dos metais, a proporção foi significativamente aumentada, ficando cerca de 97% retido nas raízes. (Tabela 2).

Nas plantas expostas a mistura de elementos metálicos com As (T_{T+As}), as concentrações de Fe e Zn aumentaram e de Mn não foi afetado nas folhas. Em raízes, as concentrações de Fe, Mn e Zn aumentaram. Concentrações de Pb foram detectados apenas nas raízes, sendo 8 vezes menores do que os observados nas plantas submetidas ao elemento isolado. Concentrações de Cd foram observados apenas em raízes, sendo semelhantes aos observados em plantas expostas ao elemento isolado, porém 2 vezes maiores do que nas plantas expostas ao T_{T-As} . As concentrações de As raízes dessas plantas foram 47 vezes maiores do que nas folhas, porém 2,5 vezes menores do que nas raízes das plantas submetidas ao elemento isolado (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca) de elementos metálicos em folhas e raízes de *C. grandis*, cultivadas por 48 horas em solução nutritiva (controle) e solução nutritiva contendo elementos metálicos isolados e em mistura

Tratamentos	Folhas					
	Fe	Mn	Zn	Pb	Cd	As
Controle	232,63 ± 16,82 c	164,25 ± 8,05 e	25,24 ± 1,17 bcd	ND	ND	ND
T _{Fe}	150,94 ± 11,88 f	117,96 ± 10,64 f	16,51 ± 0,97 ef	ND	ND	ND
T _{Mn}	181,02 ± 17,88 e	407,33 ± 20,21 a	15,57 ± 1,38 f	ND	ND	ND
T _{Zn}	235,96 ± 10,23 c	298,92 ± 17,55 c	30,43 ± 3,01 ab	ND	ND	ND
T _{Pb}	197,73 ± 15,20 d	193,46 ± 8,93 d	19,61 ± 2,23 ef	21,08 ± 4,18 A	ND	ND
T _{Cd}	194,34 ± 19,95 d	185,18 ± 11,78 d	20,51 ± 1,87 cde	ND	ND	ND
T _{As}	276,96 ± 23,04 b	188,85 ± 17,46 d	20,03 ± 1,92 de	ND	ND	2,64 ± 0,32 B
T _{T-As}	140,00 ± 11,55 f	329,11 ± 13,24 b	35,75 ± 1,74 ab	17,45 ± 3,38 A	ND	ND
T _{T+As}	351,72 ± 16,62 a	167,70 ± 6,91 e	66,73 ± 4,88 a	ND	ND	4,17 ± 0,46 A
Tratamentos	Raízes					
	Fe	Mn	Zn	Pb	Cd	As
Controle	194,20 ± 9,07 f	30,94 ± 2,29 c	71,76 ± 4,53 c	ND	ND	ND
T _{Fe}	755,59 ± 24,60 b	5,48 ± 0,86 g	20,86 ± 1,28 f	ND	ND	ND
T _{Mn}	209,16 ± 11,57 f	410,76 ± 25,11 b	37,30 ± 3,59 e	ND	ND	ND
T _{Zn}	299,61 ± 15,78 d	11,65 ± 2,28 e	335,79 ± 15,97 a	ND	ND	ND
T _{Pb}	259,59 ± 17,67 e	16,17 ± 1,82 d	41,74 ± 2,88 cd	1964,62 ± 96,76 A	ND	ND
T _{Cd}	231,90 ± 12,83 f	8,51 ± 1,50 f	30,51 ± 4,96 ef	ND	137,93 ± 12,72 A	ND
T _{As}	313,12 ± 16,20 d	9,61 ± 1,74 f	38,74 ± 3,20 de	ND	ND	26,56 ± 3,44 B
T _{T-As}	524,86 ± 26,25 c	403,18 ± 22,78 b	216,17 ± 9,21 ab	368,59 ± 28,73 B	76,35 ± 8,33 B	ND
T _{T+As}	2026,15 ± 26,93 a	795,03 ± 24,19 a	196,76 ± 11,85 bc	250,76 ± 26,66 B	138,02 ± 9,17 A	159,90 ± 6,16 A

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott, para as variáveis Fe e Mn, teste de Kruskal-Wallis, para Zn, e Tukey, para Pb, Cd e As com 5% de probabilidade.

Tabela 3: Concentrações (mg g^{-1} de massa seca) de nutrientes em folhas e raízes de *C. grandis*, cultivadas por 48 horas em solução nutritiva (controle) e em solução nutritiva, contendo elementos metálicos isolados e em mistura

Tratamento	Folhas			
	Ca	Mg	K	Pi
Controle	10,21 ± 0,56 d	2,07 ± 0,12 a	10,64 ± 0,51 d	2,67 ± 0,24 a
T _{Fe}	15,26 ± 1,22 c	1,89 ± 0,16 a	12,21 ± 0,43 c	2,82 ± 0,24 a
T _{Mn}	19,28 ± 1,24 a	1,76 ± 0,08 a	13,27 ± 0,49 b	2,30 ± 0,09 b
T _{Zn}	14,69 ± 0,60 c	1,92 ± 0,09 a	13,81 ± 0,70 b	2,65 ± 0,20 a
T _{Pb}	19,23 ± 0,82 a	1,88 ± 0,09 a	16,48 ± 0,80 a	2,60 ± 0,25 a
T _{Cd}	11,65 ± 0,84 d	1,82 ± 0,19 a	8,66 ± 0,86 e	2,30 ± 0,10 b
T _{As}	16,91 ± 0,71 b	1,91 ± 0,08 a	14,96 ± 1,00 b	2,26 ± 0,28 b
T _{T-As}	6,25 ± 1,00 e	1,50 ± 0,11 b	14,01 ± 0,95 b	1,59 ± 0,28 c
T _{T+As}	3,24 ± 0,32 f	1,70 ± 0,15 ab	17,21 ± 0,65 a	1,47 ± 0,10 c
Tratamentos	Raízes			
	Ca	Mg	K	Pi
Controle	4,67 ± 0,47 c	1,28 ± 0,14 a	12,07 ± 0,85 c	1,96 ± 0,10 a
T _{Fe}	4,71 ± 0,48 b	1,15 ± 0,11 a	16,70 ± 1,15 ab	1,80 ± 0,14 a
T _{Mn}	4,70 ± 0,14 b	1,00 ± 0,10 b	20,77 ± 1,55 a	1,65 ± 0,26 a
T _{Zn}	6,04 ± 0,29 ab	1,10 ± 0,06 a	16,50 ± 1,51 b	1,61 ± 0,17 a
T _{Pb}	6,47 ± 0,33 a	0,98 ± 0,06 b	20,51 ± 1,47 a	1,66 ± 0,18 a
T _{Cd}	4,95 ± 0,66 b	1,04 ± 0,06 b	13,56 ± 1,41 c	1,74 ± 0,10 a
T _{As}	6,81 ± 0,35 a	0,91 ± 0,09 b	13,56 ± 1,43 c	1,58 ± 0,21 a
T _{T-As}	3,26 ± 0,42 cd	0,96 ± 0,09 b	18,27 ± 0,60 ab	1,83 ± 0,15 a
T _{T+As}	2,02 ± 0,24 d	1,17 ± 0,08 a	13,02 ± 0,96 c	0,88 ± 0,17 b

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott, para Ca (folhas), Mg (folhas e raízes), K (folhas), Pi (folhas e raízes) e teste de Kruskal-Wallis, para Ca (raízes) e K (raízes) com 5% de probabilidade.

Os tratamentos com As, isolado ou com outros metais, afetaram drasticamente os parâmetros fotossintéticos, o que impossibilitou a quantificação da taxa de fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s) e transpiração (E). A concentração interna de CO_2 (C_i), por sua vez, registrou aumento significativo, alcançando valores duas vezes maiores do que o controle. O tratamento contendo os metais, mas sem As, promoveu redução na taxa de fotossíntese líquida e aumento na condutância estomática, mas em proporções menores do que aquelas observadas para os tratamentos contendo As. Isoladamente, os demais metais causaram pequenas alterações nos parâmetros fotossintéticos evidenciando que, dentre os elementos utilizados, o As foi o que apresentou o maior potencial de fitotoxicidade. Mesmo quando aplicado de forma isolada, o As demonstrou maior toxicidade do que todos os demais metais, isolados ou aplicados em mistura (Tabela 4).

Tabela 4: Taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração interna de CO_2 (C_i) em plantas de *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução nutritiva contendo elementos metálicos isolados ou em mistura

Tratamento	A ($mmol CO_2 m^{-2} s^{-1}$)	g_s ($mol H_2O m^{-2} s^{-1}$)	C_i ($mol CO_2$)	E ($mmol H_2O m^{-2} s^{-1}$)
Controle	10,53 ± 0,64 a	0,14 ± 0,02 a	275,05 ± 4,92 c	2,27 ± 0,08 c
T _{Fe}	9,52 ± 0,82 a	0,14 ± 0,02 a	281,92 ± 10,79 c	2,52 ± 0,04 b
T _{Mn}	9,47 ± 0,98 a	0,13 ± 0,01 b	275,58 ± 9,92 c	2,34 ± 0,09 c
T _{Zn}	10,25 ± 0,36 a	0,13 ± 0,01 b	281,73 ± 9,04 c	2,52 ± 0,08 b
T _{Pb}	10,11 ± 0,50 a	0,14 ± 0,01 a	278,59 ± 11,54 c	2,72 ± 0,08 a
T _{Cd}	9,98 ± 0,50 a	0,12 ± 0,01 b	267,51 ± 4,58 c	2,29 ± 0,04 c
T _{As}	-	-	544,53 ± 12,20 a	-
T _{T-As}	7,14 ± 0,63 b	0,14 ± 0,01 a	309,51 ± 12,16 b	2,14 ± 0,07 d
T _{T+As}	-	-	554,55 ± 16,25 a	-

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott 5% de probabilidade.

Os parâmetros rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm), *quenching* não fotoquímico (NPQ), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ϕ_{PSII}) e *quenching* fotoquímico (qP), de forma semelhante aos parâmetros anteriores, apresentaram as maiores alterações nos tratamentos contendo As, com significativo aumento do NPQ e reduções do Fv/Fm, ϕ_{PSII} e qP. Embora de forma menos intensa, a aplicação dos metais, sem o As, alterou os valores de NPQ, ϕ_{PSII} e qP, sem, contudo, afetar a relação Fv/Fm. Torna-se, dessa forma, evidente, a predominância do As em causar as maiores alterações no aparato fotossintético (Tabela 5).

Tabela 5: Rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ϕ_{PSII}) (B), *quenching* não fotoquímico (NPQ) (C) e *quenching* fotoquímico (qP) (D) em *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução nutritiva contendo elementos metálicos isolados e em mistura

Tratamento	Fv/Fm	NPQ	ϕ_{PSII}	qP
Controle	0,79 ± 0,01 a	0,95 ± 0,05 b	0,35 ± 0,02 a	0,58 ± 0,02 a
T _{Fe}	0,79 ± 0,01 a	1,04 ± 0,10 b	0,28 ± 0,03 c	0,52 ± 0,02 b
T _{Mn}	0,79 ± 0,02 a	1,03 ± 0,13 b	0,29 ± 0,01 c	0,53 ± 0,03 b
T _{Zn}	0,78 ± 0,01 a	0,95 ± 0,03 b	0,32 ± 0,02 a	0,54 ± 0,03 b
T _{Pb}	0,78 ± 0,02 a	1,06 ± 0,11 b	0,31 ± 0,03 a	0,56 ± 0,03 a
T _{Cd}	0,79 ± 0,02 a	1,19 ± 0,08 ab	0,32 ± 0,01 a	0,56 ± 0,01 a
T _{As}	0,76 ± 0,01 b	1,59 ± 0,10 a	0,11 ± 0,01 d	0,23 ± 0,02 d
T _{T-As}	0,78 ± 0,01 a	1,04 ± 0,09 b	0,28 ± 0,01 c	0,49 ± 0,03 c
T _{T+As}	0,65 ± 0,02 c	1,54 ± 0,03 a	0,09 ± 0,01 d	0,20 ± 0,01 d

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott 5% de probabilidade.

Apesar do reduzido tempo de exposição das plantas aos metais (48 h) foi possível verificar aumento na concentração de clorofila *a*, em todos os tratamentos, comparados com o controle, e de antocianinas, nas plantas expostas ao As, isolado ou em conjunto com os demais metais (Tabela 6).

Tabela 6: Concentrações de clorofila *a*, *b*, carotenóides e antocianinas em plantas de *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução nutritiva contendo elementos metálicos isolados e em mistura

Tratamento	Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹ MF)	Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹ MF)	Carotenóides (mg g ⁻¹ MF)	Antocianinas (mg g ⁻¹ MF)
Controle	2,78 ± 0,17 b	1,80 ± 0,18 a	1,10 ± 0,08 a	140,62 ± 4,68 c
T _{Fe}	3,82 ± 0,19 a	2,33 ± 0,18 a	1,30 ± 0,05 a	153,09 ± 9,20 bc
T _{Mn}	3,72 ± 0,40 a	2,29 ± 0,19 a	1,30 ± 0,09 a	140,29 ± 10,66 c
T _{Zn}	3,49 ± 0,40 a	2,24 ± 0,26 a	1,31 ± 0,17 a	150,22 ± 12,39 bc
T _{Pb}	3,79 ± 0,18 a	2,36 ± 0,16 a	1,34 ± 0,22 a	150,05 ± 16,65 bc
T _{Cd}	3,23 ± 0,59 a	2,17 ± 0,22 a	1,37 ± 0,12 a	132,32 ± 6,38 c
T _{As}	3,25 ± 0,32 a	2,19 ± 0,26 a	1,41 ± 0,25 a	214,07 ± 24,70 ab
T _{T-As}	3,80 ± 0,14 a	2,31 ± 0,26 a	1,37 ± 0,08 a	180,26 ± 4,59 ab
T _{T+As}	3,60 ± 0,43 a	2,38 ± 0,25 a	1,57 ± 0,25 a	297,97 ± 20,78 a

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott 5% de probabilidade.

As alterações bioquímicas no sistema enzimático antioxidante demonstraram que a ação tóxica do As reduziu a atividade das enzimas dismutases do superóxido (SOD), catalases (CAT) e peroxidases (POX) e, em consequência, ocorreram danos biológicos oxidativos, resultantes da ação das espécies reativas de oxigênio, demonstrados pela elevada concentração de MDA (Figura 1). No tratamento com os demais metais, sem As, verificou-se o incremento da atividade das enzimas CAT e POX, o que atenuou os danos às membranas causados pelo excesso de ROS, fazendo com as concentrações de MDA se mantivessem em valores similares ao controle.

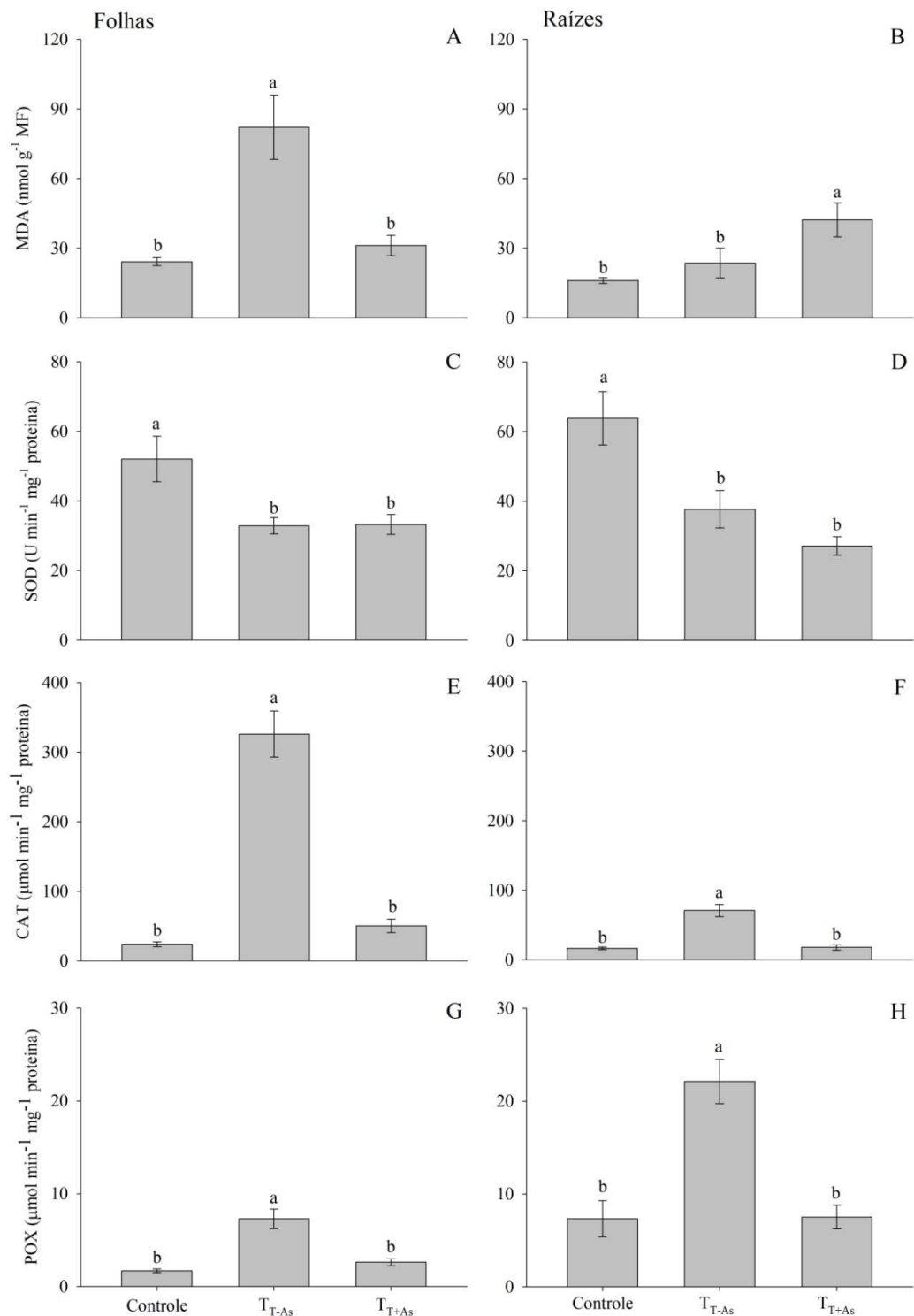


Figura 1: Concentrações de malondialdeído (MDA) e atividade de dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POX) em folhas (A, C, E e G) e raízes (B, D, F e H) de *C. grandis* mantidas por 48 h em solução nutritiva (controle) e solução nutritiva contendo elementos metálicos isolados e em mistura Médias seguidas pela mesma letra não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A extensão dos danos provocados nas raízes das plantas expostas ao As limitou a translocação dos metais para a folha e, em consequência, as atividades das enzimas se mantiveram semelhantes ao controle, assim como a concentração de MDA. No tratamento sem As, no entanto, ocorreu maior translocação de metais para as folhas, especialmente Mn e Pb, o que resultou em aumento da atividade das enzimas CAT e POX. Entretanto, mesmo com o incremento na atividade enzimática antioxidante, não foi possível evitar que corresse danos às membranas celulares, causados pelos ROS.

DISCUSSÃO

A exposição das plantas a vários elementos, simultaneamente, reflete mais apropriadamente as condições do ambiente, especialmente quando submetido a impactos decorrentes de rejeitos de mineração, com concentrações elevadas de componentes químicos diversos, como os metais e arsênio (Duarte et al. 2021). A interação entre elementos metálicos, influenciando na solubilidade, disponibilidade e absorção pelas plantas, tem sido avaliada em várias espécies vegetais, mas, na maioria dos casos relacionam a interação de apenas dois elementos e, raramente, consideram múltiplas interações (Veloso et al. 1995, El-Jaoual & Cox 1998, Jan & Parray 2016).

Evidências dessas interações foram observadas na exposição das plantas às altas concentrações de Fe que, além dos efeitos deletérios em função da absorção e acúmulo desse elemento nos tecidos, pode ocorrer a formação de placas nas raízes, em função da precipitação do metal (Saaltink et al. 2017) e, com isso, afetar a absorção de outros minerais. Esse fato explica as elevadas concentrações de Fe nas plantas de *C. grandis* expostas ao tratamento com Fe (T_{Fe}), especialmente nas raízes, mas que não se refletiram em aumento nas folhas. A formação dessas placas de Fe pode explicar a redução das concentrações de Mn e Zn das plantas expostas a T_{Fe} , como já observado em *Glyceria spiculosa* (Jia et al. 2018, Barzana et al. 2020). No entanto, a formação de placas de Fe nas raízes não alterou o acúmulo dos demais elementos minerais, assim como observado em plantas *Typha latifolia* expostas aos elementos Pb, Cd e Zn (Ye et al. 1998). Os elementos Fe e Mn interagem negativamente, com um interferindo na absorção do outro (Tanaka & Navasero 1966). O Zn, por sua vez, a despeito da reduzida absorção de Mn raízes, resultou em maior acúmulo nas folhas, assim como de Ca e K.

Dentre os elementos estudados, o Pb apresentou o maior fator de bioacumulação, especialmente nas raízes, com concentrações de $1964 \mu\text{g g}^{-1}$ MS nas plantas expostas ao tratamento com $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Pb. Mesmo nos tratamentos com outros elementos metálicos (T_{As} e T_{+As}) as concentrações de Pb foram significativamente elevadas, com predominância de retenção nas raízes. Embora os metais, de forma geral, fiquem mais retidos nas raízes (Xue et al. 2020), à exceção do Mn, o Pb foi, juntamente com o Cd, o elemento com menor translocação para as folhas. A menor absorção observada nos tratamentos conjuntos com outros elementos é resultado tanto das interações que desfavorecem a absorção como dos danos tóxicos ocorridos nas raízes.

A exposição a vários elementos tóxicos, simultaneamente, de modo geral, reduz a absorção de cada um, comparando-se com as formas individuais de tratamento (Huang et al. 2017), assim como de nutrientes, como o Ca e o Mg. Entretanto, deve-se considerar que a ação desses vários elementos no meio celular pode potencializar os efeitos tóxicos, reduzindo a capacidade de tolerância das plantas e, conseqüentemente, a possibilidade de estabelecimento em áreas contaminadas.

No presente trabalho, tornou-se evidente que a presença do As no tratamento conjunto dos metais causou sérios danos estruturais e fisiológicos (Referências), resultando em descontrole dos processos de absorção pelas raízes e, em consequência, ocorreram concentrações mais elevadas de alguns elementos em comparação aos tratamentos dos metais separadamente.

Os parâmetros de produtividade primária, representados pelos valores de A , g_s , E e C_i , foram significativamente afetados pela presença de As nos tratamentos, evidenciando o potencial tóxico desse elemento. A inibição de trocas gasosas, observada pelas quedas nos valores de A , g_s e E , associada à elevação dos valores de C_i , estão associados aos efeitos tóxicos do As sobre o aparato fotossintético, causando alterações estruturais e bioquímicas, conforme relatado em *Pteris vittata* e *Zea mays* (Li et al. 2006, Anjum et al. 2017). A mistura dos demais elementos, sem o As, também afetaram significativamente os parâmetros de trocas gasosas, mas de forma menos intensa do que os tratamentos com As. Isso evidencia o potencial de sinergismo da ação tóxica dos elementos, cujos efeitos sobre as plantas foram mais pronunciados do que os elementos utilizados separadamente, provavelmente pela elevação das concentrações celulares de ROS, que causaram danos estruturais às membranas e cloroplastos. Esses danos celulares são comuns a elementos metálicos tóxicos (Küpper & Andresen 2016) sem, contudo, apresentar efeitos específicos para determinado componente. Estudos relatam danos semelhantes em plantas expostas a excesso de Fe (Pinto et al. 2016), Mn (Chen et al. 2015), Zn (Paunov et al. 2018), Cd (Liu et al. 2017), Pb (Kumar & Prasad 2018) e As (Arti et al. 2019). Ressalta-se que, nesses casos, os menores limiares de toxicidade estão relacionados aos elementos sem função biológica definida, como o Pb, Cd e As.

Os danos celulares causados por metais afetam a fase bioquímica da fotossíntese, demonstrado pelas alterações nas trocas gasosas, e a fase fotoquímica, conforme resultados da fluorescência da clorofila *a*, expressos pelos valores do rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), *quenching* não fotoquímico (NPQ), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}) e *quenching* fotoquímico (qP). Dessa forma, a redução nos valores de

Φ_{FSII} do qP permitem inferir que a exposição das plantas aos metais, com ou sem As, promoveu inibição da dissipação de energia por transporte de elétrons, indicando danos ao sistema fotossintético, conforme evidenciado por Romero-Puertas et al. (2002). A presença do As, isoladamente ou em mistura com os demais metais, afetou de forma acentuada todos os parâmetros fotoquímicos, indicando severo dano fotoinibitório (Muñoz et al. 2018).

Os pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, *b* e carotenoides são sensíveis à presença de contaminantes metálicos, com consequências diretas sobre o processo de captação de energia na fotossíntese (Stahl & Sies 2003, Singh et al. 2006). Em *C. grandis*, no entanto, no período avaliado, não foram observadas alterações nas concentrações desses pigmentos, indicando que os efeitos observados nos parâmetros fotossintéticos não estavam diretamente relacionados à disponibilidade desses pigmentos. Porém, o aumento nas concentrações de antocianinas nas plantas expostas ao As, isolado e em mistura, assim como no tratamento com os demais elementos conjuntamente, evidencia a resposta antioxidante expressada por essa espécie (Davies et al. 2018). O aumento nas concentrações desse pigmento pode estar relacionado, também, as menores concentrações de Pi observados nessas plantas, conforme observado por Matos et al. (2020), uma vez que a redução na disponibilidade de Pi induz a expressão do gene relacionado à síntese de antocianinas (Vasconcelos et al. 2018).

A indução do estresse oxidativo é uma característica comum à toxicidade imposta por elementos metálicos, por meio do desequilíbrio gerado entre a produção e eliminação das ROS, afetando negativamente os processos metabólicos e fisiológicos nos vegetais, como a fotossíntese, a respiração e balanço hormonal (Shao et al. 2017, Shen et al. 2020). Contudo, as plantas possuem sistemas de proteção por meio de substâncias antioxidantes, como as antocianinas (Referência), e enzimas que degradam esses agentes oxidativos (Silveira et al. 2015).

Dentre essas enzimas, a dismutase do superóxido (SOD) atua para manter em baixas concentrações o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), atuando em sua conversão em O_2 e H_2O_2 (Ahmad et al. 2008). No entanto, concentrações tóxicas de elementos metálicos podem levar à inativação dessa enzima por excesso de ROS (Khan *et al.* 2009), o que pode explicar a redução na atividade dessa enzima observado nos tratamentos em que as plantas foram expostas a múltiplos metais.

Adicionalmente à SOD, as enzimas catalases (CAT) e peroxidases (POX) participam na remoção de H_2O_2 que, apesar de menos tóxico que o $O_2^{\bullet-}$, em excesso pode causar oxidação de componentes e estruturas celulares (Willekens et al. 1997, Srivastava et al. 2005). Dessa forma, o aumento na atividade dessas enzimas em raízes e folhas expostas à mistura de metais, sem

As, indicam a participação ativa na proteção antioxidante. A presença do As, no entanto, devido ao potencial de toxicidade, causou significativa redução na atividade, impossibilitando a atuação como agentes protetores da ação tóxica dos ROS, o que resultou em peroxidação lipídica de membranas (Singh et al. 2007).

A peroxidação lipídica, que consiste na degradação oxidativa de lipídios de membrana, pode ser avaliada de forma eficiente pela medição de concentrações de MDA (Aguiar-Silva et al. 2016). Dessa forma, o aumento das concentrações de MDA nas folhas e raízes indica que está ocorrendo danos aos tecidos nesses órgãos. Nas plantas expostas a misturas de elementos metálicos sem As as concentrações de MDA foram maiores nas folhas, o que pode indicar que nessas plantas os danos podem ter sido resultantes dos maiores acúmulos de Mn e Pb. No caso das plantas expostas a mistura de elementos metálicos com As, os severos danos às raízes, evidenciado pelas concentrações de MDA, implicou na menor translocação dos elementos metálicos para as folhas e maior acúmulo nas raízes, causando maiores danos bioquímicos e estruturais.

CONCLUSÕES

Isoladamente, conclui-se que os elementos apresentam efeitos antagônicos na absorção e acúmulo pelas plantas, o que fica evidente quando se analisa conjuntamente todos os elementos. A exposição das plantas a vários elementos metálicos, simultaneamente, incorre em menor absorção dos elementos comparados aos tratamentos de forma isolada. Entretanto, os efeitos na planta apresentam uma característica sinérgica, o que potencializa a toxicidade desses elementos.

A espécie *C. grandis* apresentou tolerância à exposição aos elementos metálicos, com exceção do metalóide As, o qual promoveu decréscimo significativo dos parâmetros fotossintéticos. A tolerância aos metais fica evidente na manutenção das atividades fotossintéticas e das concentrações dos pigmentos cloroplastídicos, aliados à indução das enzimas antioxidantes CAT e POX.

Em que pese a dificuldade em elucidar especificamente os efeitos biológicos inerentes a cada elemento metálico, ressaltamos que a exposição das plantas aos vários elementos, conforme ocorre em condições ambientes naturais, fornece um cenário mais apropriado para avaliar as potencialidades da espécie em ações de revegetação de áreas contaminadas.

REFERÊNCIAS

- Adrees M., Ali S., Rizwan M., Ibrahim M., Abbas F., Farid M., Zia-ur-Rehman M., Irshad M. K., Bharwana S.A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11):8148-8162. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>
- Aguiar-Silva C., Brandão S.E., Domingos M., Bulbovas P. (2016) Antioxidant responses of Atlantic Forest native tree species as indicators of increasing tolerance to oxidative stress when they are exposed to air pollutants and seasonal tropical climate. *Ecological Indicators*, 63:154-164. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.11.060>
- Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51:167-173. <https://doi.org/10.1007/BF03030694>
- Aihemaiti A., Jiang J., Li D., Liu N., Yang M., Meng Y., Zou Q. (2018) The interactions of metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *Journal of Environmental Management*, 222:216-226. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.081>
- Ali H., Khan E., Sajad M.A. (2013) Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91:869-881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Anderson M.D., Prasad T.K., Stewart C.R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109(4):1247-1257. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247>
- Anjum S.A., Tanveer M., Hussain S., Ashraf U., Khan I., Wang L. (2017) Alteration in Growth, Leaf Gas Exchange, and Photosynthetic Pigments of Maize Plants Under Combined Cadmium and Arsenic Stress. *Water Air Soil Pollut*, 228:13. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3187-2>
- Arnon D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1): 1-15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Arti G., Kumar P.A., Shanker D.R. (2019) Effect of Arsenic Toxicity on Photosynthesis, Oxidative Stress and Alleviation of Toxicity with Herbal Extracts in Growing Rice Seedlings. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 32(2):143-148. <https://doi.org/10.5958/0974-4479.2019.00019.4>

- Barzana G., Rios J.J., Lopez-Zaplana A., Nicolas-Espinosa J., Yepes-Molina L., Garcia-Ibañez P., Carvajal M. (2020) Interrelations of nutrient and water transporters in plants under abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, accepted article. <https://doi.org/10.1111/ppl.13206>
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44:276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Buch A.C., Niemeyer J.C., Marques E.D., Silva-Filho E.V. (2021) Ecological risk assessment of trace metals in soils affected by mine tailings. *Journal of Hazardous Materials*, 403:123852, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123852>
- Carlberg I., Mannervik B. (1985) Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113:484-495. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4)
- Chen, Z., Sun, L., Liu, P., Liu, G., Tian, J., and Liao, H. (2015). Malate synthesis and secretion mediated by a Mn enhanced malate dehydrogenase, SgMDH1, confers superior Mn tolerance in *Stylosanthes guianensis*. *Plant Physiol.* 167:176-188. <https://doi.org/10.1104/pp.114.251017>
- Coelho D.G., Marinato C.S., Matos L.P., Andrade V.M., Neves P.H.S., Oliveira J.A. (2020) Evaluation of Metals in Soil and Tissues of Economic-Interest Plants Grown in Sites Affected by the Fundão Dam Failure in Mariana, Brazil. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(5):596-607. <https://doi.org/10.1002/ieam.4253>
- DaMatta F.M., Loos R.A., Silva E.A., Loureiro M.E. (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*, 159:975-981. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00807>
- Davies, K. M., Albert, N.W., Zhou, Y., & Schwinn, K. E. (2018). Functions of flavonoid and betalain pigments in abiotic stress tolerance in plants. *Annual Plant Reviews*, 1:1-41. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0604>
- Duarte E.B., Neves M.A., Oliveira F.B., Martins M.E., Oliveira C.H.R., Burak D.L., Orlando M.T.D., Rangel C.V.G.T. (2021) Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. *Chemosphere*, 262:127879. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127879>
- Emamverdian A., Ding Y., Mokhberdoran F., Xie Y. (2015) Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World Journal*, 2015:eID756120. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>

- El-Jaoual T., Cox D.A. (1998) Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2):353-386. <https://doi.org/10.1080/01904169809365409>
- Ghori N.-H., Ghori T., Hayat M.Q., Imadi S.R., Gul A., Altay V., Ozturk M. (2019) Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16:1807-1828. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977) Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59:309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Guimarães L.A.D.O.P., Assis I.R., Dias L.E., Cordeiro A.L., Freire A.S. (2017) Espécies arbóreas potenciais para a revegetação de rejeito salino contaminado com arsênio. *Ciência Florestal*, 27:871-881. <https://doi.org/10.5902/1980509828637>
- Havir E.A., McHale N.A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84:450-455. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- Hodges D., DeLong J., Forney C., Prange R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207:604–611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Huang Q., Na H., Yang Y., Liang Y., Shao G. (2017) Effects of Mn-Cd antagonistic interaction on Cd accumulation and major agronomic traits in rice genotypes by different Mn forms. *Plant Growth Regul*, 82:317-331. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0261-8>
- Jan S., Parray J.A. (2016) Metal Tolerance Strategy in Plants. In: Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1693-6_2
- Jia X., Otte M.L., Liu Y., Qin L., Tian X., Lu X., Jiang M., Zou Y. (2018) Performance of Iron Plaques of Wetland Plants for Regulating Iron, Manganese, and Phosphorus from Agricultural Drainage Water. *Water*, 10:42. <https://doi.org/10.3390/w10010042>
- Jiang B., Adebayo A., Jia J., Xing Y., Deng S., Guo L., Liang Y., Zhang D. (2019) Impacts of heavy metals and soil properties at a Nigerian e-waste site on soil microbial community. *Journal of Hazardous Materials*, 362:187-195. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.060>
- Kar M., Mishra D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315-319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>

- Khan I., Ahmad A., Iqbal M. (2009) Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72:626-634. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.016>
- Kumar A., Prasad M.N.V. (2018) Plant-lead interactions: Transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166:401-418. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.113>
- Küpper H., Andresen E. (2016) Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 8(3):269-285. <https://doi.org/10.1039/c5mt00244c>
- Li W. X., Chen T.B., Huang Z. C., Lei M., Liao X.Y. (2006) Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Chemosphere*, 62:803-809. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.055>
- Lima A.L.S., DaMatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R., Loureiro M.E. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canéfora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47(3):239-247. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00130-7)
- Liu H., Zhang C., Wang J., Zhou C., Feng H., Mahajan M.D., Han X. (2017) Influence and interaction of iron and cadmium on photosynthesis and antioxidative enzymes in two rice cultivars. *Chemosphere*, 171:240-247. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.081>
- Maehley A.C., Chance B. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2:764-775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Maleki M., Ghorbanpour M., Kariman K. (2017) Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress, *Plant Gene*, 11(B):247-254. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.006>
- Marin A.R., Pezeshki S.R., Masschelen P.H., Choi H.S. (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *Journal of Plant Nutrition*, 16:865-880. <https://doi.org/10.1080/01904169309364580>
- Matos L.P., Andrade H.M., Marinato S.M., Prado I.G.O., Coelho D.G., Montoya S.G., Kasuya M.C.M, Oliveira J.A. (2020) Limitations to Use of *Cassia grandis* L. in the Revegetation of the Areas Impacted with Mining Tailings from Fundão Dam. *Water Air Soil Pollut* (2020) 231:127. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04479-0>
- Meyer S., Genty B. (1999) Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic

- component by limitation of CO₂ diffusion. *Planta*, 210:126-131. <https://doi.org/10.1007/s004250050661>
- Muñoz P., Briones M., Munné-Bosch S. (2018) Photoinhibition and photoprotection during flower opening in lilies, *Plant Science*, 272:220-229. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.023>
- Orlando M.T.D., Galvão E.S., Cavichini A. S., Rangel C.V.G.T., Orlando C.G.P., Grilo C.F., Soares J., Santos Oliveira K.S.S., Sá F., Junior A.C., Bastos A.C., Quaresma V.S. (2020) Tracing iron ore tailings in the marine environment: An investigation of the Fundão dam failure. *Chemosphere*, 257:127184. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127184>
- Paunov M., Koleva L., Vassilev A., Vangronsveld J., Goltsev V. (2018) Effects of Different Metals on Photosynthesis: Cadmium and Zinc Affect Chlorophyll Fluorescence in Durum Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3):787. <https://doi.org/10.3390/ijms19030787>
- Peixoto P.H.P., Cambraia J., Sant'ana R., Mosquim P.R., Moreira M.A. (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11:137-143.
- Pinto S.S., Souza A.E., Oliva M.A., Pereira E.G. (2016) Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. *Sci. Agric.*, 73(3):217-226. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0288>
- Porter R.H., Durrell M., Romm H.J. (1947) The use of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a measure of seed germinability. *Plant Physiology*, 22:149-159. <https://doi.org/10.1104/pp.22.2.149>
- Renova Foundation (2019) Relatório de avaliação da qualidade do rejeito presente na Barragem do Fundão, em Mariana – MG, e na Usina Hidrelétrica Risoleta Neves (aterro de Candonga), em Rio Doce – MG. <https://www.fundacaorenova.org/wp-content/uploads/2017/10/r001170373finalmcofundacaorenovafundaoecandongad09.pdf>
- Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gomez M., Del Rio L.A., Sandalio L.M. (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell and Environment*, 25:677-686. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00850.x>
- Saaltink R.M., Dekker S.C., Eppinga M.B., Griffioen J., Wassen M.J. (2017) Plant-specific effects of iron-toxicity in wetlands. *Plant Soil*, 416:83-96. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3190-4>

- Shao J.F., Yamaji N., Shen R.F., Ma J.F. (2017) The key to Mn homeostasis in plants: regulation of Mn transporters. *Trends in Plant Science*, 22:215-224. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.005>
- Shen Z., Chen Y., Xu D., Li L., Zhu Y. (2020) Interactions between heavy metals and other mineral elements from soil to medicinal plant Fengdan (*Paeonia ostii*) in a copper mining area, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 27:33743-33752. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09358-z>
- Silveira N.M., Oliveira J.A., Ribeiro C., Canatto R.A., Siman L., Cambraia J., Farnese F. (2015) Nitric oxide attenuates oxidative stress induced by arsenic in lettuce (*Lactuca sativa*) leaves. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226:e379. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2630-0>
- Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. (2016) Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6:ID1143 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Singh H.P., Batish D.R., Kohli R.K., Arora K. (2007) Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation*, 53:65-73. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9205-z>
- Singh N., Ma L.Q., Srivastava M., Rathinasabapathi B. (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*, 170:274-282. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.08.013>
- Srivastava M., Ma L.Q., Singh N., Singh S. (2005) Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *Journal of Experimental Botany*, 56:1335-1342. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri134>
- Stahl W., Sies H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6):345-351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- A. Tanaka A., Navasero A. (1966) Interaction between iron and manganese in the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, 12(5):29-33. <https://doi.org/10.1080/00380768.1966.10431958>
- Vasconcelos M. J. V., Figueiredo J. E. F., Raghothama K. G. (2018). Expression analysis of anthocyanin gene induced under phosphorus starvation in maize genotypes with contrasting phosphorus use efficiency. *Genetics and Molecular Research*, 17(4):gmr18036. <https://doi.org/10.4238/gmr18036>

- Veloso C.A.C., Muraoka T., Malavolta E., de Carvalho J.G (1995) Effect of manganese on mineral nutrition and growth of black pepper (*Piper nigrum*, L.). *Scientia Agricola*, 52(2):376-383. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161995000200028>
- Waterborg J.H., Matthews H.R. (1984) The Lowry method for protein quantitation. In: Walker JM (eds) *Proteins. Methods in Molecular Biology*, 1. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:1>
- Wellburn A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3):307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Montagu M.V., Inzé D., Camp W.V. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO Journal*, 16:4806-4816. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4806>
- Xia H., Ma X. (2006) Phytoremediation of ethion by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) from water. *Biosource Technology*, 97(8):1050-1054. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.039>
- Xue W., Jiang Y., Shang X., Zou J. (2020) Characterisation of early responses in lead accumulation and localization of *Salix babylonica* L. roots. *BMC Plant Biol*, 20:296. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02500-6>
- Ye Z., Baker A.J.M., Wong M.-H., Willis A.J. (1998) Zinc, lead and cadmium accumulation and tolerance in *Typha latifolia* as affected by iron plaque on the root surface. *Aquatic Botany*, 61:55-67. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(98\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(98)00057-6)

CONCLUSÃO GERAL

Áreas contaminadas por elementos metálicos, como as regiões atingidas pelos rompimentos das barragens de Marina, em 2015, e de Brumadinho, em 2019, apresentam desafios para sua recuperação, em especial pela presença de vários elementos metálicos combinados, o que dificulta os processos de revegetação.

Neste contexto, o entendimento de como, combinações de elementos metálicos influenciam a germinação e o desenvolvimento de vegetais, com potencial fitorremediador, é importante para melhorar os processos de recuperação das áreas contaminadas.

Os resultados obtidos, demonstram que a espécie *Cassia grandis* L. apresenta características que a possibilitam ser utilizada em processos de recuperação de áreas com solos contaminados por múltiplos elementos metálicos. No entanto, a concentração e a composição, em especial pela presença de As, pode ser um fator limitante para o sucesso da fitorremediação desses ambientes.

REFERÊNCIAS

- Abercrombie J., Halfhill M.D., Ranjan P., Rao M.R., Saxton A.M., Yuan J.S., Stewart Jr C.N. (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) Stress. *BMC Plant Biology*, 8:ID 87. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-87>
- Aihemaiti A., Jiang J., Li D., Liu N., Yang M., Meng Y., Zou Q. (2018) The interactions of metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *Journal of Environmental Management*, 222:216-226. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.081>
- Ali H., Khan E., Sajad M.A. (2013) Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91:869-881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Buch A.C., Niemeyer J.C., Marques E.D., Silva-Filho E.V. (2021) Ecological risk assessment of trace metals in soils affected by mine tailings. *Journal of Hazardous Materials*, 403:123852, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123852>
- Emamverdian A., Ding Y., Mokhberdoran F., Xie Y. (2015) Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World Journal*, 2015:ID 756120. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>
- Ghori N.-H., Ghori T., Hayat M.Q., Imadi S.R., Gul A., Altay V., Ozturk M. (2019) Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16:1807-1828 <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
- Luo Y., Liu J., Tan S., Cadotte M.W., Xu k., Gao L., Li D. (2016) Trait variation and functional diversity maintenance of understory herbaceous species coexisting along an elevational gradient in Yulong Mountain, Southwest China. *Plant Diversity*, 38(6):303-311. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.11.002>
- Lutts S., Kinet J.M., Bouharmont J. (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany*, 46 (12):1843-1852. <https://doi.org/10.1093/jxb/46.12.1843>
- Marmiroli M., Pietrini F., Maestri E., Zacchini M., Marmiroli N., Massacci A. (2011) Growth, physiological and molecular traits in Salicaceae trees investigated for phytoremediation of heavy metals and organics. *Tree Physiology*, 31:1319-1334. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpr090>

- Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. (2016) Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6:1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Sinha V., Pakshiraja K., Chaturvedi R. (2018) Chromium tolerance, bioaccumulation and localization in plants: An overview. *Journal of environmental management*, 206:715-730. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.033>
- Thompson F., Oliveira B.C., Cordeiro M.C., Masi B.P., Rangel T.P., Paz P., Freitas T., Lopes G., Silva B.S, Cabral A.S, Soares M., Lacerda D., Vergilio C.S., Lopes-Ferreira M., Lima C., Thompson C., Soares M. (2020). Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. *Science of The Total Environment*, 705:ID135914 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135914>
- Wong M. (2003) Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50:775-780. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00232-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00232-1)
- Wu C., Arcand M., Jansen G., Zhong M., Iouk T., Thomas D.Y., Meloche S., Whiteway M. (2003) Phosphorylation of the MAPKKK regulator Ste50p in *Saccharomyces cerevisiae*: a casein kinase I phosphorylation site is required for proper mating function. *Eukaryot Cell*, 2(5):949-61. <https://doi.org/10.1128/EC.2.5.949-961.2003>
- Yadav R., Arora O., Kumar S., Chaudhury A. (2010) Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities. *Ecotoxicology*, 19:1574-1588. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0543-7>