

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GUILHERME GONZALES DE SOUZA

**MORFOFISIOLOGIA APLICADA À
CARACTERIZAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE
TALINUM PATENS AO CHUMBO.**

**Alfenas / MG
2017**

GUILHERME GONZALES DE SOUZA

**MORFOFISIOLOGIA APLICADA À
CARACTERIZAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE
TALINUM PATENS AO CHUMBO.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG. Área de concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Dr. Thiago Corrêa de Souza

**Alfenas / MG
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Souza, Guilherme Gonzales de

Morfofisiologia aplicada à caracterização da tolerância de *Talinum patens* ao chumbo / Guilherme Gonzales de Souza. -- Alfenas/MG, 2017.
47 f.

Orientador: Thiago Corrêa de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Portulacaceae. 2. Chumbo. 3. Anatomia vegetal. 4. Germinação.
5. Crescimento. 6. Testes de Toxicidade. I. Souza, Thiago Corrêa de.
II. Título.

CDD-575



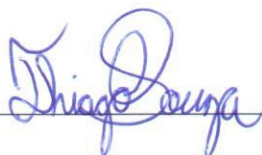
GUILHERME GONZALES DE SOUZA

“Morfofisiologia aplicada à caracterização da tolerância de *Talinum patens* ao chumbo”

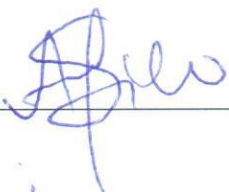
A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 30 de janeiro de 2017.

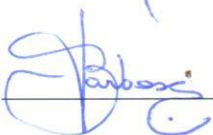
Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva
Instituição: UNIFENAS

Assinatura: 

Prof. Dr. Sandro Barbosa
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

A Minha Tia, mãezona e madrinha Ayde Cassandra Gonzales (Tidê), pois sem o seu apoio incondicional jamais chegaria onde estou. Você nos ensinou pequenas lições que levaremos para o resto da vida, com seu exemplo de mulher guerreira, batalhadora, dedicada e que transborda felicidade nos fez cada vez melhores. Serei eternamente grato por tudo que a senhora e o Tio Orival fizeram e fazem pela minha família. Te amaremos para sempre

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Rafaella e filha Clara por todo apoio durante esta jornada, vocês são a minha vida.

Aos meus pais Lucia Helena e Reginaldo pelo exemplo e suporte oferecido desde a infância.

Ao meu irmão Tulio, ao meu sogro José e sogra Edna, vocês foram parte crucial neste trabalho.

Ao meu orientador Dr. Thiago Corrêa de Souza, pela oportunidade concedida, por todos os ensinamentos, atenção, gentileza e amizade. Serei eternamente grato.

Á Dr. Marília Carvalho meus mais sinceros agradecimentos por toda paciência, tempo dedicado e abdicado.

Ao Dr. Sandro Barbosa pelo auxílio e pela amizade durante esta jornada.

Aos amigos Valdir, Josiele e Ana Lúcia por toda ajuda durante os experimentos, vocês foram ótimos.

À Gabriela Ezequiel e dona Ciomara muito obrigado por todo auxílio.

À CAPES, pela bolsa de mestrado e também pelo auxílio financeiro para a compra do aparelho Fluor-Cam (PRÓ-EQUIPAMENTOS edital n. 11/2014);

À FAPEMIG e CNPq pelas bolsas de Iniciação Científica PIBICT/FAPEMIG (Veroneze Júnior, V.) e PIBIC/CNPq (Silva, J.A.) ,respectivamente.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, pela realização do mestrado.

A todos vocês, a minha gratidão!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”
(HOLMES, 2008)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fitotoxicidade do chumbo em *Talinum patens* e os mecanismos morfofisiológicos de tolerância. Foram avaliados os seguintes parâmetros: percentual de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de raiz e de parte aérea, massas fresca e seca, teor de chumbo nos tecidos, sistema antioxidante enzimático, teor de prolina, peroxidação lipídica, anatomia radicular, análises citogenéticas e fluorescência da clorofila. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo cinco concentrações 0, 50, 100, 250 e 500 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e cinco repetições. A exposição às soluções de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ não influenciou a germinação, comprimento de parte aérea e biomassas fresca e seca. Contudo foi observado um efeito concentração dependente do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ que reduziu as divisões celulares na zona meristemática da raiz, reduzindo o comprimento das mesmas. Com relação ao sistema antioxidante enzimático a dismutase do superóxido, catalase e peroxidase do ascorbato mostraram aumento na atividade quando expostas ao chumbo. O mesmo efeito foi detectado para teor de prolina e peroxidação lipídica. Houve também aumento da dissipação do excesso de energia nos fotossistemas e aumento da espessura da epiderme. Conclui-se que as plantas de *Talinum patens* apresentaram características morfofisiológicas que favorecem sua germinação, desenvolvimento e tolerância ao metal pesado.

Palavras-chaves: Talinaceae. Chumbo. Anatomia radicular. Germinação. Crescimento inicial. Citotoxicidade.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the phytotoxicity of lead in *Talinum patens* and the morphophysiological mechanisms of tolerance. The following parameters were evaluated: percentage of germination, rate of germination, root and shoot length, fresh and dry masses, lead content in tissues, enzymatic antioxidant system, proline content, lipid peroxidation, root anatomy, analyzes Cytogenetics and chlorophyll fluorescence. The experimental design was completely randomized, containing five concentrations of 0, 50, 100, 250 and 500 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and five replicates. Exposure to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ solutions did not influence germination, shoot length, fresh and dry biomass. However, a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dependent concentration effect was observed that reduced the cell divisions in the meristematic zone of the root, reducing the length of the roots. In relation to the enzymatic antioxidant system the dismutase of superoxide, catalase and ascorbate peroxidase showed an increase in activity when exposed to lead. The same effect was detected for proline content and lipid peroxidation. There was also an increase in the dissipation of excess energy in the photosystems and an increase in the thickness of the epidermis. It is concluded that the plants of *Talinum patens* presented morphophysiological characteristics that favor their germination, development and tolerance to heavy metal.

Keywords: Talinaceae. Lead. Root anatomy. Germination. Initial growth. Cytotoxicity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	O Chumbo e as plantas	10
2.2	Fitorremediação e <i>Talinum patens</i>	13
3	JUSTIFICATIVA	15
4	OBJETIVOS	16
4.1	Objetivos específicos	16
5	REFERÊNCIAS	17
	ANEXO A – ARTIGO: Mecanismos morfofisiológicos da tolerância de <i>Talinum patens</i> ao chumbo.	21
	RESUMO	22
	INTRODUÇÃO	23
	Bioensaios com <i>Talinum patens</i>	24
	Quantificação de chumbo nas plântulas	25
	Atividade antioxidante enzimática, teor de prolina e peroxidação lipídica	25
	Análises citogenéticas	26
	Anatomia radicular	26
	Fluorescência da Clorofila <i>a</i>	27
	Delineamento experimental e análise dos dados	27
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Chapman (2007) a contaminação ambiental é a presença de substâncias químicas em locais onde naturalmente não ocorreria ou a presença de substâncias em um nível acima do natural. Caso essa contaminação acarrete efeitos negativos às comunidades, diz-se que há uma poluição.

Dentre as diversas formas de contaminação do meio ambiente, resultante de diferentes atividades industriais e agrícolas, a contaminação por metais pesados é um assunto de grande relevância ambiental que tem gerado uma enorme preocupação aos pesquisadores e órgãos governamentais envolvidos no controle da poluição. Os metais como chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cobre (Cu), cádmio (Cd), zinco (Zn), níquel (Ni), arsênio (As), urânio (U), selênio (Se), cromo (Cr) e outros, estão entre os elementos mais verificados em solos, em efluentes e em resíduos industriais e agrícolas, possuindo caráter tóxico para os organismos, incluindo seres humanos, nos quais causam efeitos graves para a saúde podendo levar até a morte (WUANA; OKIEIMEN, 2011).

Para Kumar, Prasad e Sytar (2012), na classificação de metais mais perigosos para o meio ambiente, o chumbo ocupa a segunda posição depois do arsênio. Diante de seu caráter tóxico elevado, estudos relacionados a esse metal são de fundamental importância. Outras considerações que justificam estudos relacionados a este metal ainda podem ser feitas. Entender os mecanismos envolvidos na tolerância de plantas ao chumbo pode aumentar a eficiência das tecnologias de fitorremediação, pois de acordo com Pilon-Smits (2005), o desempenho eficaz do processo de fitorremediação é dificultado devido à grande complexidade do funcionamento dos sistemas biológicos, sendo muitas vezes desconhecidos os mecanismos biológicos responsáveis pela remoção dos contaminantes. Entender os mecanismos de tolerância através de análises bioquímicas, fisiológicas e morfoanatômicas, também é de grande relevância.

De acordo com Yu e Zhou (2009), o desenvolvimento de tecnologias de fitorremediação requer uma profunda compreensão de questões referentes à genética, estrutura, processos fisiológicos, bioquímicos e aspectos agronômicos da planta empregada.

Além disso, valorizar as plantas presentes na região do Sul de Minas Gerais como *T. patens*, é de extrema importância para estudos de fitorremediação, porque essas plantas são mais adaptadas em termos de sobrevivência, crescimento e reprodução sob estresse ambiental em comparação com outras plantas ausentes na região.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O Chumbo (Pb) ocorre naturalmente na crosta terrestre, mas atividades antrópicas promovem sua acumulação nos ecossistemas ocasionando impactos ambientais. Esse elemento pode ser um dos maiores contaminantes do solo (GRATÃO et al., 2005).

O chumbo é um metal tóxico, com número atômico 82, massa atômica 207,2 e com baixo ponto de fusão. Este metal não ocorre naturalmente na forma pura, mas pode ser encontrado em seu estado oxidativo bivalente (Pb^{+2}) sendo distribuído em pequenas concentrações em depósitos de minério na crosta terrestre. O chumbo também pode formar hidróxidos, sais, óxidos e complexos oxianions (GUPTA; HUANG; CORPAS, 2013), sendo um poluente presente tanto em ambientes aquáticos como em terrestres.

A poluição do meio ambiente por chumbo possui a sua origem principalmente na produção de energia (gasolina e baterias), de fertilizantes, indústria têxtil, nas atividades das indústrias de cerâmica e do vidro, refino de petróleo, na fabricação de explosivos e operações de mineração (KUL; KOYUNCUB, 2010; SHARMA; DUBEY, 2005). O grande destaque do chumbo como contaminante ambiental resulta de seu uso desde a antiguidade em processos de fundição e de sua persistência no ambiente, podendo ser acumulado em toda cadeia alimentar (OPEOLU et al., 2010; POURRUT et al., 2011).

Efeitos neurológicos como encefalopatia pelo chumbo ou saturnina, representam várias doenças que afetam o cérebro (PAOLIELLO; CHASIN, 2001). É considerada a manifestação mais grave de intoxicação pelo chumbo, sendo mais comum em crianças. Nessas, a exposição ao metal resulta algumas vezes em nítida deterioração mental progressiva, pois as crianças são mais susceptíveis ao chumbo, cujo sistema nervoso, nas menores de seis anos, ainda está em desenvolvimento (LASAT, 2002).

2.1 O Chumbo e as plantas

O Chumbo é um elemento não essencial para as plantas e exibe diferentes efeitos e níveis de fitotoxicidade desde morfoanatômicos e fisiológicos, até bioquímicos. Pode ser acumulado em todos os órgãos das plantas e uma maior acumulação depende não apenas da concentração exógena do metal, mas também de aspectos fitoquímicos e da condição físico-química do solo. Em muitas plantas o chumbo permanece na raiz, adsorvido a endoderme, atuando essa como uma barreira parcial para o movimento apoplástico de Pb entre a raiz e o cilindro vascular. A absorção de chumbo não é uniforme ao longo da raiz podendo ocorrer um gradiente de maior concentração no ápice radicular (GUPTA; HUANG; CORPAS, 2013). Mas além da raiz, o chumbo pode chegar à parte aérea via xilema, ser acumulado nos tecidos ou ser redistribuído via floema. Tanto na raiz quanto na parte aérea, o chumbo pode ser acumulado no interior das células via compartimentalização no vacúolo pela sua precipitação/quelação com ácidos orgânicos (ácidos málico, oxálico e outros) (ARIAS et al., 2010).

O transporte via membrana do Pb para dentro das células ocorre devido à falta de discriminação do metal com outros elementos essenciais (por exemplo o cálcio) pelas proteínas transportadoras (POURRUT et al., 2011). Dentro das células, proteínas e peptídeos conhecidos como metalotioneínas e fitoquelatinas, respectivamente, podem se ligar via grupos tióis (-SH) ao chumbo, transportando-o para dentro dos vacúolos. Nesse processo há gasto de energia, sendo dependente do metabolismo, e ele é conhecido como bioacumulação. Já os processos que envolvem adsorção do metal em estruturas como a endoderme e paredes celulares, não ocorrem gasto de energia, sendo esses conhecidos como biossorção (CHOJNACKA, 2010).

Quando o Pb entra nas células, mesmo em pequenas quantidades, faz com que ocorra uma ampla gama de efeitos adversos sobre os processos fisiológicos. Os sintomas visíveis de toxicidade de Pb são inibição do crescimento radicular, crescimento atrofiado da planta, necrose tecidual e clorose. Com relação ao *status* hídrico, um declínio na taxa de transpiração e teor de água nos tecidos ocorre em plantas que crescem sob a exposição de Pb. O chumbo reduz o nível de compostos que estão associados com a manutenção de células de turgescência como a prolina e açúcares que são responsáveis pelo menor potencial da água dentro da célula. Plantas expostas aos íons Pb mostram um declínio na taxa fotossintética, eficiência no uso de água e eficiência quântica devido a alterações ultraestruturais dos

cloroplastos, há efeitos estomáticos e bioquímicos (GUPTA; HUANG; CORPAS, 2013; POURRUT et al., 2011).

O excesso de chumbo nas células vegetais também induz um estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas (OH^\bullet) e superóxido (O_2^-). O aumento elevado da produção de EROs durante o estresse pode ser uma ameaça para as células, mas também sabe-se que elas agem como sinais para ativação da resposta ao estresse e caminhos de defesa. Em quantidades exageradas, as espécies reativas de oxigênio podem atacar as membranas lipídicas levando à formação de um produto final chamado malonaldeído (MDA) pelo processo de peroxidação lipídica (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

Na presença tóxica das espécies reativas de oxigênio, as plantas respondem ao estresse por chumbo produzindo mecanismos de defesa. Um dos mecanismos de defesa presentes em plantas com grande capacidade de acumular chumbo (hiperacumuladoras) é o sistema de desintoxicação antioxidante que consiste em um sistema não enzimático (moléculas de pequeno peso molecular) como glutatona, ácido ascórbico, compostos fenólicos, α -tocoferol, carotenóides; e em um sistema enzimático composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e do guaiacol (POD), glutatona redutase (GR), monodeidroascorbato redutase (MDHAR), deidroascorbato redutase (DHAR) e polifenoloxidase (PPO) (BHADURI; FULEKAR, 2012; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA; DUBEY, 2005).

Outros mecanismos também são importantes para a tolerância de plantas hiperacumuladoras de chumbo como aumento da síntese de proteínas quelantes de chumbo (metalotioneínas e fitoquelatinas) e aminoácidos (prolina), além de modificações anatômicas (POURRUT et al., 2011). Com relação a esse último mecanismo (PEREIRA et al. 2011) verificou em *Eichhornia crassipes* (Aguapé) cultivadas em diferentes concentrações de chumbo, que a estrutura anatômica das folhas (maior tamanho e quantidade de estômatos e espessura do mesofilo) favoreceu melhor captação e armazenamento de CO_2 e a estrutura da raiz exibiu melhorias nas características do xilema e floema, além de melhorias nas barreiras apoplásticas (endoderme e exoderme) que podem ser importantes na retenção de chumbo no sistema radicular.

Com relação à tolerância das plantas aos metais pesados, têm-se as plantas excludentes, as bioindicadoras e as acumuladoras. As plantas excludentes possuem

mecanismos que evitam a entrada dos metais nas raízes por complexação com exsudados da própria planta. As bioindicadoras são aquelas que possuem uma concentração do metal que reflete a concentração no solo, ou seja, elas não conseguem absorver e acumular metais mais do que a quantidade presente no solo. As acumuladoras são aquelas plantas que conseguem acumular quantidades acima dos níveis presentes no solo. Vale ressaltar que, as plantas hiperacumuladoras que acumulam altos níveis de metais pesados (mais do que 1000 mg do metal por grama de tecido) os concentram nas raízes e, principalmente, na parte aérea, sem ocasionar grandes danos celulares (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; GHOSH; SINGH, 2005).

*2.2 Fitorremediação e *Talinum patens**

É notório que a cultura da preservação ambiental vem aumentando em todo mundo e com isso, leis mais rigorosas quanto às emissões de poluentes vêm sendo elaboradas. Desta forma, a exigência de normalizar as concentrações mínimas de substâncias consideradas tóxicas pelos órgãos ambientais e a aplicação de multas severas a infratores, vem conduzindo a um maior investimento, por parte dos setores produtores, em tecnologias que visem o tratamento ou descontaminação dos seus efluentes e resíduos (LIMA et al., 2010).

Com relação a essas tecnologias de descontaminação, são empregados vários métodos convencionais para a remoção de metais pesados do ambiente (solo e água) que envolvem processos físicos, químicos e biológicos, tais como os processos de separação com membranas, troca iônica, precipitação e filtração, tratamento eletroquímico, osmose reversa, oxidação e redução biológica, adsorção com carvão ativo, escavação, lavagem e incineração de solos e outros (WUANA; OKIEIMEN, 2011). Os métodos usados convencionalmente apresentam muitas vezes um custo elevado, não são eficientes em baixas concentrações de metais, podem gerar modificações irreversíveis na microbiota e nas propriedades do solo e podem gerar poluentes secundários aumentando o problema (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

Uma das tecnologias que vem ganhando destaque pela sua alta eficiência e baixo custo, é a fitorremediação, uma técnica baseada na introdução de plantas que possam descontaminar (remediar) o ambiente. Existem vários tipos de técnicas de fitorremediação

sendo o uso destas dependentes de estudos que confirmem a eficiência das plantas em sobreviver e acumular os metais pesados (serem hiperacumuladoras). (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; PILON-SMITS, 2005).

A *Talinum patens* (L.) Wild é uma planta da família *Talinaceae* e até o ano de 2008 estava agrupada na família *Portulacaceae*. Cientificamente é denominada também como *Portulaca paniculata* Jacq, *Portulaca racemosa* L., *Talinum paniculatum* Gaertn e *Talinum roseum* Klotzsch e popularmente é conhecida como língua-de-vaca, beldroega-grande, maria-gomes e maria-gorda. Ela é uma planta herbácea e alcança até 70 cm de altura. As folhas são opostas, pecioladas, bem carnosas e suculentas de bordo liso. Ela vegeta em vários tipos de solos e sua reprodução ocorre por sementes e vegetativamente pelo enraizamento caular. É considerada uma planta invasora e possui origem na América Tropical. Com ampla distribuição em todos os Estados brasileiros, há regiões em que é consumida como verdura, cozinhando-se as folhas ou como salada. Ela também possui uso ornamental nos Estados Unidos e possui várias propriedades terapêuticas comprovadas (RAMOS, 2003; SOARES, 2005).

Atualmente não há relatos de *T. patens* em estudos de fitorremediação, contudo a espécie *Talinum triangulare*, da mesma família vem sendo considerada como hiperacumuladora de cobre e também pode acumular chumbo, níquel, cádmio e outros metais pesados (AKINOLA et al., 2006; KUMAR et al. 2012; RAJKUMAR et al., 2009). A espécie *Portulaca oleracea*, pertencente à mesma ordem de *T. patens* (Caryophyllales) também pode acumular cobre, cádmio, zinco, chumbo e mercúrio em suas folhas (THANGAVEL et al., 1998).

3 JUSTIFICATIVA

A contaminação do ambiente por metais pesados é evidente, portanto estudar plantas com potencial fitorremediador é de extrema importância. Espécies pertencentes à mesma família ou ordem de *T. patens* são reconhecidas por possuírem a capacidade de hiperacumular metais pesados entre eles o chumbo, cobre, cádmio e níquel. Dessa forma estudar plantas da Família Talinaceae traz grandes possibilidades de se chegar em plantas hiperacumuladoras de metais pesados.

4 OBJETIVOS

Avaliar a fitotoxicidade do Pb sobre *Talinum patens* e caracterizar os mecanismos envolvidos na sua tolerância.

4.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar os parâmetros de fitotoxicidade que envolvem germinação e crescimento inicial;
- b) Verificar a capacidade de acumulação de Pb pelas plantas;
- c) Avaliar a atividade do sistema antioxidante enzimático (catalase, peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido);
- d) Quantificar os níveis de peroxidação lipídica e o teor de prolina em plântulas de *T. patens*;
- e) Determinar a citotoxicidade do chumbo em *Talinum patens*;
- f) Verificar alterações anatômicas no sistema radicular;
- g) Verificar a eficiência do fotossistema II através das medidas da Fluorescência da clorofila *a*.

5 REFERÊNCIAS

- AKINOLA, M. O.;EKIYOYO, T. A. Accumulation of lead, cadmium and chromium in some plants cultivated along the bank of river Ribila at Odonla area of Ikorodu, Lagos state, Nigeria. **Journal of Environmental Biology**, Nigeria, v. 27, p. 597-599, 2006.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. **Chemosphere**, United Kingdom, v. 91, p. 869–881, 2013.
- ARIAS, J. A. et al. Effects of *Glomus deserticola* inoculation on *Prosopis*: enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. **Environment and Experimental Botany**, Netherlands, v. 68, p.139–148, 2010.
- AZEVEDO,R.A.;LEA,P.J. Toxic metals in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brazil, v. 17,p. 1-10, 2005.
- BHADURI, A. M; FULEKAR, M. H. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Netherlands, v. 11, p. 55–69, 2012.
- CHAPMAN, P.M. Determining when contamination is pollution -Weight of evidence determinations for sediments and effluents. **Environment International**, United Kingdom, v. 33, p. 492–501, 2007.
- CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications. **Environment International**, United Kingdom, v. 36, p. 299-307, 2010.
- GRATÃO, P. L.; PRASAD, M. N. V.; CARDOSO, P. F.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Phytoremediation: green technology for the clean-up of toxic metals in environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brazil, v. 17, p. 53-64, 2005.

GUPTA, D.K.; HUANG, H.G.; CORPAS, F.J. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, Germany, v. 20, p. 2150-2161, 2013.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, p. 450-455, 1987.

HOLMES, W.O. **Stretching: Webster's Quotations, Facts and Phrases**, 2008.

LU H., LI Z., FU S., MENDEZ A., GASCO G., PAZ-FERREIRO J. Combining phytoextraction and biochar addition improves soil biochemical properties in a soil contaminated with Cd. **Chemosphere**, United Kingdom, v. 119, p. 209–216, 2015

JIANG, Z., ZHANG, H., QIN, R., ZOU, J., WANG, J., SHI, Q., JIANG, W., LIU, D. Effects of lead on the morphology and structure of the nucleolus in the root tip meristematic cells of *Allium cepa* L. International. **Journal Molecular Science**, Switzerland, v. 15, p. 13406-13423, 2014.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J.C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, Australia, v. 5, p.709–725, 2011.

KUL, A. R.; KOYUNCUB, H. Adsorption of Pb (II) ions from aqueous solution by native and activated bentonite: Kinetic, equilibrium and thermodynamic study. **Journal of Hazardous Materials**, Netherlands, v. 179, p. 332–339, 2010.

KUMAR, A.; PRASAD, M.N.V.; SYTAR, O. Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. **Chemosphere**, United Kingdom, v. 89, p.1056-1065, 2012.

LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environment Quality**, Madison, v. 31, p. 109-120, 2002.

LIMA, A. M., MELO, J. L. S., MELO, H. N. S., CARVALHO, F. G. Avaliação do potencial fitorremediador da mamona (*Ricinus communis* L) utilizando efluente sintético contendo chumbo. **Holos**, Brasil, v. 1, p. 151, 2010.

OPEOLU, O. B.; BAMGBOSE, O.; AROWOLO, T. A.; ADETUNJI, M. T. Utilization of biomaterials as adsorbents for heavy metals' removal from aqueous matrices. **Scientific Research and Essays**, Nigeria, v. 5, p. 1780-1787, 2010.

PAOLIELLO, M.M.B.; CHASIN, A.A.M. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. Centro de Recursos Ambientais, Brasil, v. 3, p. 150, 2001.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; PIRES, M. F.; PASQUAL, M. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por Arsênio. **Planta Daninha**, Brasil, v. 29, p. 259-267, 2011.

PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, L. C.A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E.M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@mbiente**, Brasil, v. 7, p. 36-43, 2013.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review Plant Biology**, United states, v. 56, p. 19-39, 2005.

POURRUT, B.; SHAHID, M.; DUMAT, C.; WINTERTON, P.; PINELLI, E. Lead Uptake, toxicity, and detoxification in plants. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, United states, v. 213, p. 113-136, 2011.

RAJKUMAR, K.; SIVAKUMAR, S.; SENTHILKUMAR, P.; PRABHA, D.; SUBBHURAAM, C.V.; SONG, Y.C. Effects of selected heavy metals (Pb, Cu, Ni, and Cd) in the aquatic medium on the restoration potential and accumulation in the stem cuttings of the terrestrial plant, *Talinum triangulare*. **Ecotoxicology**, Netherlands, v. 18, p. 952-960, 2009.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brazil, v.17, n.1, p.35-52, 2005.

THANGAVEL, P.; SUBBURAM, V. Effect of trace metals in restoration potential of leaves medicinal plant Portulacaoleracea. **Biology Trace Elements Research**, United states, v. 61, p. 313-321, 1998

WUANA, R.A.; OKIEMEN, F.E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **Ecology**, United states, p. 1–20, 2011.

YU, Z.; ZHOU, Q. Growth and cadmium accumulation of *Mirabilis jalapa* under interaction between cadmium and phosphorus. **Journal of Hazardous Materials**, Netherlands, v. 167, p. 38-43, 2009.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO: Mecanismos morfofisiológicos da tolerância de *Talinum patens* ao chumbo.

Artigo redigido conforme as normas da revista Water, Air, & Soil Pollution

• Guilherme Gonzales de Souza¹ • Ana Lúcia Mendes Pinheiro¹ • Josiele Aparecida Silva¹
• Valdir Veroneze Júnior¹ • Marília Carvalho¹ • Alexandre Carvalho Bertoli¹ • Sandro
Barbosa¹ • Thiago Corrêa de Souza^{1*}

1: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL, Instituto de Ciências da Natureza - ICN, Rua Gabriel Monteiro, 700. Telefone: +553 532 991 419, FAX: +553 532 991 419, CEP: 37130-000, Alfenas-MG, Brasil. E-mail: thiago.souza@unifal-mg.edu.com *autor para correspondência

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fitotoxicidade do chumbo em *Talinum patens* e os mecanismos morfofisiológicos de tolerância. Foram considerados os seguintes parâmetros: percentual de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento de raiz e de parte aérea, massas fresca e seca, teor de chumbo nos tecidos, sistema antioxidante enzimático, teor de prolina, peroxidação lipídica, anatomia radicular, análises citogenéticas e fluorescência da clorofila. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo cinco concentrações 0,50,100,250 e 500 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e cinco repetições. A exposição às soluções de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ não influenciou a germinação, comprimento de parte aérea e biomassas fresca e seca. Contudo observou-se um efeito concentração dependente do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ que reduziu as divisões celulares na zona meristemática da raiz, reduzindo o comprimento das mesmas. Dismutase do superóxido, catalase e peroxidase do ascorbato mostraram aumento na atividade quando expostas ao chumbo e o mesmo efeito foi detectado para teor de prolina e peroxidação lipídica. Houve aumento da dissipação do excesso de energia nos fotossistemas, e também aumento da espessura da epiderme. Portanto as plantas de *Talinum patens* apresentaram características morfofisiológicas que favorecem sua germinação, desenvolvimento e tolerância ao metal.

Palavras-chaves: Talinaceae; metais pesados; anatomia radicular; germinação; crescimento inicial; citotoxicidade; fluorescência da clorofila

INTRODUÇÃO

A absorção do chumbo por plantas pode causar alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais levando as plantas a apresentarem sintomas visuais e outros efeitos como a redução do crescimento das raízes ou de toda a planta, clorose foliar, modificações nas atividades enzimáticas e na fotossíntese (Gautam et al.2011). O Pb também pode inibir ou reduzir a germinação de sementes (Lamhamdi et al., 2011; Ahmad et al., 2011), e modificar características anatômicas como, por exemplo, aumento no número de estômatos nas folhas e redução no tamanho dos feixes vasculares na raiz (Kosobrukhov et al. 2004). Avaliar essas características morfológicas e fisiológicas pode contribuir com os estudos de plantas tolerantes para a fitorremediação.

A *Talinum patens* (L.) Wild é uma planta da família *Talinaceae* tendo por sinonímia a as denominações de *Portulaca paniculata* Jacq, *Portulaca racemosa* L., *Talinum paniculatum* Gaertn e *Talinum roseum* Klotzsch e popularmente é conhecida no Brasil como língua-de-vaca, beldroega-grande, maria-gomes e maria-gorda e em outros países como fameflower e Jewels-of-Opar. Trata-se de uma planta herbácea que alcança até 70 cm de altura. Cresce em vários tipos de solos, como argilosos, arenosos, úmidos, secos, com alto teor de matéria orgânica e se desenvolve em lugares ensolarados, sombreados e úmidos. Sua reprodução ocorre por sementes e vegetativamente pelo enraizamento caular (Mosango et al., 2004).

Estudos com o gênero *Talinum* mostraram potencial fitorremediador e espécies como a *Talinum triangulare*, vem sendo considerada como hiperacumuladora de cobre, chumbo, níquel, cádmio e outros metais pesados (Akinola et al. 2006; Rajkumar et al. 2009; Kumar et al., 2012). *Portulaca oleracea*, pertencente à mesma ordem de *T. patens* (Caryophyllales) pode acumular os mesmos metais em suas folhas (Thangavel et al., 1998), portanto estudar plantas dessa família e/ou ordem pode permitir atribuir características fitorremediadoras.

Uma das técnicas de grande destaque na fitorremediação é a fitoextração que é baseada na capacidade das plantas em absorver (extrair do solo) e acumular os poluentes em seus tecidos (principalmente parte aérea) (Lu et al. 2015). Para isso, as plantas são cultivadas

em solos contaminados com metais e quando semeadas nestes solos devem ter capacidade de germinar, crescer e tolerar as altas concentrações de Pb para assim se estabelecerem e realizarem a absorção. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a fitotoxicidade do chumbo em *Talinum patens* e os mecanismos morfofisiológicos de tolerância. *T. patens* é considerada uma planta pantropical sendo cultivada em regiões da Ásia, África e nas Américas (Mosango 2004), e o entendimento dos mecanismos de tolerância e seu uso na descontaminação do ambiente pode ser uma importante ferramenta para diversos países.

MATERIAL E MÉTODOS

Bioensaios com *Talinum patens*

Foram distribuídas 50 sementes em placas de Petri (6 cm de diâmetro) contendo duas folhas de papel de filtro Whatman nº 2, e 5 mL das concentrações: 50; 100; 250 e 500 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e água destilada foi empregada como controle negativo. As placas foram mantidas em câmara tipo B.O.D (Solab®) a $30^\circ\text{C} \pm 1$, com fotoperíodo de 12 horas e duração de 14 dias. Neste experimento foi avaliado comprimento radicular (CR), comprimento de parte aérea (CPA), massa fresca e seca. Parâmetros germinativos como índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de sementes germinadas (G%) também foram medidos.

O CR e CPA foram quantificados utilizando paquímetro digital, e a massa fresca e seca utilizando balança analítica (Marte AY220) e estufa de circulação de ar (Nova Ética 400 ND) a 60°C .

O IVG foi avaliado a cada oito horas durante quatorze dias de acordo com a seguinte fórmula: $\text{IVG} = (\text{N}_1/\text{T}_1) + (\text{N}_2/\text{T}_2) + (\text{N}_n/\text{T}_n)$. Onde: IVG = índice de velocidade de germinação; N_n = número total de sementes germinadas num intervalo T_n ; T_n = intervalo de tempo. A contagem de germinação foi feita a partir da protrusão da radícula e o tempo foi determinado quando 80% das sementes do controle negativo germinaram. Em *T. patens* este intervalo de tempo foi de 120 horas após o início do experimento.

Para a quantificação de chumbo, atividade antioxidante enzimática, teor de prolina e peroxidação lipídica, anatomia radicular e fluorescência da clorofila “a” foram plotados, bioensaios com as mesmas condições.

Quantificação de chumbo nas plântulas

Para análise do teor de chumbo 0,6 gramas de massa seca por repetição foram lavadas em HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) para retirar o chumbo aderido à superfície dos tecidos e fez-se a digestão nitroperclórica das amostras na proporção de 2:1 (v/v) de HNO₃ e HClO₄. O teor de chumbo foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica de acordo com metodologia proposta por Kumar, Prasad e Sytar (2012).

Atividade antioxidante enzimática, teor de prolina e peroxidação lipídica.

Para a extração das enzimas antioxidantes, 200 mg de massa fresca de plântulas foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1,5 mL do tampão de extração. Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 rpm, por 30 minutos, a 4°C, coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) conforme apresentado por Biemelt et al. (1998). As atividades das enzimas foram avaliadas espectrofotometricamente e expressas por mg de proteínas que foram determinadas pelo método de Bradford et al. (1976) utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovina (BSA).

A atividade da SOD foi determinada pela capacidade da enzima inibir a redução fotoquímica do nitro blue tetrazolium (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de SOD foi definida pela quantidade de enzima que inibe 50% da taxa de redução do NBT. A leitura foi feita a 560 nm em espectrofotômetro. A atividade da CAT foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio (Havner e Michale 1987). A reação foi iniciada pela adição do H₂O₂ ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de CAT é definido pela quantidade de enzima necessária para decompor 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de H₂O₂. A atividade da APX foi determinada

pela diminuição da absorvância do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 290 nm a cada 15 segundos durante 3 min, segundo (Nakano e Asada 1981). Uma unidade de APX foi definida pela quantidade de enzima que oxida $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ de ácido ascórbico.

Para a determinação do teor de prolina foi utilizado o método descrito por Torello e Rice (1986) com modificações. As absorvâncias obtidas foram comparadas com curva padrão de prolina e os resultados expressos em micromol de prolina/g de matéria fresca.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[\text{MDA}] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1).

Análises citogenéticas

As avaliações citogenéticas, foram realizadas com a mesma condição dos bioensaios anteriores, porém as coletas foram após 48 horas do início do experimento. Todas as radículas contendo o tamanho do maior eixo da semente foram coletadas, fixadas em Carnoy (álcool etílico P.A. e ácido acético na proporção de 3:1) e armazenadas em freezer a -18°C . As preparações foram confeccionadas pelo método de esmagamento adaptado de Pereira et al. (2013). Para tanto, os meristemas apicais foram hidrolisados com ácido clorídrico 5,0 M a 25°C e corados com reativo de Schiff. O índice mitótico (IM) foi determinado utilizando-se a equação: $\text{IM} = \text{NCM} \times 100 / \text{NTC}$, em que NCM é o número de células em mitose e NTC o número total de células observadas. Além do IM as anormalidades cromossômicas das células foram analisadas de acordo com os critérios a seguir: C-metáfases, pontes cromossômicas em anáfase e em telófase, cromossomos perdidos, stickiness e presença de micronúcleo.

Anatomia radicular

Para anatomia radicular 25 amostras contendo todas as regiões da raiz foram coletadas. As secções transversais foram realizadas de acordo com Souza et al. (2009) e foram observadas e digitalizadas em microscópio óptico de luz Olympus BX-60 acoplado a uma

câmara digital. Os seguintes parâmetros foram analisados: espessura da epiderme, espessura do córtex e proporção da área do cilindro vascular em relação à área total da raiz (PCV). Todas estas medições foram realizadas pelo programa de análise de imagens UTHSCSA ImageTool (University of Texas, San Antonio, USA).

Fluorescência da Clorofila *a*

Para obter o desempenho fotossintética de *T. patens* a fluorescência da clorofila “a” foi obtida por imagens através de um fluorímetro de imagens (FluorCAM Closed FC 800-C, PhotonSystems Instruments – PSI, Ltd, Drasov, Czech Republic). As análises foram realizadas utilizando os protocolos de quenching do próprio software e de acordo com Oxborough (2004). Após uma adaptação das plantas de 20 minutos no escuro foi medida a fluorescência mínima (F_o) com uma luz suficientemente baixa evitando reações fotoquímicas e foi medida também a fluorescência máxima (F_m) aplicando-se um pulso de luz saturante. Nas amostras adaptadas no escuro, a máxima eficiência do fotossistema (PSII) foi estimada pela razão F_v/F_m . Em seguida as folhas foram iluminadas com luz actínica. Então a fluorescência constante (F_s) foi obtida e em seguida outro pulso de luz saturante de luz foi aplicado por 1 s para obtenção da fluorescência máxima emitida pelas folhas (F_m'). A luz actínica foi removida e as folhas foram irradiadas com luz vermelho-distante, para obtenção de F_o adaptado a luz (F_o'). O quenching fotoquímico foi calculado como $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$, e o quenching não-fotoquímico foi calculado como $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$. Também foi calculado a máxima eficiência do fotossistema (PSII) de amostras adaptadas na luz (F_v/F_mL) pela razão $(F_m' - F_o')/F_m'$.

Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), contendo cinco concentrações (0, 50, 100, 250 e 500 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e cinco repetições. Os resultados foram submetidos a análise de regressão linear e não linear utilizando o programa TableCurve 2D versão 5.01 com um nível de significância de 5% ($P \leq 0.05$). As características que não foram

significativas foram apenas demonstradas nos gráficos com seus respectivas medias mais o erro padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para índice de velocidade de germinação (GRI), não houve diferença entre as concentrações analisadas e o grupo controle (Fig.1-A) mostrando tolerância ao metal. Espécies como pepino (*Cucumis sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*) não apresentaram efeito negativo sobre a velocidade de germinação quando expostas ao Pb (Wierzbicka; Obidzinska,1998). Sabe-se que o efeito do chumbo sobre a germinação depende da estrutura da semente, bem como o grau de permeabilidade do tegumento ao metal pesado (Sharma; Dubey, 2005).

Com relação à porcentagem de germinação o controle negativo apresentou menor porcentagem de sementes germinadas (G%) (Fig.1-B), sugerindo que a ausência do $Pb(NO_3)_2$ reduziu o percentual germinativo de *T. patens*. Isso indica que nitrato presente no sal foi essencial para o aumento do percentual germinativo e que as sementes desta espécie parecem ser tolerantes ao chumbo no âmbito da germinação. A germinação, o crescimento e desenvolvimento das plantas são influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como o mesmo é fornecido (George; Sherrington 1984). Na literatura encontra-se trabalhos relatando o aumento da germinação de sementes devido a concentrações de nitrogênio (Gomes et al., 2012; Pedroso-de-Moraes et al., 2012)

A permeabilidade a metais pesados em sementes está muitas vezes relacionada à estrutura do tegumento da semente (Wierzbicka e Obidzińska 1998). Segundo Pereira et al. (2013), a germinação é mais afetada em concentrações mais altas devido à proteção promovida pelo pericarpo e o tegumento da semente, restringindo a entrada de Pb (em concentrações mais baixas). Portanto, com o aumento das concentrações de Pb ocorre aumento da entrada desse metal nas sementes afetando o embrião e, conseqüentemente, diminuindo proporcionalmente o percentual de germinação. No presente estudo encontramos um comportamento divergente, em que o aumento da concentração de Pb não influenciou a germinação devido provavelmente a estrutura do tegumento de *T. patens* que inviabilizou ou

dificultou a entrada do metal pesado, fator crucial quando procura-se espécies com potencial fitorremediador.

Ocorreu redução no comprimento radicular (CR) com a exposição ao Pb, mas não houve morte de espécimes (Fig. 1-C). A raiz por ser o primeiro órgão da planta em contato com o metal pesado, foi mais afetada pelo tratamento contendo Pb quando comparado à parte aérea (Fig. 1-C, D). Na raiz as células meristemáticas do ápice são alvos primários de toxidez (Jiang et al., 2014). Estudos realizados com chumbo em células apicais de raízes de *Allium cepa* por Carruyo et al. (2008) mostraram uma correlação negativa entre o teor de chumbo e o incremento de crescimento radicular. Rossato et al. (2012) também observaram redução do crescimento radicular em *Pluchea sagittalis*, expostas as concentrações de 200, 400, 600 e 1000 μM de Pb.

Para o comprimento da parte aérea (CPA) observa-se um declínio com o aumento da concentração de chumbo (Fig. 1-D). Segundo Kumar et al. (2012) em *Talinum triangulare* exposta ao Pb nas concentrações 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 e 1.25 mM verificou-se o aumento no acúmulo de Pb nos tecidos proporcional as concentrações, e a raiz demonstrou ser a principal estrutura a acumular este metal. Pode ser observado que apenas na maior concentração do Pb (500 μM) é que de fato houve redução do CPA (Fig.1-D), demonstrando que o metal pesado foi translocado para a parte aérea. De acordo Pereira et al. (2013), concentrações elevadas de Pb fazem com que o sistema vascular aumente sua capacidade de transportar este metal para a parte aérea, em função de um maior fluxo no xilema, provocando efeitos fitotóxicos e redução no crescimento.

Não houve alteração da massa fresca e seca (Fig.1-E, F) entre as concentrações de chumbo testadas. Apesar de Pena et al. (2015) afirmarem que a redução da biomassa da planta está associada à redução do comprimento radicular, sendo o crescimento radicular um bom indicativo de tolerância ao metal (Barceló e Poschenrieder, 2011). Os resultados deste estudo demonstram que o CR foi mais responsivo ao estresse causado pelo chumbo quando comparado à massa fresca, não havendo correlação entre as variáveis.

A massa seca das plantas submetidas ao Pb variou entre 0,15g a 0,18g, assim o $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ não influenciou na massa seca, portanto, na alocação de carbono da espécie. Em estudo semelhante Rossato et al. (2012) observaram que independente do estágio de desenvolvimento das folhas e caules de *P. sagittalis* as concentrações 200, 400, 600 e 1000 μM de Pb não afetaram a massa seca.

Quanto maior a concentração de Pb exposta maior foi o teor de Pb nos tecidos (Figura 2) em *T. patens*. A mesma resposta foi observada por Kumar et al. (2012) em *Talinum triangulare*, por Ribeiro et al.(2014) avaliando *Echinodorus grandiflorus* e Oliveira et al. (2010) analisando *Pistia stratiotes* ambas expostas ao Pb. Plantas potencialmente bioacumuladoras tendem a absorver este metal e deposita-lo em seus tecidos da raiz, caule e folhas. Sendo a raiz o principal órgão da planta a alocar este metal pesado. Segundo Gupta, Huang, e Corpas (2013) uma variedade enorme de plantas possui a capacidade de reter Pb. Este metal é adsorvido a endoderme que atua como barreira para o movimento apoplástico do Pb, impedindo parcialmente que este chegue ao cilindro central. Além da raiz outras regiões podem acumular Pb que chega a parte aérea via xilema, se acumula nos tecidos ou é redistribuído via floema. No interior das células via compartimentalização ele se acumula no vacúolo por precipitação ou quelação com ácidos orgânicos (ácidos málico, oxálico e outros) (Arias et al., 2010).

O sistema antioxidante enzimático de *T. patens* exposta ao $Pb(NO_3)_2$ apresentou aumento concentração dependente na atividade da SOD (Fig. 3-A) que pode ser atribuído ao acúmulo de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) induzido pelo chumbo. O radical superóxido é considerados a primeira espécie reativa de oxigênio (ERO) formada e a SOD participa da primeira linha de defesa contra estes radicais aliviando o estresse oxidativo (Gill e Tuteja 2010). Segundo Kumar et al. (2012) em *Talinum triangulare* exposta ao Pb foi observado o aumento na produção de ERO diretamente proporcional ao aumento nas concentrações de Pb (de 0,25 mM para 1,25 mM).

A remoção do radical superóxido pela SOD em *T. patens* pode prevenir a formação de radical hidroxila OH^{\cdot} antes de sua interação com moléculas-alvo (Xu et al. 2013). O OH^{\cdot} é uma molécula altamente nociva em sistemas vivos. Por isso a sua formação pela redução de íons metálicos na presença do $O_2^{\cdot-}$ deve ser evitada. As enzimas do sistema antioxidante não eliminam o OH^{\cdot} diretamente, de modo que a regulação de seus precursores, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , é o passo fundamental na prevenção dos riscos do OH^{\cdot} , reunindo a ação das enzimas SOD, APX e CAT (Bhattacharjee et al., 2010; Mylona e Polidoros, 2010). Este comportamento explica a alta atividade da SOD em *T. patens* impedindo o acúmulo de OH^{\cdot} e tentando evitar danos à membrana plasmática, desnaturação de proteínas e redução do crescimento. Em concordância com a atividade da SOD observa-se que o aumento do teor de chumbo levou também um aumento das enzimas APX e CAT (Fig. 3- B, C). Após a formação do H_2O_2 pela enzima

SOD, a APX juntamente com a CAT são as principais enzimas responsáveis pelo processo de detoxificação do H_2O_2 em plantas e podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos, formando produtos não tóxicos à célula (Sharma et al. 2012).

Com isso, em *T. patens*, a coordenação adequada da atividade da SOD e peroxidases é fundamental para manter o equilíbrio entre produção e remoção de OH^- . A APX é a principal enzima do ciclo ascorbato-glutationa, que sequestra H_2O_2 formando água como produto final (Asada e Takahashi 1987), já a CAT é uma proteína que catalisa a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Frugoli et al. 1996).

Foi observado um aumento concentração dependente na peroxidação lipídica em *T. patens* exposta ao Pb (Fig. 3-D). Kumar et al. (2012) analisando a exposição de *Talinum triangulare* ao Pb nas concentrações 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 e 1.25 mM verificou também o aumento na peroxidação lipídica. Outro estudo que corrobora estes resultados foi de Rossato et al (2012), que utilizou 0; 200; 400; 600 e 1000 μM de Pb em raízes e folhas de *Pluchea sagittalis* em 30 dias de cultivo. Mesmo ocorrendo uma atividade enzimática antioxidante maior com o aumento das concentrações do metal, parece que não foi o suficiente para eliminar as ERO e evitar a peroxidação lipídica em *T. patens*.

Com relação ao aminoácido prolina que possui a capacidade de ajustamento osmótico e de remover ERO (Tripathi; Gaur, 2004; Sharma; Dubey, 2005), inibindo a peroxidação lipídica das membranas celulares (Mehta; Gaur, 1999) observa-se no presente estudo que ocorreu aumento dose dependente na produção de prolina dos tratamentos expostos ao Pb (Fig 3-E). Esta resposta possivelmente ocorreu porque plantas tolerantes ou hiperacumuladoras de Pb tendem a aumentar a síntese de proteínas quelantes ao Pb (metalotioneínas e fitoquelatinas) e aminoácidos como a prolina na tentativa de impedir os efeitos tóxicos do metal pesado (Pourrut et al. 2011). Frequentemente, aminas, amidas e sulfidrilas são usadas como grupos de "ancoragem", onde a presença de potenciais átomos de ligação, oxigênio, enxofre e nitrogênio, têm mostrado ser útil para a coordenação de metais pesados (Siegel et al. 2013).

Anormalidades cromossômicas como micronúcleos, c-metáfases, pontes cromossômicas, cromossomos perdidos e pegajosos foram observadas e quantificadas, porém essas não diferiram estatisticamente do controle negativo, ressaltando que o Pb não tem efeito genotóxico sobre *T. patens*. Contudo para o índice mitótico (IM) observou-se um efeito concentração dependente, ou seja, com o aumento da exposição ao metal ocorreu redução no

número de células em divisão na zona meristemática das raízes de *T. patens*. (Fig.4). O IM do meristema radicular é um parâmetro que está diretamente relacionado com o alongamento radicular. (Adam; El-ashry, 2010). Pereira et al. (2013) avaliando *Lactuca sativa* submetidas a diferentes concentrações de Pb também observou uma redução no IM associada a redução do alongamento radicular. Provavelmente a redução do CR em *T. patens* causada em parte pela redução no IM influenciou na disponibilidade de recursos para planta (como água e nutrientes).

Neste trabalho, ocorreu um aumento na atividade do sistema antioxidante enzimático e também na síntese de prolina como tentativa de minimizar a ação lesiva do Pb. O stress oxidativo causado pelo metal pesado leva ao aumento na síntese do aminoácido prolina como estratégia de defesa da planta contra a toxicidade do metal, evitando também a perda excessiva de água e restabelecendo o equilíbrio osmótico das células vegetais. Moraes et al. (2015) avaliando o efeito do metal cobre sobre *Lactuca sativa* também observou uma redução no IM associada ao aumento na produção de prolina. Assim para *T. patens* o Pb demonstrou um efeito citotóxico, o que ocasionou redução do IM e CR, mas não um efeito genotóxico.

Nas secções transversais radiculares de *T. patens* foi observado que quanto maior a concentração de chumbo, maior foi a espessura da epiderme (Figura 5 A; Figura 6). E de forma contrária, o aumento das concentrações de chumbo levou a uma redução na espessura do córtex e na proporção da área do cilindro vascular em relação à área total da raiz (PVC) (Figura 5 B,C; Figura 6). Oliveira (2010) observou em *Pistia stratiotes* que tecidos da raiz como epiderme, exoderme e endoderme podem apresentar espessamento em resposta a exposição ao Pb. Este mecanismo funciona como uma barreira, que dificulta ou reduz a absorção e translocação do Pb para a porção aérea da planta. Ahmad (2005) analisando *Trigonella foenum* exposta ao Pb também observou uma diminuição no córtex e na proporção dos tecidos vasculares da raiz, isto possivelmente ocorre pelo efeito lesivo do Pb, que reduz também o índice mitótico e o alongamento da raiz. Esta redução do córtex radicular pelo efeito fitotóxico do Pb facilita a entrada do metal pesado e reduz a alocação de Pb neste tecido. A diminuição na PVC causa redução na condução de água e nutrientes para toda a planta podendo causar redução do alongamento radicular e da parte aérea (Ribeiro et. al 2014).

Tanto a máxima eficiência do fotossistema (PSII) no escuro (F_v/F_m) quanto a máxima eficiência do fotossistema (PSII) na luz (F_v/F_{mL}) tiveram maiores médias com o aumento da

concentração de chumbo (Figura 7 A, B). Já nas análises dos quenchings percebeu-se que o quenching fotoquímico (qP), diminuiu a medida que aumentou as concentrações de chumbo (Figura 7C). E o quenching não-fotoquímico (NPQ) apresentou um comportamento inverso do quenching fotoquímico aumentando suas médias com o aumento das concentrações (Figura 7D).

O aumento da concentração de chumbo não afetou negativamente a máxima eficiência do fotossistema (PSII) no escuro (F_v/F_m) e na luz (F_v/F_mL). O aumento desses parâmetros com a exposição ao chumbo em *T. patens* evidencia que não houve uma forte fotoinibição (Wang et al., 2016). Rodriguez et al. (2015) não observaram diferenças em F_v/F_m com o aumento das concentrações de chumbo em *Pisum sativum*. De acordo com esses mesmos autores uma explicação para a não diminuição de F_v/F_m seria um aumento do elemento zinco nas folhas como estratégia das plantas para proteger o aparato fotossintético do estresse por chumbo.

Já têm sido reportados resultados similares ao deste estudo em *Talinus triangulare* em que a exposição ao chumbo levou a redução do quenching fotoquímico e aumento do quenching não fotoquímico (Kumar; Prasad 2015). Esta redução do quenching fotoquímico indica uma diminuição na “abertura” dos centros de reação do fotossistema II nas folhas expostas ao chumbo. Centro de reações fechados indicam que as plantas expostas ao chumbo apresentam uma absorção de radiação maior do que a capacidade de transporte de elétrons (ETR) nos fotossistemas e de fixação de carbono (Kumar; Prasad 2015). Essa situação causada pelo chumbo pode levar a uma produção de ERO maior ainda se o excesso de energia não for dissipado (Sytar et al., 2013). Em *T. patens* uma maior dissipação deste excesso de energia pode ser observada devido ao aumento do quenching não-fotoquímico (NPQ). Esta característica pode ter aliviado o estresse sendo uma estratégia de defesa dessas plantas.

CONCLUSÃO

Para *T. patens* a exposição ao chumbo não ocasionou a morte de espécimes. Estas plantas possuem mecanismos como aumento da atividade do sistema antioxidante enzimático e da síntese de prolina, aumento da espessura da epiderme e aumento da eficiência dos fotossistemas que as garantem tolerância à exposição ao metal pesado. E portanto germinam e crescem na presença do Pb podendo até acumular altas concentrações em seus tecidos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, pela bolsa de mestrado e também pelo auxílio financeiro para a compra do aparelho Fluor-Cam (PRÓ-EQUIPAMENTOS edital n. 11/2014); e agradecem a FAPEMIG e CNPq pelas bolsas de Iniciação Científica PIBICT/FAPEMIG (Veroneze Júnior, V.) e PIBIC/CNPq (Silva, J.A.) respectivamente.

REFERÊNCIAS

- A. SIGEL, H. SIGEL AND R.K.O. SIGEL. (2013) Metal Ions in Life Sciences .Cadmium: From Toxicity to Essentiality. **Ed. Springer**. Dordrecht, 11.
- ADAM, F. I. M; EL-ASHRY, Z. M. (2010). Evaluation of genotoxicity of 4-n-nonylphenol using *Vicia faba* L. **Journal of Biological Sciences**, 10, 368-372.
- AHMAD, M. S. A.; ASHRAF, M.; TABASSAM, Q.; HUSSAIN, M.; FIRDOUS, H. (2011) Lead (Pb)-Induced regulation of growth, photosynthesis, and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants at early growth stages. **Biological Trace Element Research**, 144(1-3), 1229-1239.

AKINOLA, M. O.; EKIYOYO, T. A. (2006). Accumulation of lead, cadmium and chromium in some plants cultivated along the bank of river Ribila at Odonla area of Ikorodu, Lagos state, Nigeria. **Journal of Environmental Biology**, 27, 597-599.

ARIAS J, PERALTA-VIDEA J, ELLZEY J, REN M, VIVEROS M, GARDEA TORRESDEY, J. (2010). Effects of *Glomus deserticola* inoculation on Prosopis: enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. **Environment and Experimental Botany**, 68, 139–148.

ASADA, K.; TAKAHASHI, M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: KYLE, J.; OSMOND, C. B.; ARNTZEN, K. (Ed.). Photoinhibition. Amsterdam: **Elsevier**, 227-287.

BRADFORD M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 7(72), 248–254.

MORAES, R. M., BARBOSA, S., FILHO, P. R. S., CARVALHO, M., NOGUEIRA, L. M. (2015). Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Biociências*, 13(2).

BARCELÓ, J. POSCHENRIEDER, C. (1996). Aluminium phytotoxicity, a challenge for plant scientists. *Fertilizer Research* 43, 217 e 223.

BHATTACHARJEE, S. (2010) Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**, 1-30.

BIEMELT, S., KEETMAN, U., ALBRECHT, G. (1998). Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, 116, 651-658.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. **Methods and Enzimology**, 52, 302-310.

CARRUYO, I., FERNÁNDEZ, Y., MARCANO, L., MONTIEL, X., TORREALBA, Z. (2008). Correlation of toxicity with lead content in root tip cells (*Allium cepa* L.). **Biological Trace Element Research**, 125, 276-285.

FRUGOLI, J.A., ZHONG, H.H., NUCCIO, M.L et al. (1997) Catalase 1s encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, 11, 309-314.

GAUTAM, M.; SINGH, A. K.; JOHRI, R. M. (2011). Impact of lead contaminated water on root morphology of tomato and brinjal. **Indian Journal of Horticulture**, 68, 512-515.

GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. (1984). **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley. Exegetics

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. (1997) Superoxide dismutase: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, 59, 309-314.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 48, 909-930.

GOMES, M.B.; BANYS, V.L.; SANTOS, J.; CASTRO, A.L.A.; SAENZ, E.A.C.; FIALHO, C.A. (2012) Morphogenesis in the germination and establishment phase of *Brachiaria ruziziensis* subjected to fertilization with nitrogen and potassium. **Ciência Rural**, 42, 2235-2241.

GUPTA, D.K.; HUANG, H.G.; CORPAS, F.J. (2013) Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. **Environ SciPollut Research**, 20, 2150-2161.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. (1987) Biochemical and development characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, 84, 450-455.

JIANG, Z., ZHANG, H., QIN, R., ZOU, J., WANG, J., SHI, Q., JIANG, W., LIU, D. (2014) Effects of lead on the morphology and structure of the nucleolus in the root tip meristematic cells of *Allium cepa* L. **Int. J. Mol. Sci**, 15, 13406-13423.

KOSOBROUKHOV, A.; KNYAZEVA, I.; MUDRIK, V. (2004) *Plantago major* plants responses to increase content of lead in soil: Growth and photosynthesis. **Plant Growth Regulation**, 42(2), 145-151.

KUMAR, A.; PRASAD, M.N.V.; SYTAR, O. (2012) Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. **Chemosphere**, 89, 1056-1065.

KUMAR, A.; PRASAD, M.N.V. (2015) Lead-induced toxicity and interference in chlorophyll fluorescence in *Talinum triangulare* grown hydroponically. **Photosynthetica**, 53 (1), 66-71.

LAMHAMDI, M.; BAKRIM, A.; AARAB, A.; LAFOND, R.; SAYAH, F. (2011) Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. **Comptes Rendus Biologies**, 334(2), 118-126.

MEHTA, S. K.; GAUR, J. P. (1999) Heavy-metal induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*, 143, 253-259.

MOSANGO, M., 2004. *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. [Internet] Record from PROTA4U. Grubben, G.J.H. & Denton, O.A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. <<http://www.prota4u.org/search.asp>>.

MYLONA, P.V.; POLIDOROS, A.N. ROS regulation of antioxidant genes. (2011) In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**, 101-128.

NAKANO, Y.; ASADA, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, 22(5), 867-880.

OXBOROUGH, K. (2004) Imaging of chlorophyll a: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. **Journal of Experimental Botany**, 55, 1195-1205.

Pedroso-de-Moraes, C.; Souza-Leal, T.; Panosso, A.R.; Souza, M.C. (2012) Effect of chemical scarification and concentration of nitrogen on the germination and in vitro development of *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae: Vanilloideae). **Acta Botanica Brasílica**, 26, 714-719.

PENA, L.B., MÉNDEZ, A. A.E., MATAYOSHI, C. L., ZAWOZNICK, M. S., GALLEGO, S. M. (2015) Early response of wheat seminal roots growing under copper excess. **Plant Physiology and Biochemistry**, 87, 115-123.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; PIRES, M. F.; PASQUAL, M. (2011) Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por Arsênio. *Planta daninha*, 29, 259-267. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582011000200003>

PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, L. C.A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E.M. (2013) Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@ambiente**, 7(1), 36-43.

POURRUT, B. et al. (2011) Lead Uptake, toxicity, and detoxification in plants. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 213, 113-136.

RIBEIRO, E. S., PEREIRA, F. J., SOUZA, T. C. D., & OLIVEIRA, C. D. (2014) Anatomia, nutrição e fisiologia de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli ssp. *grandiflorus* submetida ao Chumbo, 78.

RODRIGUEZ, E.; SANTOS, M.C.; AZEVEDO, R.; CORREIA, C.; MOUTINHO-PEREIRA; J.; OLIVEIRA, J.M.P.F.; DIAS, M.C. (2015) Photosynthesis light-independent reactions are sensitive biomarkers to monitor lead phytotoxicity in a Pb-tolerant *Pisum sativum* cultivar. **Environ Sci Pollut Res** 22, 574–585.

ROSSATO, L. V.; NICOLOSO, F. T.; FARIAS, J. G.; CARGNELLUTI, D.; TABALDI, L. A.; ANTES, F. G. SCHETINGER, M. R. C. (2012) Effects of lead on the growth, lead accumulation and physiological responses of *Pluchea sagittalis*. **Ecotoxicology**, 21(1), 111-123.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. (2005) Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17(1) 35-52.

SHARMA, P. et al., (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany** 1-26.

SYTAR O., KUMAR A., LATOWSKI D. Et al.(2013) Heavy metals induced oxidative damage, defence reactions and detoxification mechanisms in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, 35, 985-999.

SOUZA, T. C.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PARENTONI, S. N.; MAGALHÃES, P. C. (2009) Morphoanatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil and Environment**, 55(11), 504-510.

THANGAVEL, P.; SUBBURAM, V. (1998) Effect of trace metals in restoration potential of leaves medicinal plant *Portulacaoleracea*. **Biology Trace Elements Research**, 61, 313-321.

TORRELLA, W.A.; RICE, L.A. (1986) Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. **Plant and Soil**, 93, 241-247.

TRIPATHI, B. N.; GAUR, J. P. (2004) Relationship between copper and zinc induced oxidative stress and proline accumulation in *scenedesmus* sp. **Planta**, 397-404.

WANG, Y.; LI, Y.; MA, C.; QIU, D. (2016) Gas exchange, photosystem II photochemistry, and the antioxidant system of longan plant (*Dimocarpus longan* Lour.) leaves in response to lead (Pb) stress. **Plant Omics Journal**, v. 9(4), 240-247.

WIERZBICKA, M.; OBIDZIŃSKA, J. (1998) The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. **Plant Science**, 137(2), 155-171.

XU, J., DUAN, X., YANG, J., BEECHING, J. R. & ZHANG, P. (2013) Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. **Plant Physiology**, 161(3), 1517–1528.

FIGURAS

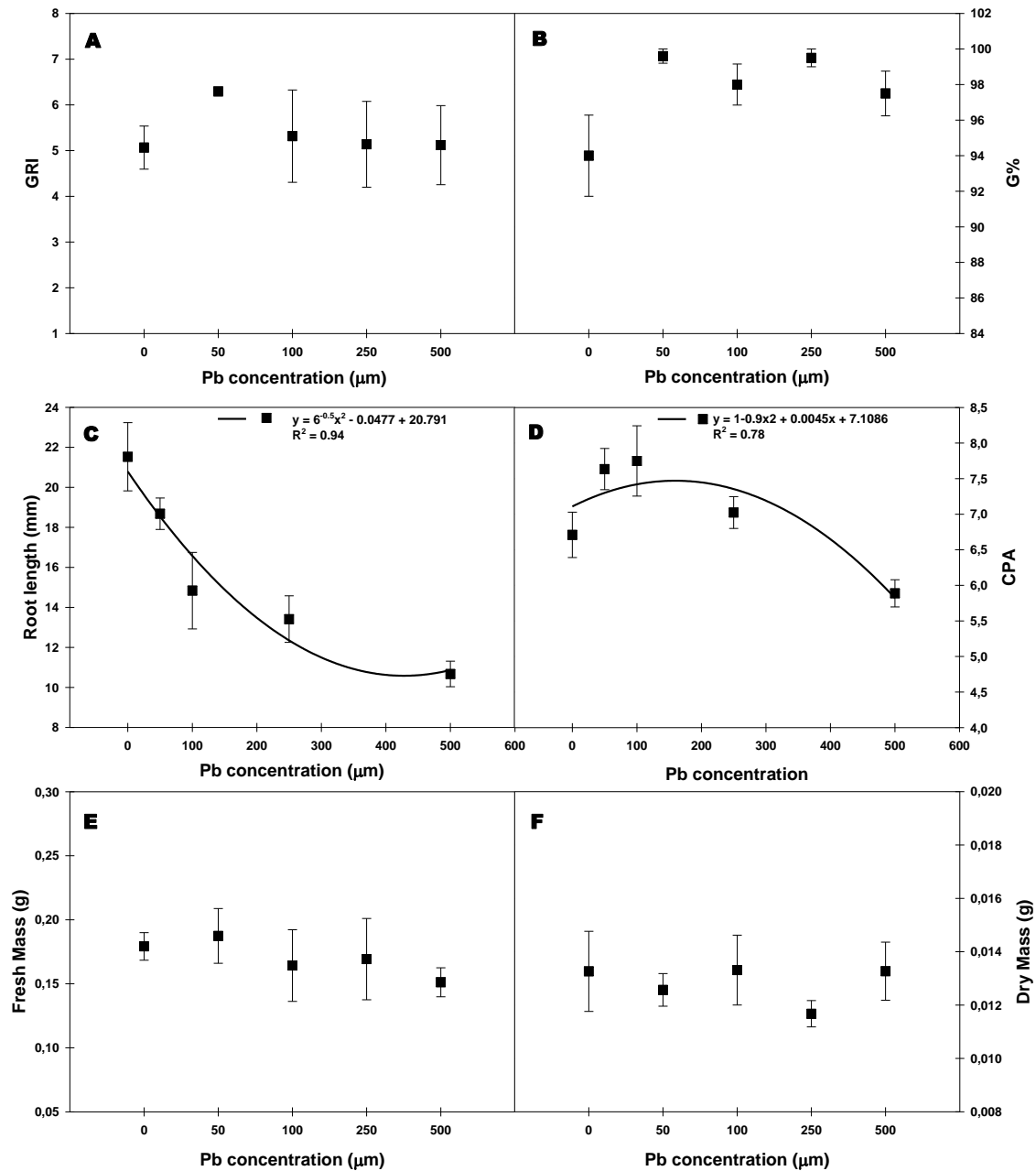


Figura 1. (A) Índice de Velocidade de Germinação (GRI), (B) Percentual de germinação (C) Comprimento radicular (CR), (D) Comprimento de parte aérea (CPA), (E) Massa fresca e (F) Massa seca de *Talinum patens* exposta a diferentes concentrações de chumbo. Os quadrados indicam a média \pm erro padrão, n = 5.

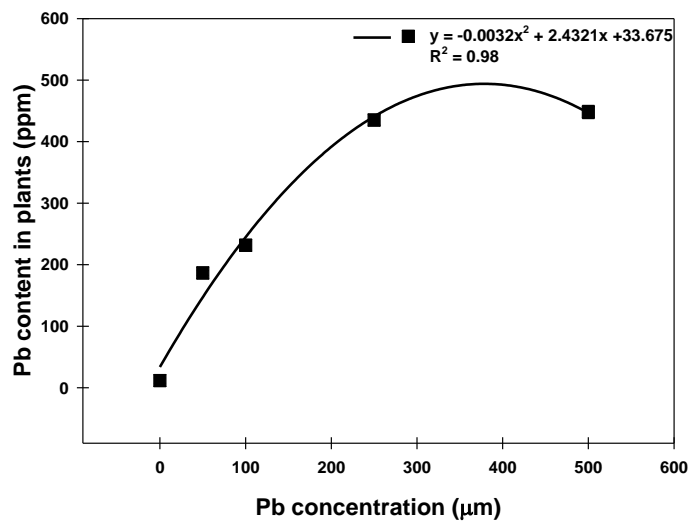


Figura 2. Teor de Pb em *Talinum patens*. Os quadrados indicam a média \pm erro padrão, n = 5.

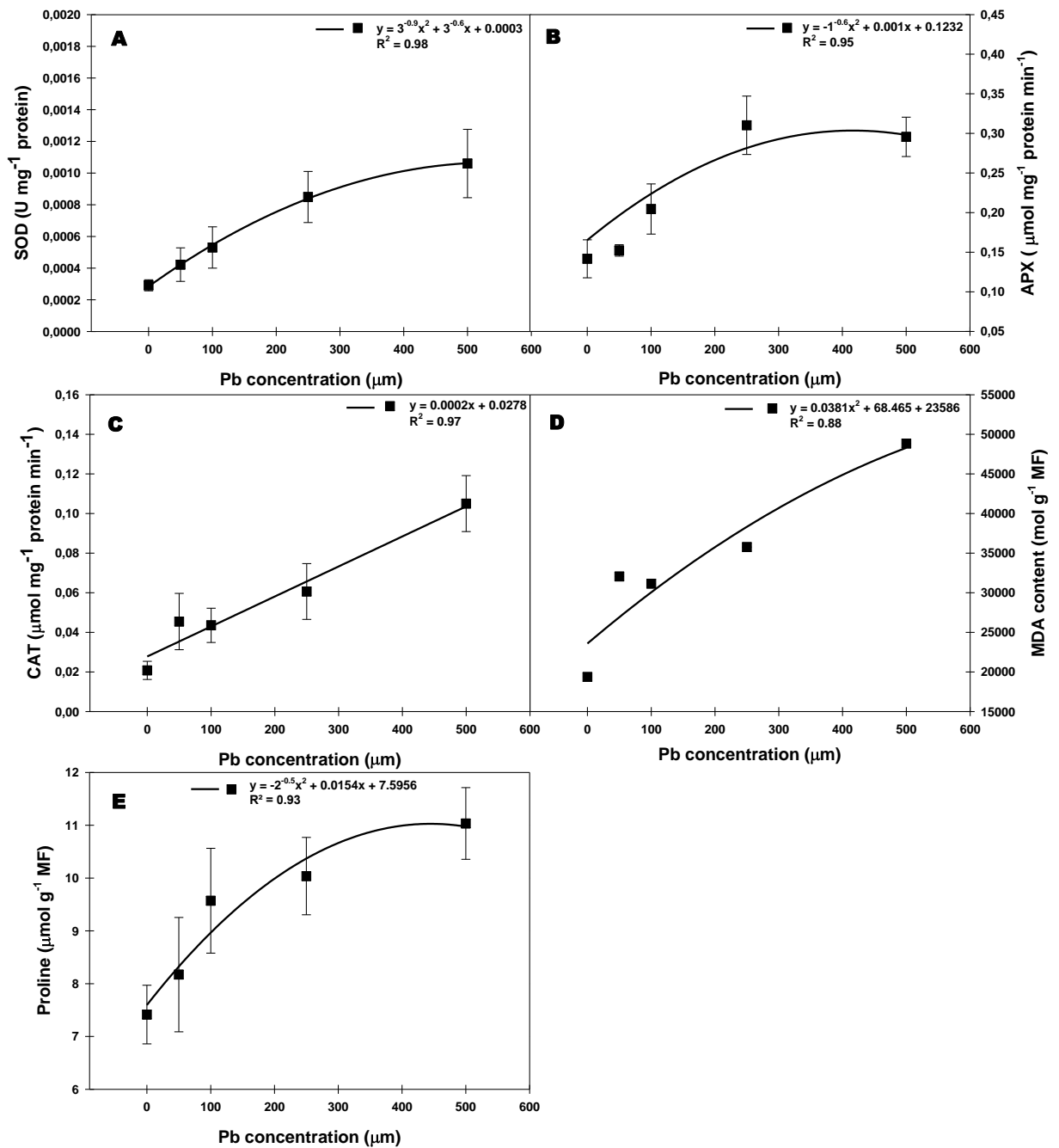


Figura 3. Peroxidação lipídica (A), Teor de prolina (B), Dismutase do superóxido (C), Peroxidase do ascorbato (D) e Catalase (E) em *Talinum patens* exposta ao chumbo. Os quadrados indicam a média \pm erro padrão, n = 5.

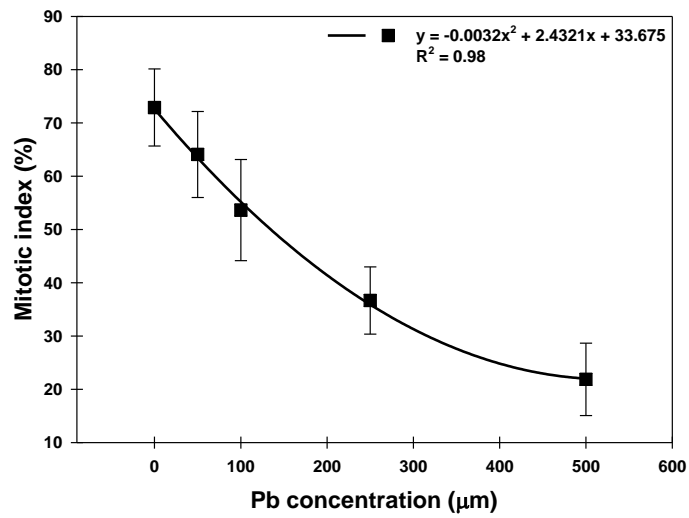


Figura 4. Índice mitótico em *Talinum patens* exposta ao chumbo. Os quadrados indicam a média \pm erro padrão, n = 5.

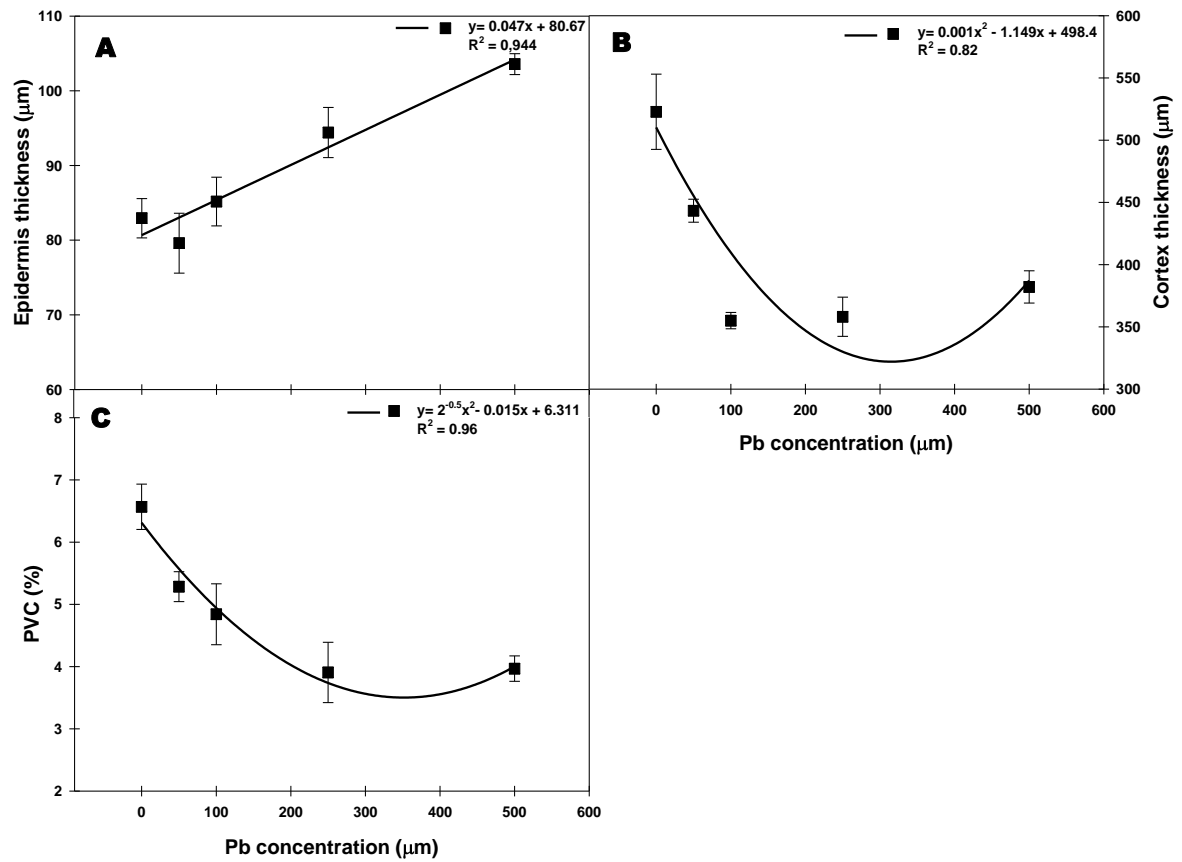


Figura 5. Espessura da epiderme (A), espessura do cortex (B) e proporção da área do cilindro vascular em relação à área total da raiz (PVC) (C) em *Talinum patens* exposta ao chumbo. Os quadrados indicam a média \pm erro padrão, $n = 5$.

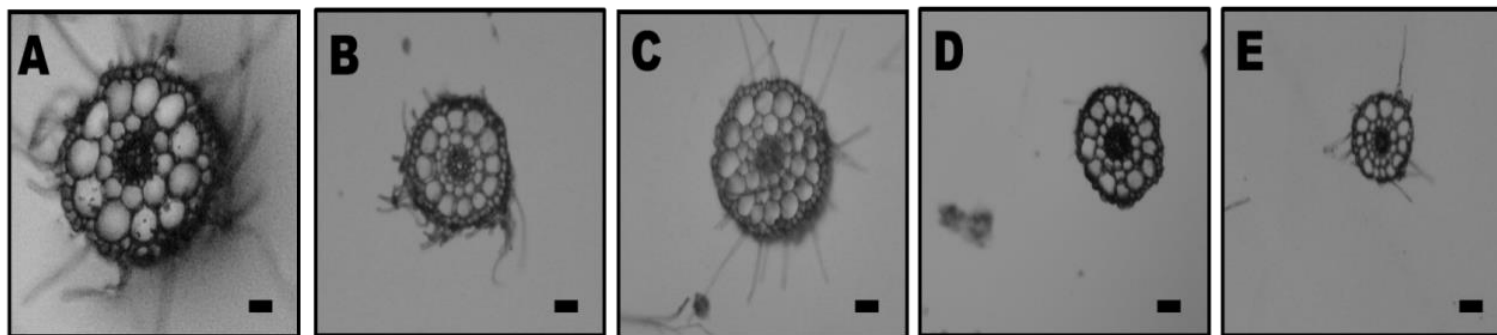


Figura 6. Secções transversais das raízes de *Talinum patens* expostas ao chumbo.

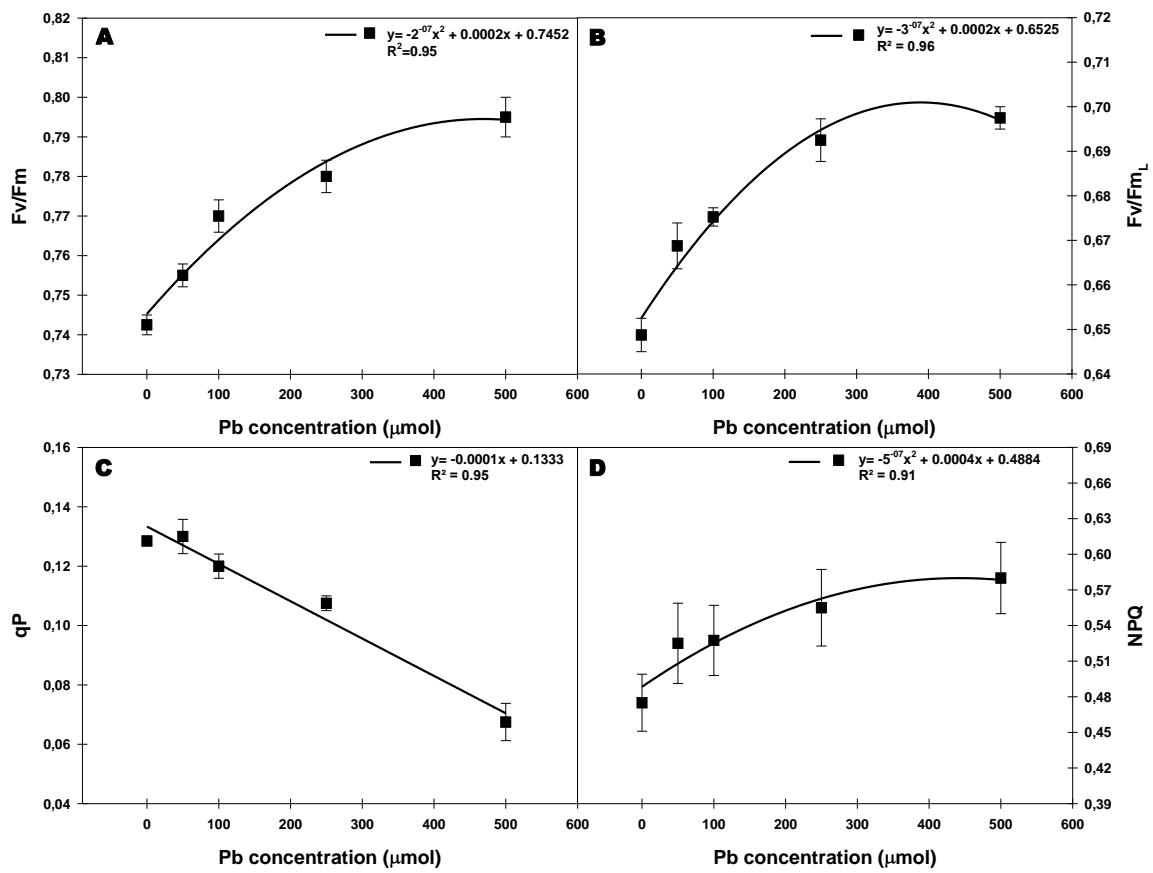


Figura 7. Parâmetros de fluorescência da clorofila a de *T. patens* expostas ao chumbo. (A) máxima eficiência do fotossistema (PSII) no escuro (F_v/F_m); (B) máxima eficiência do fotossistema (PSII) na luz (F_v/F_{mL}); (C) quenching fotoquímico (qP); (D) quenching não-fotoquímico (NPQ). Os quadrados indicam a média \pm erro padrão, $n = 5$.