

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ELBA SHARON DIAS

**EFEITO FITOTÓXICO DO CÁDMIO E AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *Bowdichia virgilioides* KUNTH.**

ALFENAS/MG

2018

ELBA SHARON DIAS

**EFEITO FITOTÓXICO DO CÁDMIO E AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *Bowdichia virgilioides* KUNTH.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG como parte dos requisitos do Programa de Pós graduação em Ciências Ambientais, área de concentração Tecnologias Ambientais para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. Plinio Rodrigues dos Santos Filho

ALFENAS/MG

2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3701-9685 (Coordenação) / (35) 3701-9262 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



ELBA SHARON DIAS

“Efeito fitotóxico do cádmio e ação do óxido nítrico no desenvolvimento inicial de *Bowdichia virgilioides kunth*”

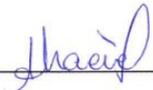
A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 29 de junho de 2018.

Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

Profª. Dra. Anna Lygia de Rezende Maciel
Instituição: IFSULDEMINAS - Muzambinho

Assinatura: 

Prof. Dr. Breno Régis Santos
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

A Deus que me dá forças para superar as adversidades da vida, meu refúgio e fortaleza.

A minha família amada que sempre foi meu braço forte: meu pai Faride que sempre nos incentivou a estudar, aos meus irmãos Marcos, Carlos, Patrícia e Sayonara com vocês tudo tem mais sentido, e à você querido sobrinho João Gabriel, cada minuto longe de ti foi uma eternidade, te amo muito. A vocês eu dedico este trabalho.

A Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) e ao Departamento de Bioquímica, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos professores Plínio Rodrigues dos Santos Filho e Breno Régis Santos, pela orientação e ensinamentos.

A Prof. Anna Lygia pela participação na banca e auxílio quando precisei.

Agradecimento especial aos técnicos de laboratório: Gabriela Ezequiel, Gabriel e George pela atenção dedicada e suporte para a realização das análises, e D. Ciomara pela amizade e apoio sempre que necessário.

Aos amigos e irmãos da querida república: Kamilla, Valdeci, Natanael e Priscila, pelos momentos de cumplicidade, risadas, companheirismo e valiosa amizade. A Cacao minha companheira canina nesta jornada.

Aos amigos de laboratório que tanto me ajudaram na execução dos experimentos e dava aquela "força" nos momentos difíceis: Ursuléia, Roberto, Valdir, Giovanna, Gabriel e Thaynara, muito obrigada por tudo, valeu!

Aos amigos do curso de pós-graduação: Danilo, Lincoln, Marco Aurélio, Gabriela Azevedo, Frederico, Caroline, Aline e Matheus Coutinho e Carlos, pela amizade e convivência.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho pelo apoio para a realização desta pós-graduação.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

RESUMO

O cádmio é um metal pesado tóxico que representa ameaça crescente para o meio ambiente. Doses elevadas deste metal causam fitotoxicidade, provocando redução significativa na qualidade e quantidade de plantas cultivadas. O doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP) é relatado para aliviar os efeitos tóxicos de alguns metais pesados como o Cd. Este estudo teve por objetivo avaliar os impactos da aplicação do Cd e SNP isolados ou em combinação na germinação da espécie *Bowdichia virgiloides* Kunth, popularmente conhecida como sucupira-preta. Esta espécie arborea é pertencente à família Fabaceae, com ampla dispersão pelo Brasil, empregada na construção civil e recuperação de áreas degradadas, além de possuir características medicinais relevantes. Foram avaliados a influência destes compostos químicos sobre o índice de velocidade e porcentagem de germinação, biomassa fresca, atividade antioxidante enzimática (SOD, CAT e APX), conteúdo de açúcares totais, amido e aminoácidos na raiz da sucupira-preta. No experimento I e II as sementes foram submetidas a concentrações de Cd e SNP respectivamente, nas concentrações de: 0; 10 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 250 μM e 500 μM , e no experimento III (0/ água destilada; 250 μM de Cd; 250 μM de Cd + 250 μM de SNP; 250 μM de Cd + 500 μM de SNP; 250 μM de SNP e 500 μM de SNP). Os experimentos foram conduzidos em BOD à 30°C, fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro). O índice de velocidade de germinação (IVG) e biomassa fresca (BF) não apresentaram diferença estatística nas diferentes concentrações para o experimento com SNP, a porcentagem de germinação (%G) e alongamento de raiz (AR) tiveram um decréscimo para a maior concentração. Na presença do Cd foi observado a diminuição do AR nas concentrações de 250 e 500 μM , e o tratamento com 50 μM Cd apresentou 93%G, os outros parâmetros avaliados não sofreram redução. Não houve diferença estatística para %G, parte aérea (PA) e BF no experimento III. Observou-se decréscimo no parâmetro AR em relação ao controle neste experimento. Houve um aumento no conteúdo de açúcares totais na raiz de sucupira-preta em todos os tratamentos em relação ao controle. Em relação ao conteúdo de amido, a testemunha e o tratamento na concentração de 500 μM de SNP apresentaram o menor valor em raízes de sucupira-preta, enquanto nas concentrações de 250 μM de Cd, 250 μM de SNP e nos tratamentos com a combinação de cádmio e SNP (Cd+SNP 250 e Cd 250+SNP 500), ocorreu um aumento do conteúdo deste metabólito. Para o teor total de aminoácidos, verifica-se que não houve diferença significativa para o controle e as concentrações Cd 250 e SNP 250 μM , enquanto a concentração de SNP 500 μM apresentou o menor teor. As enzimas

antioxidantes SOD e APX, apresentaram maior atividade que a CAT. Na concentração 250 μM de SNP ocorreu um aumento da enzima SOD em relação aos demais tratamentos. A atividade da APX na raiz, foi menor nas sementes submetidas ao Cd 250 μM e associação deste metal com o doador de óxido nítrico (SNP) em relação aos demais tratamentos. Houve um aumento da atividade da APX nas concentrações SNP 250 μM e SNP 500 μM . A atividade da CAT neste estudo não foi significativa. Sugere-se que a sucupira-preta possui tolerância ao metal Cádmio, considerando que apenas altas concentrações foram capazes de causar alguma toxicidade reduzindo o alongamento de raiz.

Palavras-chave: Metal pesado. Nitroprussiato de sódio. Sucupira-preta. Tolerância. Metabólitos primários. Enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Cadmium is a toxic heavy metal that poses a growing threat to the environment. High doses of this metal cause toxicity in plants, causing significant reduction in the quality and quantity of cultivated plants. The nitric oxide donor, sodium nitroprusside (SNP) is reported to relieve the toxic effects of some heavy metals like Cd. This study aims to evaluate the impacts of the application of Cd and SNP alone or in combination on the germination of the species *Bowdichia virgiloides* Kunth, popularly known as *sucupira-preta*. This arboreal species belongs to the family Fabaceae, with wide dispersion by Brazil, used in the civil construction and recovery of degraded areas, besides having relevant medicinal characteristics. The influence of these chemical compounds on the speed index and percentage of germination, fresh biomass, enzymatic antioxidant activity (SOD, CAT and APX), content of total sugars, starch and amino acids in *sucupira-preta* root were evaluated. In experiments I and II the seeds were submitted to doses of Cd and SNP, respectively, in concentrations of: 0; 10 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 250 μM and 500 μM , and in experiment III (0 / distilled water, 250 μM Cd, 250 μM Cd + 250 μM SNP, 250 μM Cd + 500 μM SNP, 250 μM SNP and 500 μM SNP). The experiments were conducted in BOD at 30 ° C, photoperiod of 16/8 h (light / dark). The germination rate (IVG) and fresh biomass (BF) did not present statistical difference at the different concentrations for the SNP experiment, the percentage of germination (% G) and root lengthening (RA) had a decrease for the highest concentration. In the presence of Cd, the reduction of RA in the concentrations of 250 and 500 μM was observed, and the treatment with 50 μM Cd presented 93% G, the other parameters evaluated were not reduced. There was no statistical difference for% G, aerial part (PA) and BF in experiment III. There was a decrease in the AR parameter in relation to the control in this experiment. There was an increase in total sugars content in *sucupira-preta* root in all treatments in relation to the control. In relation to the starch content, the control and the treatment in the concentration of 500 μM of SNP presented the lowest value in *sucupira-preta* roots, while in the concentrations of 250 μM of Cd, 250 μM of SNP and in the treatments with the combination of cadmium and SNP (Cd + SNP 250 and Cd 250 + SNP 500), there was an increase in the content of this metabolite. For the total amino acid content, it was verified that there was no significant difference for the control and the Cd 250 and 250 μM SNP concentrations, while the concentration of SNP 500 μM presented the lowest content. The antioxidant enzymes SOD and APX presented higher activity than CAT. In the 250 μM concentration of SNP, an

increase of the SOD enzyme occurred in relation to the other treatments. The APX activity in the root was lower in the seeds submitted to 250 μM Cd and the association of this metal with the nitric oxide donor (SNP) in relation to the other treatments. There was an increase in APX activity at 250 μM SNP and 500 μM SNP. CAT activity in this study was not significant. It is suggested that sucupira-preta has a tolerance to Cadmium metal, considering that only high concentrations were able to cause some toxicity by reducing root elongation.

Keywords: Heavy metal. Sodium nitroprusside. Sucupira-preta. Tolerance. Primary metabolites. Antioxidant enzymes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Importância e caracterização da espécie <i>Bowdichia virgilioides</i>	13
2.1.1	Importância econômica e ecológica.....	13
2.2	Aspectos fisiológicos da germinação de sementes.....	15
2.3	Plantas sob estresse.....	18
2.3.1	Sistema de defesa antioxidante em plantas sob estresse.....	19
2.4	Metais pesados e contaminação.....	21
2.4.1	Cádmio.....	22
2.5	Oxido nítrico: aspectos gerais.....	25
2.5.1	NO e efeito em plantas estressadas com metal pesado.....	26
3	JUSTIFICATIVA.....	29
4	OBJETIVOS.....	31
4.1	Objetivo geral.....	31
4.2	Objetivos específicos.....	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1	Obtenção de sementes.....	32
5.2	Preparo das sementes e tratamentos.....	32
5.3	Análise de metabólitos primários.....	33
5.4	Análises enzimáticas.....	34
5.4.1	Determinação da atividade da superóxido dismutase.....	34
5.4.2	Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato.....	35
5.4.3	Determinação da atividade da catalase.....	35
5.4.4	Quantificação das proteínas solúveis totais.....	35
5.5	Análise dos dados.....	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6.1	Aspectos fisiológicos: germinação e desenvolvimento das plântulas de sucupira-preta sob influência do Cd e SNP.....	37
6.2	Açúcares, amido e aminoácidos.....	44
6.3	Efeito do Cd, SNP e Cd + SNP sobre as atividades enzimáticas SOD, GPX e CAT.....	47
7	CONCLUSÃO.....	52
8	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

A grande quantidade de efluentes contaminados é um dos grandes problemas ambientais da sociedade moderna. Esses efluentes são provenientes das diversas atividades industriais, entre os variados tipos de poluentes lançados nos ecossistemas, pode-se encontrar os metais pesados ou elementos traços (WANG et al.; 2014).

A crescente contaminação por metais como o cádmio e o níquel, surgiram a partir de 1940, devido ao uso intensificado de baterias. Outros usos industriais do Cd como a fabricação de pigmentos, soldagens de juntas, reagentes para a fabricação de plástico, placas de circuitos eletrônicos, atividades de mineração, queima de fósseis e produção de fertilizantes, contribuíram para este tipo de contaminação. É necessário ressaltar que as fontes naturais também são responsáveis por emissões de elementos poluidores no meio ambiente, como por exemplo as atividades vulcânicas, transporte pelo vento de partículas, queima de florestas, entre outras. A contaminação de solos e água por metais pesados tornou-se um grave problema ambiental afetando a vida e reprodução das espécies (MARSOLA; MIYAZAWA; PAVAN, 2005).

Outros fatores como o lixo urbano, utilização de resíduos de tratamentos de esgotos para a adubação contribui para a contaminação, mas as atividades antropogênicas deste tipo de contaminação é geralmente de 3 a 10 vezes superior que à contaminação natural (PEREIRA et al.; 2002; MALAVOLTA, 1994).

Os metais pesados ou elementos traços, são elementos químicos que têm peso específico maior que 5 g cm^{-3} , daí o termo metais pesados. Em pequenas quantidades, alguns deles são essenciais para plantas e microorganismos, porém em altas concentrações, tornam-se tóxicos ao meio ambiente e homem (ROGERS et al.; 2007).

As plantas constituem-se como o principal ponto de entrada dos metais pesados como o cádmio na cadeia alimentar. Os metais pesados dificultam o metabolismo normal da planta como: redução de enzimas envolvidas na síntese de pigmentos, danos a membrana lipídica, danos à fotossíntese e à respiração, danos ao DNA, inibição dos processos de divisão celular, podendo inibir a germinação da planta. Estas condições desfavoráveis impostas as plantas são denominadas estresses ambientais (ZADEH et al.; 2008; AHMAD et al.; 2015).

O metal pesado Cádmio possui elevado poder de toxicidade e persistência, não apresenta nenhum tipo de benefício ao organismo humano. Este elemento possui densidade de $8,6 \text{ g cm}^{-3}$, considerado altamente tóxico e não essencial às plantas, apesar de ser relativamente raro é um dos metais mais estudados nos últimos anos (MONNI et al.; 2001). O aumento

contínuo dos níveis de cádmio em solos agrícolas é comumente observado em regiões mais povoadas. Aceleração da senescência foliar, ruptura das membranas celulares, interferência no processo fotossintético (PSII) e lignificação do ápice das raízes, são alguns dos efeitos dos níveis tóxicos deste metal (HORVÁTH et al.; 1996).

O nitroprussiato de sódio (SNP) é um doador de óxido nítrico (NO), relatado na literatura como uma substância que tem capacidade de aliviar a toxicidade de alguns metais como o Cd e Cu. Este composto químico pode favorecer a germinação e vem se destacando como estimulador do processo para muitas espécies, mas ainda poucos estudos avaliam o efeito do NO na germinação de plantas nativas (KHAIRY et al., 2016). O NO é um radical livre endógeno formado numa variedade de tipos celulares e pode ser considerado entre outras funções como um citoprotetor, visto que este pode regular o nível e a toxicidade das espécies reativas de oxigênio em plantas sob fatores de estresse como os provocados pelo cádmio (GILL et al.; 2012).

Além de existir uma demanda por informações de espécies que possuem potencial para serem implantadas em áreas degradadas, e embora o conhecimento das consequências da contaminação do solo por metais pesados serem bem entendidas atualmente, é necessário conhecer os aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação e comportamento das espécies nativas, como a *Bowdichia virgilioides* em situações de estresses.

Devido ao avanço da degradação ambiental e a ampla toxicidade do metal pesado cádmio para as plantas, animais e saúde do homem, e pelo fato de que as plantas são o elo de ligação entre os metais pesados e todos os organismos vivos via cadeia alimentar, é que se faz necessário o presente estudo. Dentre os objetivos específicos deste trabalho destacam-se: estudar os efeitos das doses do Cd e doador de NO (SNP) no processo de germinação da sucupira-preta, avaliar o desenvolvimento inicial das plântulas sob estes compostos, determinar e discutir os efeitos do Cd e SNP sobre a atividade das enzimas antioxidantes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância e caracterização da espécie *Bowdichia virgilioides*

Bowdichia virgilioides, é uma espécie arbórea de grande porte, pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente como sucupira-preta, sucupira-açu, sucupira-do-cerrado, sucupira-do-campo e/ou paricarana. Está amplamente dispersa pelo país, com maior ocorrência nas regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste, podendo também ser encontrada na Bolívia, e norte da América Central. Possui baixa densidade populacional no Brasil, embora tenha uma distribuição uniforme (LORENZI, 2002; ALMEIDA et al., 1998; SILVA et al., 2014).

A espécie, é uma planta decídua, heliófita e xerófita, podendo atingir até 20 m de altura, apresenta folhas compostas, pinadas com folíolos pubescentes. Encontrada em terrenos altos e de drenagem rápida, ocorre tanto em formações primárias quanto secundárias. A fase de floração da sucupira-preta ocorre entre os meses de agosto e setembro, quase totalmente despida de folhagem. Os frutos são legumes, achatados, indeiscentes, contendo sementes pequenas com 3 a 5 mm de comprimento e coloração avermelhada, conforme pode ser observada na figura 1 (RIZZINI, 1990; LORENZI, 2002).

Segundo Albuquerque (2007) a composição química das sementes de sucupira-preta é representada por 20% de proteínas da matéria seca, 15% de lipídios, 12,4% fibra bruta e 2,6% cinzas.

2.1.1 Importância econômica e ecológica

Planta pioneira, de cerne pardo escuro que se adapta a terrenos pobres e secos. Possui diversos potenciais de aplicação como, medicina popular para combater o diabetes, inflamações em geral e reumatismos, paisagismo em geral, recuperação de áreas degradadas, produção apícola e fabricação de móveis de luxo, acabamento internos, pontes, entre outros usos devido ao fato de sua madeira apresentar características como alta densidade e durabilidade natural (BRANDÃO e FERREIRA, 1991; LORENZI, 2002).

Segundo Arantes, et al., (2015) esta espécie tem sido muito reportada em trabalhos para reflorestamento e colonização de espécies. Comunidades indígenas já utilizam a muito tempo decoctos dessa planta para tratamento de várias doenças (BOURDY et al., 2000).

Outras aplicações da *B. virgilioides* são os preparados utilizados pela medicina popular para o tratamento da leishmaniose e malária (BOURDY et al., 2000; DEHARO et al., 2001). O óleo essencial das folhas apresenta atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos (ALMEIDA et al., 2000). Foi observado que dois isoflavonóides de *B. virgilioides* atuam como eficientes larvicidas contra *Aedes aegypti* (BEZERRA-SILVA et al., 2015).

Vieira et al., (2013) investigaram o possível efeito ansiolítico do extrato aquoso da casca do caule de sucupira-preta em camundongos, constatando que o extrato foi efetivo na indução de efeitos ansiolíticos com tratamento agudo e sub-crônico sem comprometer a atividade motora, demonstrando uma vantagem em relação aos antidepressivos.

Em estudos sobre a composição química desta espécie foi constatado a presença de alcaloides, terpenos e derivados de benzofurano na casca e no caule, os constituintes voláteis, flavonoides e isoflavonas nas raízes, óleos essenciais, taninos entre casca e folhas e geraniol, cariofilina e antocianina em frutos (JORGE-NETO, 1974; MARINHO et al., 1994; ARRIAGA, MACHADO e CRAVEIRO, 1998; BARBOSA-FILHO et al., 2004; JUCK et al., 2006; THOMAZZI et al., 2010; SILVA et al., 2014).

Segundo Ribeiro e Walter (2008), a *B. virgilioides* é uma das espécies que ocorre normalmente isolada na paisagem e tem característica dominante, com possibilidade de atuar como espécie nucleadora. Em áreas abertas e degradadas a colonização de espécies como a sucupira-preta pode influenciar o processo de nucleação, isto é, as espécies nucleadoras tem capacidade de promover alterações bióticas e abióticas no ambiente ao entorno, promovendo e facilitando a ocupação deste ambiente por novas espécies (FRANKS, 2003; SCHLAWIN e ZAHAWI, 2008; ARANTES *et al.*, 2015). Outro fator de relevância é que indivíduos nucleadores atraem animais, especialmente as aves, formando abaixo dos núcleos um banco rico de sementes (MCDONNELL e STILES, 1983; GALINDO-GONZÁLES; GUEVARA; SOSA, 2000).

A importância da sucupira-preta é confirmada pela sua inclusão na primeira edição da farmacopeia brasileira e por inúmeros estudos que avaliam as suas propriedades medicinais (ALMEIDA et al., 2000; BRANDÃO et al., 2006).

Esta espécie vem sofrendo redução do número de indivíduos em seu ambiente natural devido a exploração desordenada, apesar da sua importância econômica. Outro fator de impacto negativo é a formação de mudas limitadas em função das condições de germinação, já que a semente de sucupira-preta possui dormência (TAO, 2000).



Figura 1- Aspectos gerais de *Bowdichia virgilioides* Kunth e seus principais órgãos componentes.

Fonte: LORENZI (2002).

2.2 Aspectos fisiológicos da germinação de sementes

A germinação é compreendida como uma complexa sequência de eventos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, sendo composta das seguintes etapas: embebição, atividade enzimática e respiratória, translocação, assimilação e desenvolvimento. No desenvolvimento vegetal, a germinação é considerada uma fase crítica devido a fatores ambientais de natureza extrínseca e intrínseca como a própria semente, ou seja a processos fisio-metabólicos (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Dentre esses fatores, a dormência assume um papel relevante devido a sua função ecológica, e por outro lado por constituir-se num impedimento a germinação (POPINIGIS, 1985).

Devido ao fato de ser considerada uma fase crítica, tem sido conduzidos inúmeros estudos que abrangem os mais diferentes aspectos ligados à bioquímica e à fisiologia da germinação, associados a temperatura, dormência, reguladores de crescimento e luz (BEWLEY e BLACK, 1994; LABOURIAU; NODA; BORGHETTI, 1995; HERMANSEN et al., 2000; PANDEY et al., 1981).

O processo de germinação de sementes é a retomada das atividades metabólicas do eixo embrionário, que encontrava-se paralisado nas fases finais do processo de maturação. Quando estimulado por condições ambientais ou manipuladas, o eixo embrionário desenvolve-se, ocorrendo o rompimento do tegumento pela radícula (BIANCHETTI, 1991; BORGES e RENA, 1993; BEWLEY e BLACK, 1994).

A embebição, processo caracterizado pela entrada de água na semente através do tegumento, é o passo inicial da germinação, promovendo a turgescência das células aumentando a permeabilidade ao O₂, e conseqüentemente favorecendo o rompimento do tegumento e a emergência das estruturas internas das sementes. A composição química da semente é um dos fatores que influenciam na absorção de água, as proteínas são mais ávidas por água que o amido, já os lipídios são hidrófobos (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; BEWLEY e BLACK, 1994; MARCOS FILHO, 2005).

A água exerce um fator determinante sobre o processo de germinação, pois de sua absorção resulta a reidratação dos tecidos com a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que resultam no fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento do eixo embrionário (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O processo de absorção de água pelas sementes evolui de acordo com um padrão trifásico, proposto por Bewley e Black (1978). A Fase I é caracterizada pela transferência rápida de água do substrato para a semente, devido a diferença acentuada entre os potenciais hídricos. Surgindo nesta fase os primeiros sinais de reativação do metabolismo, aumento da atividade respiratória e liberação de energia para a germinação, ativação de enzimas e síntese de proteínas a partir do RNAm armazenada no processo final de maturação. A velocidade de absorção de água é distinta nas partes constituintes da semente. Na Fase II ocorre a redução drástica da velocidade de hidratação e da intensidade de respiração, sendo esta a fase mais longa do processo, na qual a semente praticamente deixa de absorver água. A semente prepara-se para a germinação por meio da degradação das substâncias de reserva, gerando energia para a retomada do crescimento do embrião. Esta fase é caracterizada por atividades constituintes do processo bioquímico preparatório, necessária para síntese de enzimas, DNA e de RNAm exauridos na fase I. A Fase III é caracterizada pelo visível crescimento do embrião, sendo identificado pela protusão da raiz primária e crescimento da plântula. Os mesmos autores enfatizam que o início das Fases II e III não implica na paralisação da fase anterior, de modo que a semente pode apresentar as três fases simultaneamente, devido a fatores como a

permeabilidade da cobertura e composição química dos tecidos de reserva (BEWLEY e BLACK, 1994).

Em decorrência da hidratação das sementes, os sistemas enzimáticos são ativados, processo esse de extrema importância para o desenvolvimento e germinação de sementes, visto que as enzimas estão diretamente envolvidas no processo respiratório e na digestão de reservas, produzindo energia para a biossíntese de novos tecidos (BEWLEY e BLACK, 1994).

Segundo Nery (2005), a germinação é uma característica difícil de avaliar devido ao fato de que algumas espécies como a sucupira-preta apresentarem o fenômeno da dormência, interferindo acentuadamente nos resultados dos testes.

As sementes são o principal veículo de multiplicação de espécies, esforços para elucidar e aprimorar conhecimentos sobre os efeitos dos fatores que possam prejudicar ou beneficiar o processo de germinação, são fundamentais para o estabelecimento de diagnósticos e o fornecimento de informações que possam auxiliar na tomada de decisões e medidas mitigadoras (ALBUQUERQUE, 2007).

Sementes são unidades de dispersão das plantas, constituídas por três distintos compartimentos que são o embrião (cotilédones e eixo embrionário), o endosperma e o tegumento. Cada uma destas estruturas tem uma função específica. O endosperma é o tecido que contém fontes de reservas tais como: proteínas, carboidratos, lipídeos e nutrientes minerais para dar suporte à germinação e conseqüentemente, favorecem o desenvolvimento e crescimento do embrião (LINKIES, 2010).

Os nutrientes de reserva na semente é expressa pelos teores encontrados nas suas partes constituintes, sendo que esses quantitativos variam entre espécies, cultivares e depende das condições do ambiente em que a semente foi produzida (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988). As fontes de reservas de energia são compostas por variados materiais, podendo ser localizada dentro de diferentes tecidos de armazenamento e distribuída de forma irregular dentro de qualquer um dos tecidos de armazenamento (Bewley et al., 2013).

Os tecidos de estocagem das sementes são alvos de intensa atividade metabólicas durante o processo de germinação, isto ocorre a partir da entrada de água nas sementes, estas por sua vez reúnem todas as condições necessárias pra promover o crescimento do embrião.

As substâncias e os seus produtos de degradação mobilizados a partir da germinação e durante o desenvolvimento das plântulas, são usados para diferentes propósitos, como: geração de energia e a produção de matéria prima, estes são usados na construção de novos tecidos e células, controle da embebição, distribuição de água nos tecidos das sementes, e

controle da expansão celular dos cotilédones (MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1975; LIMA, 2000).

Durante a germinação, das substâncias que são mobilizadas, os lipídios são as reservas que mais requerem etapas para torna-se um produto de energia disponível para consumo das células. As proteínas de reserva de sementes são depositadas em geral nas organelas celulares especiais denominadas corpos protéicos, e são consumidas a medida em que os esqueletos carbônicos, compostos nitrogenados como aminoácidos e enzimas, são requeridos pelo embrião. Já os açúcares livres são encontrados em quantidades muito variáveis em sementes de diferentes espécies e raramente esse metabólito primário é o principal carboidrato de armazenamento (BEWLEY et al., 2013).

Obter conhecimento sobre a composição química, deposição e mobilização de reservas, são indispensáveis para a tecnologia de produção de sementes, pois estes fatores influenciam a germinação e vigor, caracterizando também o potencial de armazenamento das sementes (Buckeridge et al., 2004; Bewley et al., 2013).

2.3 Plantas sob estresse

O êxito no estabelecimento das espécies depende do processo de germinação e da tolerância as situações adversas encontradas pelas plântulas no meio de crescimento ao qual estão inseridas (SILVA et al.; 2017).

A todo momento as plantas estão sujeitas a múltiplas condições de estresse, podendo limitar o seu desenvolvimento e suas chances de sobrevivência. As condições desfavoráveis sejam elas letais ou não, ocorrem tanto esporadicamente como permanentemente, são denominadas como “estresse” (LARCHER, 2000). Taiz e Zeiger (2004), relata o estresse como um fator externo que exerce uma influência desvantajosa para a planta.

O estresse é definido como um desvio significativo das condições ótimas para a vida, induzindo mudanças e respostas em todo os níveis funcionais do organismo. As mudanças podem ser permanentes ou reversíveis. Mesmo em condições temporárias de estresse, a planta tem sua vitalidade afetada. As doenças crônicas ou injúrias irreversíveis se manifestam quando o limite de capacidade de ajuste da planta é alcançado (LARCHER, 2000; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2002).

Segundo Larcher (2000), o estresse é tratado como um evento direcionado, induzido por fatores altamente específicos. As respostas das plantas sob uma situação de estresse pode

ser vista como uma competição entre o esforço da planta para se adaptar e os processos potencialmente letais para ela. Os estresses podem ser abióticos (temperatura, irradiação, deficiência hídrica, gases, minerais, efeitos mecânicos) ou bióticos (micro-organismos, animais).

Em uma condição estressante a planta tem primeiramente a perda da estabilidade, depois passa por um processo de resistência e restabelecimento ou morte. As plantas podem apresentar três respostas ao estresse, a primeira condição seria adaptação, é quando a planta apresenta resistência genética determinada, adquirida por processo de seleção durante gerações. A segunda condição é a aclimatação, quando o organismo se adapta a condições diversas das habituais anteriores, e terceira resposta é a tolerância, situação que permite a planta suportar o estresse, isso varia de espécie (LARCHER, 2000).

As plantas respondem de diferentes maneiras a um estressor, a natureza e a intensidade da resposta pode variar em indivíduos de uma mesma espécie. Se a planta está ou não sofrendo estresse em uma determinada situação, esta questão só pode ser respondida tendo como referência o comportamento normal de outra planta (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2002).

2.3.1 Sistema de defesa antioxidante em plantas sob estresse

As condições expostas as plantas seja por estresse abiótico e biótico induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo provocar danos as estruturas celulares ou até mesmo acarretar a morte do vegetal. As respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas superiores ao estresse oxidativo incluem um sistema de defesa antioxidante eficiente. Este sistema envolve a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, peroxirredoxinas, entre outras, além dos metabólitos não enzimáticos, atuando de forma conjunta na eliminação das ROS e na redução do dano oxidativo (BARBOSA et al., 2014).

A presença de oxigênio (O₂) permite que os organismos aeróbicos o utilizem como um aceptor de elétron terminal durante a respiração celular. Embora esse elemento seja necessário para o desempenho das funções celulares, o O₂ leva à formação de ROS em eventos que ocorrem principalmente nas mitocôndrias, peroxissomos e cloroplastos (BHATTACHARJEE, 2010; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

Para neutralizar os efeitos de citotoxicidade das ROS, as plantas desenvolveram mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, este sistema celular começa com uma cascata

enzimática, envolvendo também componentes não enzimáticos como o ascorbato (AsA), a glutathiona (GSH), o β -caroteno e o α -tocoferol. Estes antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestra-los ou promover sua degradação, prevenindo danos as células das plantas (SERKEDJIEVA, 2011).

O equilíbrio entre a produção e neutralização pode ser alterado, gerando um aumento significativo de níveis intracelulares de ROS, o que ocasiona o estresse oxidativo. A regulação da expressão de genes codificantes de enzimas antioxidantes, cuja atividade evita ou reduz os danos potenciais causados pelas ROS, faz parte da resposta ao estresse oxidativo (CYRNE et al., 2003; APEL e HIRT, 2004).

As plantas utilizam os níveis de ROS para monitorar seu estado intracelular de estresse, mas este deve ser mantido sob um rigoroso controle devido aos efeitos devastadores do acúmulo dessas espécies (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). O mesmo autor ressalta algumas injúrias decorrentes de quantidades elevadas de ROS como, fragmentação do DNA, desintegração de clorofila, modificações protéicas, extravasamento iônico, peroxidação de lipídeos e até mesmo morte celular.

As plantas sob condições normais de crescimento, apresentam baixa produção celular de ROS as quais são provenientes, de processos ocorrentes nos cloroplastos e da respiração mitocondrial, entre outras fontes (DOUDICAN et al., 2005). Nessas condições podem agir como sinais para a ativação de respostas de defesa contra o estresse (LOW; MÉRIDA, 1996). As ROS, portanto podem ser vistas tanto como indicadores celulares de estresse como mensageiros secundários envolvidos na via de transdução de sinais na resposta ao estresse (MITTLER, 2002). É importante ressaltar que a produção e os efeitos das ROS não são delimitados dentro do mesmo compartimento celular, diferentes fontes parecem ser responsáveis pela produção sob diferentes condições de estresse (SMIRNOFF, 2000).

Em uma célula o grau de estresse oxidativo é determinado pela quantidade de peróxido de hidrogênio e de radicais de superóxido e hidroxila, sendo crucial o balanço das atividades da superóxido dismutase e da peroxidase na supressão de níveis tóxicos de ROS nas células (APEL e HIRT, 2004).

As SODs são metalo-enzimas, consideradas a primeira linha de defesa contra as ROS e que catalisam a dismutação de dois radicais $O_2^{\cdot-}$, gerando H_2O_2 e O_2 . Essas enzimas participam da modulação do nível de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (BATTACHARJEE, 2010).

Quando as SODs dismutam o $O_2^{\cdot-}$, estes agem diretamente na redução do risco de formação do OH^{\cdot} a partir do O^{\cdot} (DINAKAR et al., 2012). Segundo Gil e Tujeta (2010), as

SODs são classificadas de acordo com seus cofatores metálicos: cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD). É variável o número de isoenzimas de cada SOD nas plantas, assim como a abundância relativa de cada enzima (BOWLER et al., 1992).

A APX é uma heme-proteína, da Classe I da superfamília das peroxidases, com formas distintas isoenzimáticas, reguladas diversamente. Suas isoformas podem ser encontradas em citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos (estroma e ligadas às membranas dos tilacoides) e parede celular (DABROWSKA et al., 2007; De GARA, 2004).

A APX tem alta afinidade com o H_2O_2 , com uma constante de Michaelis-Menten (K_M), permitindo a eliminação do H_2O_2 , mesmo em baixas concentrações, exigindo o ácido ascórbico como redutor (LOCATO et al., 2010). Nos cloroplastos ocorre a fotorredução do oxigênio a água que pode gerar H_2O_2 e O_2^- , que são eliminados pela ação da SOD e APX, respectivamente (ASADA, 2006).

Outra enzima importante no sistema antioxidante é a CAT, configurando-se como uma das principais enzimas na eliminação do H_2O_2 , gerado durante o processo de fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos. A CAT atua nos peroxissomos e glioxissomos, podendo também ser encontrada em mitocôndrias. A catalase converte duas moléculas de H_2O_2 a H_2O e oxigênio molecular (DUBEY, 2013). Não necessita de agente redutor, ela fornece as plantas uma forma energeticamente eficiente para remoção do H_2O_2 . A CAT juntamente com o ciclo do ascobarto-glutationa são importantes na eliminação de H_2O_2 em plantas sob estresse (SHARMA et al, 2012).

Em altas concentrações de H_2O_2 (mM) a atividade da CAT é efetiva, devido a este fato são consideradas indispensáveis para a desintoxicação de ROS, principalmente em situações de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 são maiores). Nas plantas são encontradas várias isoformas de CAT (DUBEY, 2013).

2.4 Metais pesados e contaminação

Os metais pesados diferem-se dos compostos orgânicos tóxicos por serem absolutamente não degradáveis, podendo acumular-se no meio ambiente, onde apresentam alta toxicidade (BAIRD, 2002).

Os metais pesados são definidos como grupo de metais com densidade atômica superior a 5 cm^{-3} , conhecidos também como elementos-traço (GONÇALVES-JÚNIOR; LUCHESE; LENZI, 2000). Segundo Tan (2000), são encontrados naturalmente na crosta

terrestre em baixas concentrações, na ordem de parte por milhão – PPM ou parte por bilhão – PPB. A ocorrência natural na crosta terrestre é de 92 elementos químicos, sendo 53 metais pesados abrangendo nesta classificação metais, semimetais e até não metais como o selênio.

Os metais pesados têm capacidade de acumular-se com mais frequência na camada superficial do solo (0-20cm), denominada camada “agricultável” tornando-se acessíveis às raízes das plantas, e por consequência acumuláveis em organismos vivos. A causa mais frequente de intoxicação e envenenamento de organismos, como plantas, animais em pastoreio e seres humanos se dá pela contaminação de solos. O mesmo autor relata que a mobilidade desses elementos depende das reações químicas de adsorção e dessorção que ocorrem entre eles em solução e com componentes sólidos do sistema. Essas reações são influenciadas por inúmeros fatores com destaque pela presença de ligantes orgânicos e inorgânicos (ALLOWAY, 1995).

Alguns metais como o Co, Cu e Zn são considerados elementos essenciais as plantas, sendo encontrados em ambientes naturais e agrícolas, porém devido ao emprego de fertilizantes, mineração, combustão de fósseis, fungicidas, esterco de animais, lixo urbano, deposição de poeiras industriais entre outras atividades antropópicas, os níveis destes metais e de outros como o Pb e Cd, podem apresentar-se em concentrações elevadas chegando a níveis tóxicos para animais e plantas (MARSOLA; MIYAZAWA; PAVAN, 2005; BERTOLI, 2011). Estas são as principais fontes causadoras da contaminação de corpos d’água e solos por metais pesados (MALAVOLTA, 1994; AGUIAR; NOVAES; GUARINO, 2002).

Recentemente na China 20 milhões de hectares de terras agrícolas foram poluídas com metais pesados, contaminando mais de 12 milhões de toneladas de grãos (WANG et al., 2014).

Devido a capacidade que os metais pesados têm de reterem-se facilmente no solo e mobilidade facilitada de movimentação, existe uma preocupação com os níveis de contaminação desses elementos, pois a probabilidade de que haja contaminação do lençol freático, e sobre tudo absorção pelas plantas é alta, podendo atingir a cadeia alimentar (BERTOLI, 2011).

2.4.1 Cádmio

Alguns metais são imprescindíveis para o crescimento e desenvolvimento das plantas, porém outros são considerados elementos tóxicos e não desempenham nenhum papel fisiológico conhecido em plantas. O Cádmio (Cd), tem densidade de $8,6 \text{ g cm}^{-3}$, é um dos

metais pesados que mais têm sido estudado nos últimos anos, tem como características ser altamente tóxico e não essencial ao desenvolvimento de plantas (ROGERS et al., 2007).

Altas doses de cádmio causam toxicidade nas plantas, gerando danos devido à condição de estresse podendo provocar injúrias, efeitos deletérios e uma significativa redução na quantidade e qualidade das plantas cultivadas (KHAIRY et al., 2016).

O elemento Cd pode ser facilmente absorvido pelas raízes das plantas e translocadas para as partes aéreas (ZADEH et al., 2008). Segundo Rodrigues et al., (2017) o Cd pode inibir o crescimento da planta através da redução de taxas fotossintéticas e competição por macro e micronutrientes no meio ambiente (GONÇALVES et al., 2009; AHMAD; HADI; ALI, 2015).

Vários estudos comprovam os efeitos drásticos da excessiva concentração de Cd no meio ambiente, sendo este elemento reconhecido como um risco importante devido à não biodegradabilidade, e alta toxicidade que oferece a biota (SILVA; VITTI; TREVIZAM, 2007; XIE et al., 2013).

Uma vez que o Cd entra em contato com o solo, ele pode ser absorvido pelas plantas de duas formas: processo passivo (a captura ocorre por difusão dos íons da solução do solo para dentro da endoderme) e no processo ativo (por gradiente de concentração, requerendo energia metabólica). Absorvido pelas raízes, o metal pode ser transportado pelos vasos condutores do xilema, facilitando a movimentação por toda a planta (ALLOWAY, 1995).

O metal Cd induz aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), prejudicando componentes celulares, como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, promovendo o aumento da peroxidação lipídica. Como consequência as plantas podem apresentar sintomas de estresse severo como, limitação de crescimento, necrose, clorose e até mesmo morte do vegetal (PIETRINI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2017).

Diversos estudos apontam o Cd como inibidor de processos fisiológicos na planta, entre esses a fotossíntese, provocando interferência na síntese de clorofila (HORVÁTH et al., 1996), na organização dos cloroplastos (SANDALO et al., 2001) entre outras fases do processo (CHUGH; SAWHNEY, 1999). O impacto ecofisiológico dos metais pesados às plantas é indicado pela redução do crescimento do vegetal, como resposta ao aumento dos níveis fitotóxicos (MONNI et al., 2001).

Na germinação pode-se observar os efeitos claros da toxidez do cádmio. Quando as sementes são expostas a altos níveis de Cd para germinar, estas apresentam uma significativa redução da atividade das α e β amilases, comprometendo a respiração, resultando na inibição do crescimento do eixo embrionário e da radícula (CHUGH; SAWHNEY, 1996; KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 2000). Efeitos variados na atividade enzimática são observados em

plantas na presença do cádmio. As enzimas e proteínas que contêm grupos sulfidril (SH) ligados entre si por ligações dissulfeto, são o alvo potencial da ação de metais como o cádmio (KURDZIEL et al., 2004; LÖSH, 2004). A presença deste metal leva à oxidação destes grupos, que reagindo com o enxofre, destrói as ligações dissulfeto, desnaturando a proteína, o que resulta na redução da atividade enzimática (SHAW et al., 2004).

Outro efeito do cádmio na atividade enzimática que pode ser observado, é que grande número de enzimas contém metais pesados e a substituição destes por um outro metal da mesma carga e tamanho similar, pode resultar na inibição da atividade da enzima. O zinco (Zn) é um constituinte de diversas metaloenzimas, além de participar de inúmeros processos transcricionais importantes na regulação da expressão gênica, e sendo o cádmio semelhante a este metal, ele pode substituí-lo nessas enzimas, resultando em alteração da atividade enzimática (SHAW et al., 2004).

Kurdziel et al., (2004) observou em determinadas espécies de plantas que o cádmio modifica a estrutura da Rubisco, dissociando esta enzima em subunidades, o que pode ser devido a substituição do magnésio pelo cádmio.

As enzimas do sistema antioxidativo também são afetadas pelo cádmio. As superóxido dismutases (SODs), grupo que protege as células contra os efeitos do estresse oxidativo, sofrem com a ação do cádmio, as duas isoformas Mn-SOD e Cu/ZN-SOD tiveram sua atividade e proteínas reduzidas pelo Cd, devido a modificações no estado redox da glutatona, ou na redução da disponibilidade de manganês, cobre e zinco, o que determina a abundância dos transcritos destas superóxidos dismutases (ROMERO-PUERTAS et al., 2006).

A toxicidade induzida por metais pesados como o Cd em condições impróprias, é muito bem informado na literatura. Relatórios anteriores sugerem que os metais são capazes de interagir com proteínas nucleares e DNA causando deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas (SAXENA; SHEKHAWAT, 2013).

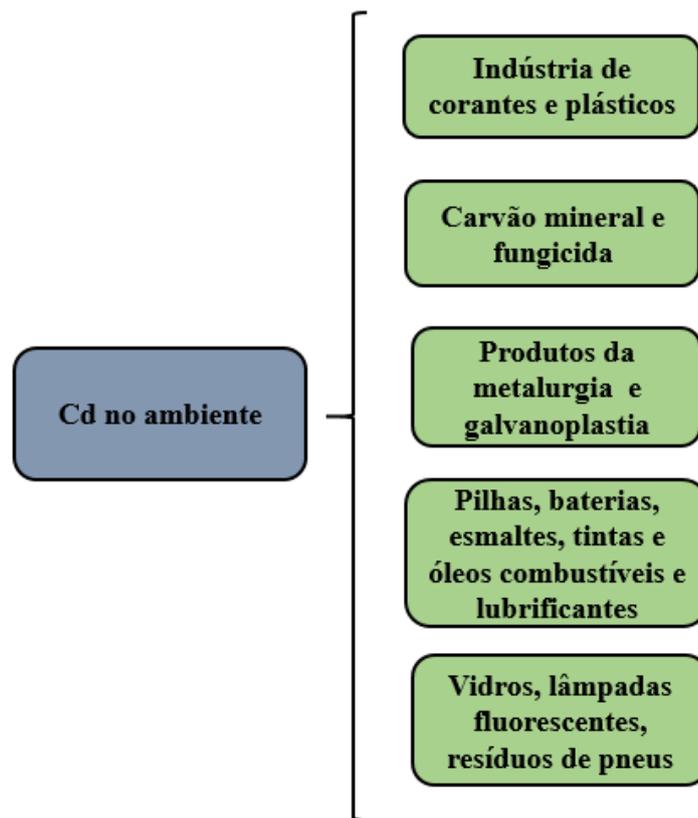


Figura 2 – Fontes de poluição do Cd no ambiente.
Fonte: adaptada MALAVOLTA (1994).

2.5 Óxido nítrico: aspectos gerais

O óxido nítrico (nome comum) ou monóxido de nitrogênio (sistema nome) é um composto químico com fórmula química NO. Em 1772 Joseph Priestley, descreveu este composto como altamente tóxico, pois é um componente de gases poluentes liberados por resíduos industriais, veículos, fumaça de cigarro e etc. (SAXENA e SHEKHAWAT, 2013).

Durante 50 anos, a única molécula de sinalização conhecida pela ciência era o hormônio vegetal etileno. O Prêmio Nobel de Medicina anunciou em 1998, o estabelecimento de outra molécula, até mesmo menor, desempenhando essa função em células de mamíferos - o óxido nítrico (NO) (WOJTASZEK, 2000). Sendo identificado como fator de relaxamento oriundo do endotélio. Estudos descritos por diferentes autores indicam que o NO tem ativa participação na neuro- transmissão, vaso relaxamento, relaxamento do músculo liso, imunoregulação de processos fisiológicos, inibição plaquetária, proliferação celular, morte celular programada, nas respostas a infecções e como sistema de defesa contra patógenos e câncer

(BREDT e SNYDER, 1992; LANCASTER JR., 1992; MEBMER et al., 1994; WINK e MITCHELL, 1998; NEILL, 2003).

O NO é uma das menores moléculas diatômicas com elevada difusão ($4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em H_2O), exibindo propriedades hidrofóbicas. Assim, pode não somente migrar facilmente pelas regiões hidrofílicas da célula, como para o citoplasma, mas também difundir-se livremente pela fase lipídica das membranas (ARASIMOWICZ e WIECZOREK, 2007). Estima-se que a meia-vida do NO em tecidos biológicos seja menor que seis segundos, refletindo sua natureza altamente reativa (THOMAS et al., 2001; BETHKE et al., 2004).

A química do NO é complexa e envolve interações entre três espécies que diferem em suas propriedades físicas e reatividade química: o cátion nitroso (NO^+), o ânion nitroxil (NO^-) e o radical óxido nítrico (NO) (ARASIMOWICZ e FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Em animais, o NO é sintetizado via óxido nítrico sintase (NOS) que também apresenta atividade em plantas (CUETO et al., 1996). No entanto, a produção de NO nas plantas não se restringe apenas a atividade da NOS, podendo este ser gerado pela atividade da nitrito redutase (NiR) e nitrato redutase (NR), enzima dependente de NAD(P)H (LESHEM, 1996). A NR é considerada como fonte endógena desta molécula. Nos organismos vegetais são descritos como mecanismos não enzimáticos de geração de NO, como redução apoplástica de nitrito (NO_2^-) (BETHKE et al., 2004) e por ação dos carotenóides em pH ácido ou em presença de luz (COONEY et al., 1994).

Vale ressaltar que as funções fisiológicas do NO em plantas ainda não são totalmente esclarecidas, evidencia-se sua participação em vários processos fisiológicos, como na regulação do crescimento (BELIGNI e LAMATTINA, 2000); ativação de respostas de defesa contra ataques de patógenos (DURNER et al., 1998; BOLWELL, 1999); diferenciação celular (FERRER e ROS BARCELO, 1999); acúmulo de fitoalexinas (NORITAKE et al., 1996); germinação (BELIGNI e LAMATTINA, 2000) e superação de dormência em sementes (BETHKE et al., 2006); organogênese radicular (PAGNUSSAT et al., 2002) e apoptose/morte celular programada (BELIGNI e LAMATTINA, 2000).

2.5.1 NO e efeito em plantas estressadas com metal pesado

Nos últimos anos intensificou-se o número de estudos de compostos químicos, como por exemplo o óxido nítrico (NO) com algum potencial na proteção de plantas expostas a fatores de estresse de natureza biótica e/ou abiótica. O NO é um radical livre endógeno formado numa variedade de tipos celulares, podendo ser considerado, entre outras funções

como um citoprotetor. Esta propriedade, a citoproteção, é baseada na capacidade do NO em regular o nível de toxicidade das EROs (BELIGNI e LAMATTINA, 2000). Segundo Wink et al., (1995) o NO pode exercer ação protetora contra o estresse oxidativo provocado pelo aumento da concentração de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio.

Na maioria dos estudos sobre os efeitos do NO em plantas, publicados até o momento utilizam seus doadores. Doadores de óxidos nitrogenados são compostos que produzem NO quando aplicados a sistemas biológicos e são capazes de imitar uma resposta relacionada ao NO endógeno ou substituir o NO endógeno quando deficiente. As vias que levam à formação de NO diferem-se amplamente entre os vários grupos de compostos, alguns dos quais requerem catálise enzimática, enquanto outros o produzem não-enzimaticamente (WIECZOREK et al., 2006).

Os complexos NO-metais de transição representam uma importante classe de doadores de NO. O mais comumente usado é o Nitroprussiato de Sódio (SNP), que atua como um poderoso ligante, em que o nitrogênio liga-se ao metal em maior proporção do que o oxigênio. O mecanismo de liberação do NO a partir do SNP não está claro, embora seja conhecido e usado na terapia clínica por mais de 70 anos. A solução de SNP é extremamente fotossensível e sua degradação pode ser promovida pelo oxigênio e por elevada temperatura (WANG et al., 2014; WIECZOREK et al., 2006).

Embora pesquisas relacionadas aos efeitos do NO nos vegetais sejam relativamente recentes, constata-se que esta molécula, mesmo apresentando estrutura molecular bastante simples, encontra-se envolvida em diversos mecanismos bioquímicos e fisiológicos em plantas submetidas a múltiplas condições de estresses bióticos e abióticos (FERREIRA, 2007).

Assim, o NO pode impedir fenômenos fisiológicos e bioquímicos atribuídos às EROs por meio do controle do nível e da toxicidade das mesmas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984). Atuando como antioxidante em plantas por neutralizar a vazão de íons e a fragmentação de DNA, decorrentes da ação de ERO e por interromper as reações propagadas em cadeia que promovem a peroxidação lipídica (KOPYRA e GWÓZDZ, 2003).

O NO também exerce função na neutralização do estresse oxidativo induzido pelo ácido abscísico (HUNG e KAO, 2003); metil jasmonato (HUANG et al., 2004); excesso de cádmio (HSU e KAO, 2004); salinidade (ZHAO et al., 2007) e a toxidez das EROs geradas pela exposição à RUV-B (SHI et al., 2005; ZHANG et al., 2009). Deve-se mencionar que os efeitos do NO sobre os diferentes tipos de células podem ser tanto citoprotetores quanto citotóxicos, de acordo com sua concentração. Os efeitos citoprotetores do NO em plantas

foram relatados sob fortes condições oxidativas durante estresses bióticos e abióticos (BELIGNI e LAMATTINA, 2000).

3 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, o estudo do estresse vem ganhando destaque em muitos campos da biologia e uma ampla variedade de abordagens tem sido empregada na tentativa de elucidar os processos envolvidos (LARCHER, 2000). A fim de permitir uma germinação mais rápida, regular e completa das amostras, os métodos de análises de laboratórios tem sido muito utilizados, pois oferecem condições de padronização e maior controle das variações ambientais em comparação com os testes realizados em campo (BRASIL, 2009). Os correspondentes mecanismos de respostas e o conhecimento adquirido por meio de uma abordagem (placa de Petri) neste estudo tem uma importância especial para o estudo da biologia molecular, ecofisiologia e para a pesquisa aplicada (LARCHER, 2000; GILL et al., 2013).

Recentemente, um número crescente de artigos relataram os efeitos da aplicação exógena do NO no alívio da toxicidade dos metais pesados nas plantas, mas a compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos deste composto químico é bastante limitada, e alguns resultados contradizem-se, relatando que o NO pode provocar tanto efeitos benéficos como prejudiciais, mas este fato depende da concentração e localização do NO nas células da planta (SAXENA; SHEKHAWAT, 2013).

Apesar de muitos estudos sobre a tolerância de plantas a metais pesados, ainda são escassas as informações sobre o comportamento da espécie *Bowdichia virgilioides*, submetida a algum tipo de estresse ambiental, como cádmio. O cádmio é um poluente que tem uma longa vida biológica no ambiente, proveniente de processos industriais e fertilizantes fosfatados, os mecanismos de toxicidade deste metal ainda é discutível (GILL et al., 2013).

O acúmulo de metais pesados em solos agrícolas tem sido um assunto de grande preocupação quanto à segurança ambiental, pois estes elementos podem expressar seu potencial poluente diretamente nos organismos do solo, pela disponibilidade as plantas em níveis fitotóxicos, passíveis de transferência para a cadeia alimentar, por meio das próprias plantas ou pela contaminação de águas de superfície e subterrâneas (SILVA et al., 2007; SOARES et al., 2005).

Analisar as demandas anormais da *Bowdichia virgilioides* sob uma condição desfavorável se faz necessário, uma vez que esta espécie tem relevante importância econômica devido a sua madeira de alta densidade, emprego na recuperação de áreas

degradadas, características medicinais e de ser uma espécie em risco de extinção (BOURDY et al., 2000; BRANDÃO et al., 2006; ARANTES, et al.,2015).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar os impactos da aplicação de diferentes concentrações de cádmio (Cd) e do doador de óxido nítrico (SNP) isolados ou em combinação na germinação de sementes e desenvolvimento inicial da *Bowdichia virgiloides*.

4.2 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos do Cd e do SNP no processo de germinação de sementes de sucupira-preta;
- Indicar e discutir os limites de tolerância das sementes de sucupira-preta ao Cd;
- Avaliar o papel do SNP em efeito tóxico induzido por Cd;
- Determinar os teores de aminoácidos totais, açúcares totais, amido e enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX) em plântulas de sucupira-preta.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN) do Instituto Ciências da Natureza, e as análises realizadas no Laboratório de Bioquímica (Departamento de Bioquímica), da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas/MG, no ano de 2017.

5.1 Obtenção de sementes

Para o experimento foi utilizado um lote de sementes de sucupira-preta, coletadas no município de Alfenas em outubro de 2016. As sementes foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas em temperatura ambiente.

5.2 Preparo das sementes e tratamentos

Para a superação da dormência utilizou-se o método de escarificação química, sendo as sementes imersas em ácido sulfúrico concentrado e agitadas por 10 minutos (ALBUQUERQUE, 2007). Em seguida foram lavadas 5 vezes consecutivas em água destilada e autoclavada e inoculadas em placas de Petri com duas folhas de papel germitest[®], umedecidas com 3mL da solução (BRASIL, 2009).

O presente trabalho foi desenvolvido em três experimentos. Os experimentos foram conduzidos em câmara de germinação BOD, a 30°C, durante 15 dias, com fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) (MARCOS FILHO, 2005). No experimento I foram avaliados 6 tratamentos, estando estes nas concentrações: testemunha; 10 µM SNP; 50 µM SNP; 100 µM SNP; 250 µM SNP e 500 µM SNP) com 4 repetições de 10 sementes por parcela. Posteriormente foi conduzido o experimento II utilizando-se nitrato de Cádmio, Cd (NO₃)₂ nas seguintes concentrações: testemunha; 10 µM Cd; 50 µM Cd; 100 µM Cd; 250 µM Cd e 500 µM Cd), com 4 repetições de 10 sementes por parcela. No experimento III avaliou-se 6 tratamentos: testemunha; 250 µM de Cd; 250 µM de Cd + 250 µM de SNP; 250 µM de Cd + 500 µM de SNP; 250 µM de SNP e 500 µM de SNP), com 20 repetições de 10 sementes por parcela.

A contagem da germinação foi realizada diariamente, durante o tempo estabelecido, computando-se o número de sementes germinadas. A avaliação foi realizada de forma visual,

sendo considerada germinada a semente que apresentava comprimento radicular maior que 2mm.

Após 15 dias da plotagem do experimento obteve-se o índice de velocidade de germinação (IVG), calculado de acordo com Maguirre (1962), a porcentagem de germinação (%G) e biomassa fresca (BF) de acordo com Brasil (2009).

Ao final dos testes mediu-se o comprimento do sistema radicular (CSR) e da parte aérea (CPA), utilizando um paquímetro digital, sendo os resultados expressos em milímetros por plântulas.

Os delineamentos experimentais foram inteiramente casualizado (DIC), sendo 6 tratamentos, 4 repetições com 10 sementes por parcela para os experimentos I e II. No experimento III foram realizados 6 tratamentos, 20 repetições com 10 sementes por parcela.



Figura 3 – sementes de sucupira-preta utilizadas nos experimentos. UNIFAL, Alfenas, MG, 2018.

Fonte: autora.

5.3 Análise de metabólitos primários

Amostras de raiz (200 mg) cultivadas como descrito acima foram coletadas 15 dias após a germinação. Para extração dos metabólitos, o material vegetal foi macerado em 2 mL de solução de metanol/clorofórmio/água (12:5:3, v/v) e incubado a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 1,500 xg por 30 min. e o sobrenadante misturado com clorofórmio e água (4:1:1,5, v/v). A fase aquosa foi usada para

análise de aminoácidos e açúcares solúveis totais. O amido foi extraído a partir do pellet oriundo da centrifugação pela incubação com ácido perclórico 30%.

A determinação dos aminoácidos seguiu a metodologia de Yemm & Cooching (1955), as leituras foram realizadas a 570nm. Para a curva padrão utilizou-se a glicina. Para a leitura das amostras foram utilizadas, solução tampão citrato de sódio 0,2M, pH 5,0, ninhidrina 5% em etilenoglicolmonometil e KCN 2%. Os tubos contendo as soluções citadas, mais o adicionamento de água destilada, foram agitados e colocados em banho maria por 20 min à 100°C. Após o resfriamento em temperatura ambiente, adicionou-se álcool 60%, homogeneizando a mistura para a leitura.

Os açúcares solúveis totais foram determinados como descrito por (YEMM; WILLIS, 1954). Alíquotas da fração aquosa obtida foram misturadas a água totalizando 1mL e misturadas a 2 mL do reagente de antrona (20 mg de antrona, 500 µL de água e 10 mL de H₂SO₄ concentrado). Posteriormente as amostras foram agitadas e aquecidas a 100°C por 5 min. A absorbância foi determinada em 620nm e a quantificação feita com base em curva padrão de glicose.

O conteúdo de amido foi determinado como descrito por (MCCREADY et al., 1950). Ao precipitado obtido da extração dos metabólitos primários foi adicionado 1 mL de ácido perclórico 30%. As amostras foram agitadas ocasionalmente por 10 min. e a partir da solução obtida foi determinado o teor de amido pela reação com antrona da mesma forma como descrito acima.

5.4 Análises enzimáticas

Amostras de raiz (200mg) cultivadas como descrito acima foram coletadas 15 dias após a germinação e imediatamente armazenadas em ultrafreezer a – 84°C. Para extração o material vegetal foi macerado com 800µL tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,5 (contendo EDTA, PMSF 5% e PVP). Após a extração o material foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm a - 4°C e o sobrenadante coletado (GARCÍA-LIMONES et al., 2002).

5.4.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase

A determinação da atividade da SOD foi feita pela adição de 200µL do extrato enzimático e 1,8mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50mM, pH

7,0, contendo metionina 13mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μ M, EDTA 0,1mM e riboflavina 2 μ M (GARCÍA-LIMONES et al., 2002). A reação foi conduzida em temperatura ambiente, numa câmara sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15W. Após 12 minutos, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT, foi determinada pela medição de absorbância a 560 nm em espectrofotômetro. O branco foi obtido nas mesmas condições, porém sem a presença de luz (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

5.4.2 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato

A atividade da APX foi determinada pela adição de 20 μ l de amostra do extrato enzimático a 980 μ l de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,8mM e H₂O₂ 5mM. Observou-se o decréscimo na absorbância a 290 nm em espectrofotômetro, durante os primeiros 3 minutos de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em μ mol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (NAKANO e ASADA, 1981; GARCÍA – LIMONES et al., 2002).

5.4.3 Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela adição 50 μ L de amostra do extrato enzimático a 1850 μ L de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 20Mm. Durante o primeiro minuto de reação o decréscimo da absorbância foi observado e medido a 240 nm em espectrofotômetro e para calcular a atividade enzimática utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ e expressa em μ mol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (GARCÍA – LIMONES et al, 2002).

5.4.4 Quantificação das proteínas solúveis totais

Os teores de proteínas foram quantificados a partir dos extratos enzimáticos, determinados pelo método de Bradford (1976), em espectrofotômetro, utilizando-se o BSA como padrão.

5.5 Análise dos dados

Os dados de germinação foram submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira 2000), e a comparação das médias pelo teste de Scott Knott, a 5% de significância.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Aspectos fisiológicos: germinação e desenvolvimento das plântulas de sucupira-preta sob influência do Cd e SNP.

Nas primeiras horas após a plotagem dos experimentos, foi observado a evolução do processo germinativo das sementes de sucupira-preta nos diferentes tratamentos aos quais foram submetidos. Os aspectos observados foram: aumento significativo das sementes, escurecimento (mudança na coloração) e intumescimento conforme pode ser observado na Figura 4.



Figura 4 – aspecto das sementes de sucupira-preta 1 hora após o experimento (A), mudança na coloração e intumescimento após 4 horas (B). UNIFAL, Alfenas, MG, 2018.

Fonte: autora

Na figura 5 pode ser observado o início da germinação (protusão da raiz) no experimento I (SNP) ocorreu a partir do 3º dia (72 horas) com término no 14º dia. No experimento II (Cd) e III (Cd + SNP) a germinação iniciou-se ao 4º dia (96 horas), e término ao 13º dia. Porém o experimento II apresentou a maior média de sementes germinadas e menor tempo para o processo. No decorrer da germinação observou-se a diferenciação da radícula e do hipocótilo, ocorrendo em seguida a liberação dos cotilédones do tegumento, expandindo-se a partir do 10 e 11º dia ocorrendo a formação de plântulas normais. A germinação da sucupira-preta é caracterizada como epígea (ALBUQUERQUE, 2007).

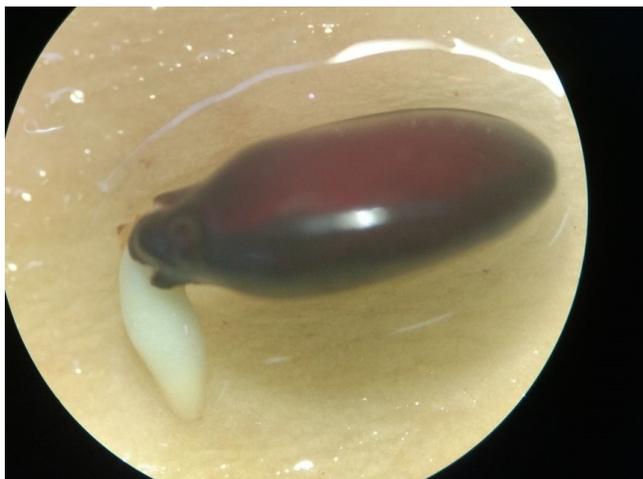


Figura 5 – protusão de raiz de semente de sucupira-preta. UNIFAL, Alfenas, MG, 2018.
Fonte: autora



Figura 6 – Evolução do processo germinativo de sementes de sucupira-preta, até a formação da plântula. UNIFAL, Alfenas, MG, 2018.
Fonte: autora

Os tratamentos com SNP e Cd isolados (Tabela 1 e 2) apresentaram alta porcentagem de germinação (%G), resultado semelhante foi encontrado por Albuquerque (2006) com a mesma espécie. No tratamento com associação de SNP e Cd (Tabela 3), o IVG e % G apresentaram menor porcentagem comparando-se com os experimentos I e II.

Na Tabela 1 encontram-se os dados dos parâmetros avaliados no processo de germinação da sucupira-preta submetidas a diferentes concentrações de SNP (doador de óxido nítrico). Observa-se que o IVG, porcentagem de germinação e biomassa fresca não

apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Já o alongamento de raiz (AR) foi menor para maior concentração de SNP.

Tabela 1- Valores médios de índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (%G), alongamento de raiz (AR) e biomassa fresca (BF) de sementes de *Bowdichia virgilioides* submetidas a diferentes concentrações de SNP, Alfenas. MG, 2017.

SNP Concentração (μM)	IVG	%G	AR (mm)	BF (g)
0	1,08 a	86 a	42,48 a	0,5986 a
10	1,09 a	70 a	36,5 a	0,6343 a
50	1,07 a	80 a	38,18 a	0,6435 a
100	0,91 a	83 a	37,34 a	0,7503 a
250	1,22 a	86 a	39,91 a	0,7503 a
500	1,29 a	76 a	21,49 b	0,7174 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

O óxido nítrico (NO) é reconhecido como um mensageiro biológico em vários tecidos com a finalidade de regular os processos fisiológicos incluindo o crescimento, desenvolvimento e respostas a fatores abióticos e bióticos. Os efeitos do NO aplicado exogenamente em diferentes processos fisiológicos e químicos já são conhecidos a algum tempo (SAXENA; SHEKHAWAT, 2013).

Os efeitos do NO foram avaliados sobre o crescimento radicular de soja, sendo cultivadas em solução nutritiva contendo de 5 a 1000 μM de SNP. Em baixas concentrações (5 e 10 μM) aumentaram significativamente o comprimento da raiz, enquanto altas concentrações (500 e 1000 μM) o inibiram.

De acordo com os resultados obtidos nos três experimentos, observou-se que para os parâmetros avaliados, o Nitroprussiato de Sódio (SNP) não desempenhou o papel esperado, pois não provocou alterações significativas em relação ao cádmio (Cd). Esse resultado talvez seja devido à capacidade de tolerância da espécie *Bowdichia virgilioides* em relação ao metal pesado cádmio. Contudo, novos dados deverão ser obtidos para esclarecer essa possível tolerância.

Essas evidências já foram relatadas em diferentes espécies de plantas. Em tomate, ervilha e alface baixas concentrações (20 ppm) de doadores de NO promoveu o crescimento destas espécies, enquanto concentrações maiores (40 a 80 ppm) inibiram o crescimento de tomate (HUFTON et al., 1996; LESHEM; HARAMATY, 1996).

Beligni e Lamattina (2000) verificaram o que o SNP a 100 μM inibiu o crescimento de hipocótilos em batata, alface e Arabidopsis. Uma redução considerável no crescimento e no peso fresco de mudas de tabaco foram observadas em SNP de 300 μM (SEREGELYES et al., 2003). De 100 a 500 μM , O SNP diminuiu o comprimento da raiz primária e aumentou o número de raízes laterais em mudas de tomate (CORREA-ARAGUNDE et al., 2006).

Incubação de raízes de soja em soluções de SNP em concentrações muito baixas (1 a 10 μM) promoveu o crescimento, enquanto que em maiores concentrações o inibiram (HU et al., 2005).

O NO em altas concentrações pode atuar como um fator de estresse, induzindo a redução do crescimento de raiz associado a morte celular e diminuição do teor de lignina. A soja sob níveis altos de NO sofreu alterações na atividade da PAL (enzima primária do metabolismo do fenilpropanoide), que é responsável pela regulação da produção de compostos fenólicos e lignina, o que torna esta informação interessante, devido a importância do papel da lignificação durante o crescimento da raiz. Esse efeito pode ser atribuído a ação tóxica do próprio NO ou seus produtos metabólicos (BÖHM, 2008).

O NO assim como os hormônios vegetais, tem seu efeito dependente da sua concentração, portanto plantas sob concentrações muito elevadas (NO aplicado exogenamente) podem sofrer inibição de um determinado processo, assim os resultados obtidos não refletirão a ação do NO endógeno na célula (WIECZOREK et al., 2006).

Com os dados apresentados pode-se inferir que o NO não influenciou o IVG, mas afetou o crescimento de raiz na maior concentração, este fato pode ser atribuído aos efeitos duplos do NO, citoprotetor e citotóxico dependendo da dose (BELIGNI e LAMATTINA, 2000). Em geral, os dados apresentados neste estudo corroboram com os resultados obtidos em estudos anteriores.

As sementes de sucupira-preta quando submetidas ao Cd, não apresentaram diferença entre os tratamentos para, IVG, porcentagem de germinação (%G) e biomassa fresca (BF). Porém, houve decréscimo no alongamento de raiz (AR) para as maiores concentrações ($p < 0,05$), como demonstra a Tabela 2. A partir desse experimento optou-se por utilizar 250 μM de Cd para a combinação com o SNP.

Tabela 2- Valores médios do índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (%G), alongamento de raiz (AR) e biomassa fresca (BF) de sementes de *Bowdichia virgilioides* submetidas a diferentes concentrações de Cd.

Cd Concentração (µM)	IVG	%G	AR (mm)	BF (g)
0	1,37 a	80 a	28,07 a	0,765600 a
10	1,55 a	90 a	27,98 a	0,866800 a
50	1,69 a	93 a	25,02 a	0,862767 a
100	1,65 a	83 a	23,15 a	0,894667 a
250	1,49 a	76 b	18,23 b	0,883400 a
500	1,35 a	90 a	16,57 b	0,788400 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

Sabe-se que a toxicidade por metais pesados é um dos maiores estresses abióticos que causam efeitos perigosos nas plantas, os elementos traços tem sua toxicidade reconhecida com base na propriedade física e química (SAXENA; SHEKHAWAT, 2013).

O cádmio é um microelemento não essencial para a planta, mas é absorvido e se acumula na parte superior, como caule e folhas e pode provocar distúrbios nos processos metabólicos, o que conseqüentemente inibe o crescimento, afeta a produtividade e coloca em risco a espécie (KHAYRI et al., 2016).

Segundo Guo e Marschner (1955), a inibição do alongamento de raiz de diferentes espécies de plantas é o parâmetro mais sensível de toxicidade do Cd, este fato foi observado no experimento II, onde as raízes das plântulas apresentaram decréscimo para as maiores concentrações de Cd. Não houve variação significativa na biomassa das amostras. A capacidade das plantas em se manter expostas ao Cd, depende da capacidade das raízes em sintetizar fitoquelatinas (PCs), as quais tem sido identificadas em inúmeras espécies de plantas, sendo elas o indutor mais forte de acumulação de metais pesados (COBBETT e GOLDSBROUGH, 2002). A síntese de fitoquelatinas é uma resposta comum a estresse por Hg e Cd, metabolizando pequenos peptídeos, produzidos enzimaticamente por glutatona, estes sequestram os metais, diminuindo os efeitos danosos nos processos metabólicos (COBBETT e GOLDSBROUGH, 2002; VÖGELLI-LANGE e WAGNER, 1990).

Poucos minutos após a exposição da planta a metais pesados ou metaloides, a síntese de PCs é induzida, sendo que o Cd é o indutor mais forte desta acumulação (MAITANI et al., 1996; SOUZA et al, 2011). Em inúmeras espécies, a quelação do Cd por glutatona (GSH) ou

PCs é considerada um mecanismo de desintoxicação deste metal (COBBETT e GOLDSBROUGH, 2002).

Como o peso da biomassa não foi afetado, pode ter ocorrido um baixo transporte do Cd para a parte aérea, ficando uma maior concentração do metal na raiz, este mecanismo do sistema radicular contribui para uma tolerância a metais pesados (ARDUINI, et al., 1996).

As respostas de diferentes espécies submetidas a ambientes contaminados por Cd é muito variável, sendo assim é necessário testar o comportamento individual de cada planta face a contaminação (PAIVA et al., 2004). Lopes-Millan et al., (2009) ressaltaram que diferenças entre as espécies podem surgir devido a diferentes homeostases de micronutrientes e mecanismos de desintoxicação de Cd. No estudo realizado com a espécie *Alternanthera tenella* cultivada *in vitro* foi verificado a tolerância dessa espécie quando submetida ao Cd em concentrações de até 100 µM (RODRIGUES et al., 2017).

Geralmente a redução do crescimento de plantas, é creditado a exposição a níveis tóxicos, resultando na redução de taxas metabólicas. Sementes postas a germinar em condições com altos níveis de Cd, sofrem uma redução significativa das atividades α e β amilases, comprometendo a respiração (CHUGH e SAWHNEY, 1996), resultando na inibição do crescimento do eixo embrionário e da radícula (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 2000; SHAW et al., 2004).

Para lidar com os metais pesados e evitar sua toxicidade, as plantas possuem propriedades fisiológicas e sistemas de defesa em que células e respostas moleculares ajustam os conteúdos livres (KHAYRI et al., 2016).

Pode-se inferir que a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas de *Bowdichia virgilioides* não foi comprometido, apesar do alongamento de raiz ter sofrido redução nas maiores concentrações. Esta espécie demonstrou tolerância ao Cd nas doses expostas neste estudo até 100µM.

Observa-se na Tabela 3 que a porcentagem de germinação, parte aérea e biomassa fresca não diferem estatisticamente nas diferentes concentrações ao qual foram submetidas. O IVG no controle é menor que nos tratamentos com associação de Cd e SNP ($p < 0,05$). Houve decréscimo no parâmetro alongamento de raiz em relação ao controle, o que indica que o tratamento com SNP não foi capaz de proteger a planta do efeito causado pelo Cd.

Tabela 3- Valores médios de índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (%G), alongamento de raiz (AR), parte aérea (PA) e biomassa fresca (BF) de sementes de *Bowdichia virgilioides* submetidas diferentes concentrações de SNP associado ao Cd.

Cd e SNP Concentração (μM)	IVG	%G	AR (mm)	PA (mm)	BF (g)
0	0,79 b	51 b	17,53 a	15,70 a	0,445a
250 Cd + 250 SNP	1,04 a	67 a	11,88 b	12,59 a	0,546 a
250 Cd+ 500 SNP	1,02 a	67 a	10,77 b	14,66 a	0,529 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

Houve aumento na germinação e IVG em relação ao controle quando as sementes foram submetidas a associação de SNP e Cd (tabela 3). Em sementes de *Lupinus luteus*, espécie pertencente à família Fabaceae, o SNP mostrou-se eficaz na reversão do estresse causado pelo NaCl, que provocava uma redução na porcentagem de germinação (KOPYRA e GWÓZDZ, 2003).

Além dos mecanismos de tolerância das plantas, existem algumas moléculas de sinalização que desempenham um papel crucial no alívio da toxicidade induzida por metais pesados. O nitroprussiato de sódio (SNP) é um doador de óxido nítrico muito estudado devido ao fato de ser atenuante da toxicidade de alguns metais pesados como o Cd e Cu, de estresses como seca, calor, salinidade e agentes oxidativos (KHAIRY et al., 2016).

Vários estudos demonstram o efeito positivo do óxido nítrico na recuperação da germinação de sementes sob diferentes tipos de estresse, no entanto são escassas informações sobre o efeito do estresse por metal pesado em espécies nativas (BELIGNI e LAMATTINA, 2000; NEILL et al., 2003). Não foi encontrada na literatura relatos sobre os efeitos do Cd e outros metais pesados e NO na espécie sucupira-preta.

Em um estudo realizado com a espécie *Nicotiana tabacum* foi investigado o papel do NO no alívio dos estresses de Cd e Cu, com base no crescimento da planta, conteúdo total de clorofila e atividade da rubisco. Os resultados demonstram que o crescimento e teores de clorofila total de plantas estressadas com Cd e Cu foram bastante reduzidas na ausência de SNP. Porém a aplicação exógena de SNP resultou em um aumento significativo do conteúdo fresco e total de clorofila. No presente estudo mesmo ocorrendo uma pequena redução no crescimento de raiz (AR) em relação ao controle quando a sucupira-preta foi submetida aos tratamentos de Cd e SNP associado, não houve redução biomassa fresca.

Outros estudos também sugerem o papel funcional do SNP na fisiologia das plantas, a suplementação de NO aumentou significativamente a germinação de sementes de trigo e aliviou o estresse oxidativo do Cu, (WILSON et al., 2009; RAO e DAVIS, 2001). Nas plantas de soja submetidas a cloreto de cádmio (0,2 mM), a aplicação exógena de SNP promoveu a recuperação dos danos causados e crescimento da espécie (OROZCO-CARDENAS e RYAN, 2002).

6.2 Açúcares, amido e aminoácidos

Na figura 7, observa-se que houve um aumento no conteúdo de açúcares totais na raiz de sucupira-preta em todos os tratamentos em relação ao controle, apesar da concentração de 250 μ M Cd apresentar um discreto aumento comparado aos demais tratamentos, não houve diferença estatística significativa.

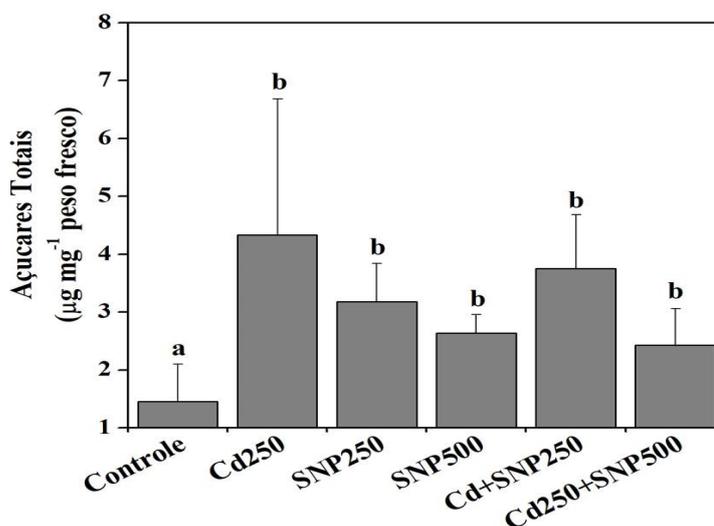


Figura 7 – Conteúdo de açúcares totais em raiz de *Bowdichia virgilioides* submetidas ao Cd, SNP e associação de Cd + SNP.

No que se refere ao acúmulo e uso dessas reservas durante a germinação e crescimento inicial das plântulas, foi possível observar que, as sementes de sucupira-preta apresentaram um aumento nos teores de açúcares. Este fato corrobora com o estudo realizado por Carvalho (2017), com sementes da espécie *Hevea brasiliensis*, onde ocorreu um decréscimo nos teores de açúcares nas fases de alongamento de raiz primárias e secundárias, o que sugere uma intensa mobilização desse metabólito primário para a sustentação de novos tecidos, e um

acúmulo na fase final emissão dos eofilos (EO) e expansão dos eofilos (EX), garantindo a manutenção das plântulas até o esgotamento total de suas reservas e assim atingir seu autotrofismo (PRITCHARD et al., 2002; SOLTANI et al., 2006).

Também foi encontrado em sementes de *Jatropha curcas* L. acúmulo de açúcares solúveis entre as fases de embebição e emissão de raiz (LOPES et al.; 2013). Já na espécie *Euphorbia heterophylla* foi constatado uma situação adversa, o conteúdo de açúcares solúveis permaneceram constante nas primeiras horas de embebição, ocorrendo um decréscimo nas fases seguintes (SUDA e GIORGINI, 2000).

Observa-se na Figura 8 que o controle (testemunha) e o tratamento na concentração de 500 μ M de SNP apresentaram o menor conteúdo de amido em raízes de sucupira-preta, enquanto nas concentrações de 250 μ M de Cd, 250 μ M de SNP e nos tratamentos com a combinação de cádmio e SNP (Cd+SNP 250 e Cd 250+SNP 500), ocorreu um aumento do conteúdo de amido.

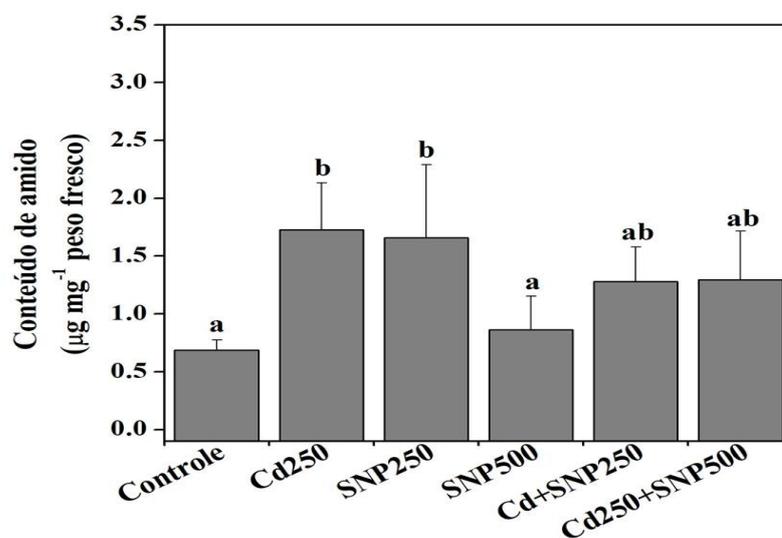


Figura 8 – Teor total de conteúdo de amido em raiz de *Bowdichia virgilioides* submetidas ao Cd, SNP e associação de Cd + SNP.

O aumento do conteúdo de amido nos tratamentos, com exceção para o controle, caracteriza uma intensa síntese desse metabólito primário a fim de garantir geração de energia necessária para o início do crescimento inicial das plântulas. O amido é dentre as reservas, o principal composto em sementes, sendo mobilizado principalmente nas fases de crescimento inicial das plântulas (AMARAL et al.; 2007). Os níveis de amido e açúcares simples variam de espécie para espécie, podendo ser mais expressivo no início da germinação ou na fase de crescimento inicial das plântulas (PONTES et al.; 2002).

Vale ressaltar que o conteúdo de açúcares totais e amido estão diretamente associados, pois o amido é um polissacarídeo utilizado como reserva energética, e este quando sofre hidrólise transforma-se em glicose para uso imediato da célula, por isso os resultados neste estudo são semelhantes (MARTIN et al., 2001).

No presente estudo infere-se que o amido é fonte de energia para a espécie *Bowdichia virgilioides*, pois no decorrer do período de germinação houve mobilização das reservas de amido e conseqüentemente o aumento dos teores de açúcares totais, este evento caracteriza as reservas de amido como umas das fontes de energia durante o crescimento inicial das plântulas (LOPES et al., 2013).

Analisando o teor total de aminoácidos (Figura 9), verifica-se que não houve diferença significativa para o controle e as concentrações Cd 250 e SNP 250 μ M, enquanto para SNP 500 μ M apresentou o menor teor total de aminoácidos.

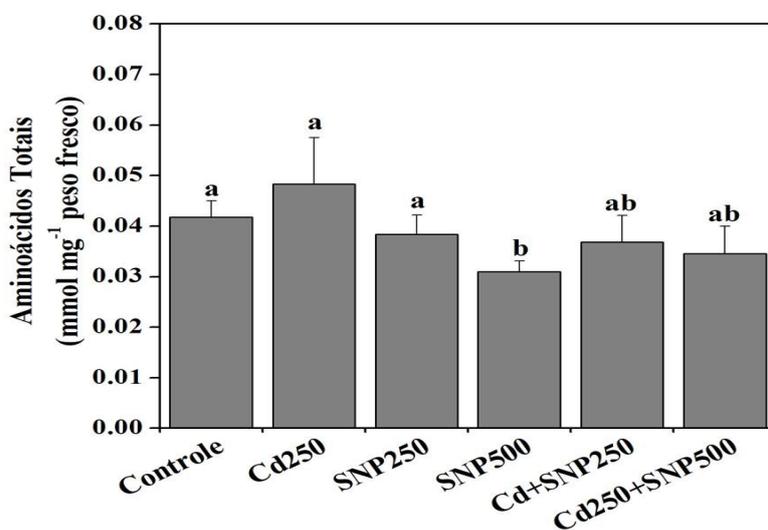


Figura 9 – Teor total de aminoácidos em raiz de *Bowdichia virgilioides* submetidas ao Cd, SNP e associação de Cd + SNP.

Com o início da germinação das sementes, ocorre a ativação da síntese protéica e a formação enzimas hidrolíticas que dão início à mobilização das reservas (DANTAS et al., 2008). Segundo Bewley (2001) o processo de estabelecimento das plântulas ocorre após a germinação, e o seu crescimento é suportado inicialmente por metabólitos produzidos pela hidrólise e conversão das principais reservas armazenadas, carboidratos, proteínas e lipídeos, processo semelhante ao que ocorre inicialmente com o embrião.

Como a finalidade da germinação é sintetizar as enzimas hidrolíticas para decompor os compostos de reservas (CELUS et al., 2006), neste sentido é notável destacar o conteúdo de açúcares totais e teores de amido e aminoácidos encontrados no presente estudo, já que os carboidratos e os lipídeos atuam como fontes de energia e de carbono para a germinação, crescimento e desenvolvimento das plântulas, ao passo que as proteínas armazenam principalmente nitrogênio e enxofre, elementos essenciais para a síntese de novas proteínas, ácidos nucleicos e os denominados compostos secundários (BUCKERIDGE et al., 2000).

6.3 Efeito do Cd, SNP e Cd + SNP sobre as atividades enzimáticas SOD, GPX e CAT.

Contra os estresses ambientais as plantas possuem diferentes sistemas de defesa, permitindo adaptação e minimização dos danos (APEL e HIRT, 2004; BOR et al., 2003; RADETSKI et al., 2000). Os processos e reações que ocorrem frente a uma situação de estresse são de natureza nutricional, fisiológica e bioquímica. Uma consequência comum da toxicidade de metais pesados é o descontrolado e excessivo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) que leva a peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, inativação de enzimas, danos ao DNA e/ou interação com outros constituintes vitais de células de plantas (SOUZA et al., 2011).

Para verificar a ocorrência de estresse nas plantas é necessário a quantificação de indicadores desta condição. Entre os indicadores bioquímicos de estresse oxidativo foi analisado neste estudo a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX, por desempenharem ação protetora contra situações de estresse, como a exposição a metais pesados.

Pode-se observar na figura 10, que a atividade da SOD não foi significativamente afetada pelos tratamentos. Assim, mesmo na presença do metal houve discreta alteração em relação ao controle. Com isso, não é surpreendente que na presença do SNP também não tenha ocorrido relevantes mudanças.

Em relação a testemunha, a atividade da enzima mostrou tendência ao aumento quando comparados com as concentrações Cd 250, SNP 250 e Cd+SNP 250 μ M. Isto pode ter ocorrido devido ao efeito fitotóxico do cádmio e nitroprussiato em altas concentrações.

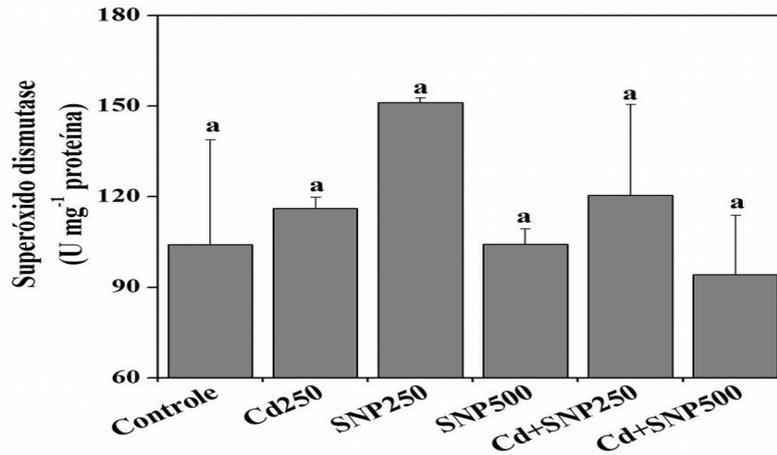


Figura 10 - Atividade SOD em raízes de *Bowdichia virgilioides* submetidas ao Cd, SNP e associação de Cd + SNP.

Quin et al., (2010) avaliaram os efeitos do alumínio na atividade de enzimas antioxidantes em *Allium cepa* var. *agrogarum L.*, e verificaram variações entre o grupo controle e as espécies expostas as diferentes concentrações de alumínio. Quanto maior o nível de alumínio, maior foi o nível de significância de SOD nas amostras. Entre 3 e 9 dias a atividade de SOD aumentou nas raízes, na concentração de 50 μM , e depois houve uma gradativa diminuição. Isto pode ser atribuído a uma inativação da enzima pelo H_2O_2 produzido em diferentes compartimentos, nos quais a SOD catalisa a desproporção de radicais superóxidos.

Segundo Mittler (2002), o radical superóxido e os seus derivados, o oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, são os principais causadores de danos oxidativos aos componentes celulares. Os radicais superóxido transformam-se espontaneamente em H_2O_2 , porém a reação é mais efetiva se for catalisada pelas peroxidases. A fim de manter a quantidade normal de ROS nas células, a participação conjunta de outras enzimas capazes de degradar o H_2O_2 é de fundamental importância (VALKO et al., 2006).

A maior atividade dessas enzimas é uma importante característica de tolerância. A ação da dismutase do superóxido constitui-se na primeira linha de defesa das plantas contra o estresse oxidativo (APEL e HIRT, 2004). Isto porque o radical superóxido é um precursor de inúmeras outras espécies altamente reativas, portanto controlar o estado estável da concentração de superóxido por meio da SOD constitui um importante mecanismo de proteção (QUIN et al., 2010).

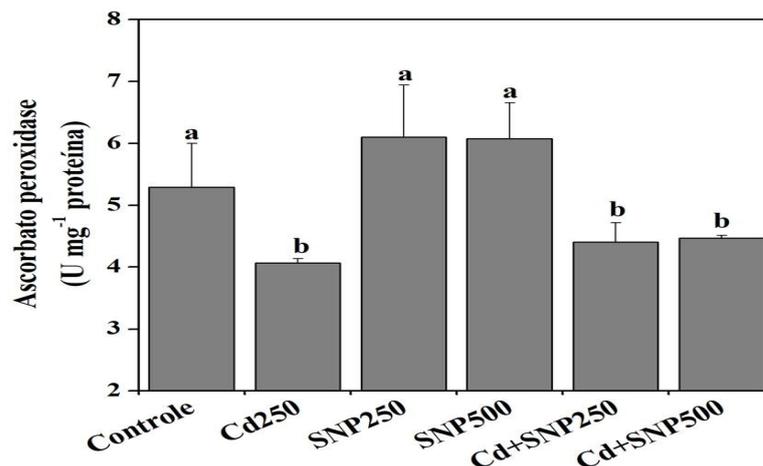


Figura 11 –Atividade da APX em raízes de *Bowdichia virgilioides* submetidas ao Cd, SNP e associação de Cd + SNP.

Contrariamente à SOD, a atividade da APX na raiz (figura 11), foi menor nas sementes submetidas ao Cd e associação deste metal com o doador de óxido nítrico (SNP), não diferindo estatisticamente entre si. Já o SNP isoladamente nas concentrações de 250 μM e 500 μM , foram estatisticamente iguais ao controle.

A atividade da peroxidase foi estudada em cotilédones de feijoeiro cv. Carioca durante tempos variados de coleta, quando submetidos a diferentes concentrações de cádmio, com o objetivo de verificar se esta enzima poderia ser usada como indicador de estresse causado por este elemento. O estudo mostrou uma tendência ao aumento quando comparado a testemunha, confirmando a hipótese testada (ROSSI e LIMA, 2001).

Ribeiro et al., (1995) avaliaram o efeito do cádmio em macrófitas aquáticas e verificaram o aumento da atividade da peroxidase, resultado semelhante também foi constatado por Chen e Kao (1995) quando estudaram o efeito do mesmo metal em plântulas de arroz.

Os resultados citados acima em diferentes espécies pode ser creditado a desarranjos no desenvolvimento, na diferenciação celular no estágio juvenil e no crescimento inicial das plântulas, configurando o efeito fitotóxico do elemento cádmio (SINGH et al., 1991).

No presente estudo a atividade da APX foi maior quando as sementes foram submetidas ao doador de óxido SNP isolados e menor quando expostas ao cádmio (Cd 250) e/ou em combinação (Cd+SNP 250 e Cd250 + SNP 500). Este fato é um dado importante, mostrando que altas doses de SNP tem efeito mais tóxico para as sementes de sucupira-preta do que o cádmio nas condições do presente estudo, reafirmando que o NO em altas concentrações pode atuar como um fator de estresse (BÖHM, 2008).

O elemento cádmio e o SNP não provocaram estresse severo as plântulas, pois apesar de ter ocorrido decréscimo no alongamento de raiz (AR) para as maiores concentrações, os parâmetros avaliados, IVG, %G e BF não sofreram alterações (Tabelas 1, 2 e 3).

A peroxidase do ascobarto, age contra os intermediários reativos de oxigênio degradando o H_2O_2 , mas diferente de outras enzimas, a APX requer ascobarto e depende de um sistema de regeneração de glutathiona reduzida, denominado ciclo ascobarto-glutathiona (NOCTOR e FOYER, 1998). Em diferentes condições de estresse as plantas tendem a aumentar a atividade da peroxidase e às vezes, esta é a primeira enzima a ter a atividade alterada, sendo um fato que não está relacionado com o tipo de substrato utilizado ou estresse aplicado. Lima et al., (1999), relata que a peroxidase pode ser descrita como um marcador bioquímico de estresse, resultante tanto de estresses abióticos como bióticos.

Em tecidos vegetais a atividade da peroxidase é usada como um indicador não específico de estresse causado por agentes poluentes, como os metais pesados (MARKKOLA et al., 1990). A peroxidase foi compreendida por Gaspar (1986), como uma molécula chave para a adaptação das plantas, ou de algum de seus órgãos separadamente às mudanças do meio ambiente.

A atividade da CAT foi significativamente inibida (Figura 12), e seu maior valor ocorreu nas sementes expostas a SNP 250 μM . O efeito da catalase foi menor sobre os tratamentos controle, Cd 250 e SNP 500. A atividade da CAT decaiu enquanto a atividade da SOD e APX aumentou, isto pode ter ocorrido porque as duas enzimas foram eficientes em limpar H_2O_2 . Supõe-se que o declínio na atividade da CAT deve-se à inibição da síntese da enzima ou uma alteração na montagem da enzima (QUIN et al., 2010).

A catalase (CAT), enzima chave, presente nos peroxissomos, têm sua atividade e nível de proteína reduzidas na folha sob 50 μM de Cd, concomitante ao aumento dos níveis de seu RNAm, a literatura sugere que o cádmio é o responsável por alterar a expressão desse gene ao nível pós-transcricional. Outros estudos demonstram que a CAT é oxidativamente modificada pelo Cd, e as proteínas oxidadas podem ser alvo de proteases específicas do peroxissomo (ROMERO-PUERTAS et al., 2006).

Em plantas de *Vicia faba*, a exposição ao Cd aumentou os níveis de peroxidação lipídica na parte aérea, juntamente com o aumento das concentrações de H_2O_2 nas raízes. Foi verificada também um aumento na atividade SOD, e uma redução significativa nas atividades de CAT e POX (GILL et al., 2012).

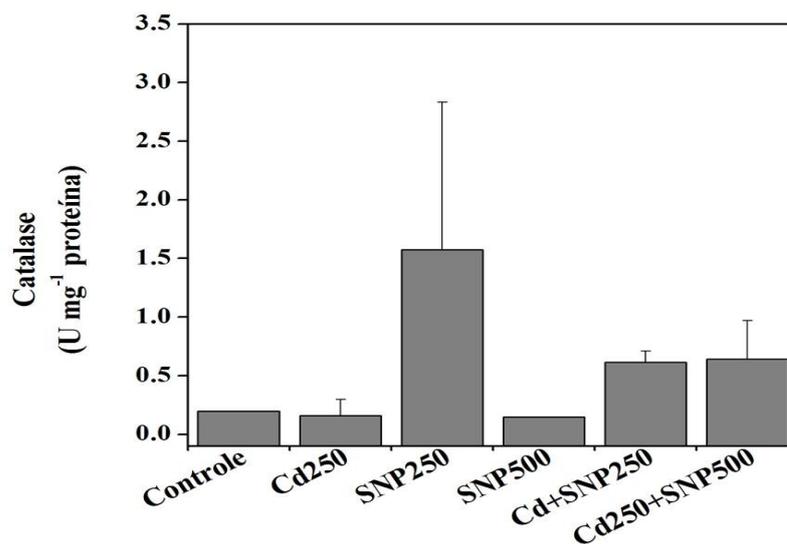


Figura 12 – Atividade CAT em raízes de *Bowdichia virgilioides* submetidas ao Cd, SNP e associação de Cd + SNP.

Em *Crotalaria juncea*, Pereira et al., (2001) estudaram a atividade enzimática em resposta ao Cd. A atividade da SOD em folhas e raízes não apresentou alterações significativas, enquanto a CAT apresentou uma maior atividade logo após 48 horas da espécie à exposição do metal. Os resultados sugerem que em *C. juncea* o oxigênio reativo espécies (ROS) induzidas por Cd, são metabolizadas pela CAT nos peroxissomas.

Quin et al., (2010) avaliaram a atividade enzimática em *Allium cepa* sob efeito do metal alumínio, e verificaram que a atividade da CAT foi inibida. Seu menor valor ocorreu nas folhas e raízes expostas a 50 μ M de alumínio durante todo o tempo de exposição aos tratamentos outro fato constatado foi que a atividade da CAT decaiu enquanto aumentou a atividade da POD. Comportamento semelhante foi observado neste estudo em raízes de sucupira-preta submetidas ao elemento cádmio.

7 CONCLUSÃO

A espécie *Bowdichia virgilioides* apresentou tolerância ao cádmio no processo de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas até 100 μ M. Apenas altas concentrações foram capazes de causar toxicidade, reduzindo o alongamento de raiz (AR).

Altas concentrações do doador de óxido nítrico (SNP) sozinho ou em combinação com o metal pesado cádmio promoveram o decréscimo de raiz em sucupira-preta.

Não houve papel protetor do radical óxido nítrico (NO) frente ao cádmio, mas também não houve toxicidade as plântulas.

O estresse em raízes de sucupira-preta não foram severos, uma vez que a biomassa fresca (BF), porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), parte aérea (PA) e atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD e APX) não sofreram alterações significativas.

Não houve atividade significativa da CAT para as condições estabelecidas neste estudo.

Sugere-se futuros estudos com a espécie e sua possível adequação de uso em ambientes com a presença do metal cádmio.

8 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K. A.; GUIMARÃES, R. M.; ALMEIDA, I. F.; CLEMENTE, A. C. S. Métodos para superação da dormência em sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Cienc.Agrotec.**, v. 6, p. 31, 2007.

AHMAD, A.; HADI, F.; ALI, N. Effective phytoextraction of cádmium (Cd) with increasing concentration of total phenolics and free proline in *Cannabis sativa* (L) plant under various treatments of fertilizers, plant growth regulators and sodium salt. **Int J Phytorem** 17:56–65. 2015.

ALLOWAY, B. J. Heavy metals in soils. New York. J. Wiley, 1995. 388 p.

ALMEIDA, J.R.; SILVA-FILHO, R. N.; NUNES, X.P.; DIAS, C. S, PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Bowdichia irgilioides* Kunt. **Braz J Pharmacol**, v. 16, p. 638-41. 2000.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 464.

AMARAL, L.I. V DE; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n.4, p. 425-431, 2007.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.

ARANTES, C. S.; ARANTES, C. S.; RODRIGUES-SOUZA, J.; PRADO JÚNIOR, J. A.; VALE, V. S. Ação facilitadora de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Fabaceae) na colonização de espécies em uma área de cerrado sentido restrito. **Caminhos de Geografia**, v. 16, p. 15-26. 2015.

ARASIMOWICZ, M.; WIECZOREK, J.F. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, v.172, p.876-887, 2007.

ARDUINI, I.; GODBOLD, D. L. E.; ONNIS, A. Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. **Physiologia Plantarum**, vol. 97, n. 1, p. 111-117. 1996.

ARRIAGA, M.C.; MACHADO, M.I.; GOMES, G.A.; CRAVEIRO, A. A. Componentes voláteis das raízes de *Bowdichia virgilioides*, Kunt. **J Essent Oil Res**, v. 10, p. 205-6. 1998.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, p.391-396, 2006.

BAIRD, C. **Química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 579 p.

BARBOSA, M. R., MEDEIROS, M. A. S., WILLADINO, L., ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BARBOSA-FILHO, J. M.; DA SILVA ALMEIDA, J. R.; DE OLIVEIRA COSTA, V.C.; DA-CUNHA, E.V.; DA SILVA, M. S.; BRAZ-FILHO, R. Bowdichine, um novo alcalóide diaza-adamantano de *Bowdichia virgilioides*. **J Asian Nat Prod Res**, v. 6, p. 11-7. 2004.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.

BELIGNI M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v. 210, p. 215-221, 2000.

BERTOLI, A. C. **Efeitos do cádmio e do chumbo no crescimento, translocação e teor de nutrientes tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cultivado em solução nutritiva**. 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, lavras, 2011.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide a novel neuronal messenger. *Neuron*, v.8, p.3-11, 1992.

BEWLWY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seed in relation to germination**. Berlin: Springer Verlag, 1978. v. 1, 306 p.

BEWLEY, J. D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination** 2.ed. New York. Plenum, 1994. 445 p.

BEZERRA-SILVA, C. P.; SANTOS, J. C.; SANTOS G. K. N.; DUTRA, K. A.; SANTANA, A. L. B. D; MARANHÃO, C. A.; NASCIMENTO, M. S.; NAVARRO, D. M. A. F.;

BIEBER, L. Extract of *Bowdichia virgilioides* and *maackiain* as larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 160-164, 2015.

BETHKE, P.C.; BADGER, M.R.; JONES, R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, v.16, p.332-341, 2004.

BETHKE, P.C., LIBOUREL, I.G.L., JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.517-526, 2006.

BEWLEY, J.D. Seed Germination and Reserve Mobilization. Encyclopedia of Life Sciences. **Nature Publishing Group**, 2001.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, Lexington, KY, USA. 2013, 392p.

BHATTACHARJEE, S. 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. **Science Publishers**, p. 1-30, 2010.

BIANCHETTI, A. Tratamentos pré-germinativo para sementes florestais. In: BRANDÃO M.; FERREIRA, P. B. D. Flora apícola do cerrado. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 4-8, 1991.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 408–420, 2006.

BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PINÃ-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLA, M. B. (Coord.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993, 83 p.

BOURDY, G.; DEWALT, S. J.; CHÁVEZ; DE MICHEL, L. R.; ROCA, A.; DEHARO, E.; MUÑOZ, V.; et al. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **J. Ethnopharmacol**, v. 70, p. 87-109, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 399 p. 275-293. 2009.

BOLWELL, G.P. Role of reactive oxygen species and NO in plant defense responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.287-294, 1999.

BOWLER, C; MONTAGU, M. V; INZÉ, D. Superoxide dismutase and Stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.43, p.83-11, 1992.

BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Maryland: American society of Plant physiologists, 2002, 1367 p.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P; TINÉ, M.A.S. Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seed. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 141-156, 2000.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S.; AIDAR, M.P. **Mobilização de reservas**. In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004, 324p.

CARVALHO, J. C. **Caracterização morfofuncional e mobilização de reservas primárias durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *Hevea brasiliensis* (willd. ex adr de juss.) muell. arg.** 2017. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Florestas Tropicais) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p. 588.

CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J.A. The effects of malting and mashing on barleyprotein extractability, **J. Cereal Sci**, v. 44, n. 2, p. 203–211, 2006.

CHEN, S.L.; KAO, C.H. Cd induced changes in proline level and peroxidase activity in roots of rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.17, p.67-71, 1995.

CHUGH, L. K.; SAWHNEY, S. K. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

CHUGH, L. K.; SAWHNEY, S. K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, p. 297-303. 1999.

COBBETT, C. E.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, vol. 53, p. 159-182. 2002.

COONEY, R.V. et al. Light mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. **Environmental Health Perspective**, v.102, p.460-462, 1994.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; CHEVALIER, C.; LAMATTINA L. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. **J Exp Bot**, v. 57, p.581–588, 2006.

CUETO, M. et al. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. **FEBS Letters**, v.398, p.159-164, 1996.

CYRNE, L. et al. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, p.385-393, 2003.

DABROWSKA, G; KATA, A; GOC, A; SZECHYŃSKA-HEBDA, M; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v.49, n.1, p.7-17, 2007.

De GARA, L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n.1-2, p.195-205, 2004.

DANTAS, B. F.; SOARES, F. S DE. J.; LÚCIO, A. A.; ARAGÃO, C.A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30 n. 2, p. 214-219, 2008.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. Uma busca por compostos bioativos naturais na Bolívia através de uma abordagem multidisciplinar. Parte V. Avaliação da atividade antipalúdica das plantas utilizadas pelos índios Tacana. **J Ethnopharmacol**, v. 77, p. 91-98. 2001.

DINAKAR, C; DJILIANOV, D; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v.182, p.29-41, 2012.

DOUDICAN, N. A. SONG, B.; SHADEL, G. S.; DOETSCH, P. W. Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v.25, p. 5196-5204, 2005.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants in the rootless macrophyte *Wolffia globosa* and its potential for phytoremediation. **Int J Phytoremediat** v. 15, p.385–397, 2013.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.10328-10333, 1998.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 5. 6** – Sistema de análises estatísticas. Lavras:UFLA, 2000.

FERREIRA, L.C. **Ação protetora do óxido nítrico em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill) submetidas ao lactofen**. Botucatu, 2007. 155p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

FRANKS, S. J. Facilitation in multiple life-history stages: evidence for nucleated succession in coastal dunes. **Plant Ecology**, v. 168, p. 1-11, 2003.

GALINDO-GONZÁLEZ, J.; GUEVARA, S.; SOSA, V. Bat and bird generated seed rains at isolated trees in pastures in a tropical rain forest. **Conservation Biology**, v. 14, p.1693-1703, 2000.

GARCÍA-LIMONES, C.; HERVÁS, A.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; JIMENEZ-DÍAZ, R. M.; TENA, M. Induction of na antioxidante enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp.ciceris. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 325-337, 2002.

GASPAR, T. Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. (Ed.) **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneve: University of Geneve, 1986. p.455-468.

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

GILL, S. S.; HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; MACOVEI, A.; TUTEJA, N. Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 63, p. 254-261, 2012.

GONÇALVES, J. F, ANTES, F. G.; MALDANER, J.; PEREIRA, L. B.; TABALDI LA, et al. (2009) Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. **Plant Physiol Biochem**, v. 47, p.814–821, 2009.

GONÇALVES-JÚNIOR, A. C.; LUCHESE, E. B.; LENZI, E. Avaliação da fotodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em Latossolo vermelho escuro tratado com fertilizantes comerciais. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 173-177, 2000.

GUO, Y; MARSCHENER, H. Uptake, distribution, and binding of cadmium and nickel in different plants species. In: FERREIRA, M. E. et al (Ed). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTAFOS, 2001. p. 58-70.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. **Biochemistry Journal**, v.219, p.1-14, 1984.

HERMANSEN, L. A; DURYEY, M. L.; WHITE, T. L. Variability in seed coat dormancy in *Dimorphandra mollis*. **Seed Science and Technology**, Ssurich, v. 28, n. 3, p. 567-580, 2000.

HORVÁTH, G. et al. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium-poisoned barley leaves. **Planta**, v.99, p.238-243, 1996.

HUFTON, C. A.; BESFORD, R. T.; WELLBURN, A. R. Effects of NO (+NO₂) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter CO₂ enrichment. **New Phytologist**, v. 133, p. 495-501, 1996.

HU, X.; NEILL S. J.; TANG, Z.; CAI, W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. **Plant Physiology**, v. 137, p. 663-670, 2005.

HUANG, X; STETTMAIER, K; MICHEL, C; HUTZLER, P; MUELLER, M. J; DURNER, J. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.218, p.938-946, 2004.

HUNG, K.T.; KAO, C.H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.871-879, 2003.

HSU, Y.T., KAO, C.H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regulator**, v.42, p.227-238, 2004.

JORGE-NETO, J. Estudo farmacogenético do óleo essencial da sucupira *Bowdichia virgilioides*. **Ver Fac Farm Odontol Araraquara**, v.4, p. 203-4, 1974.

JUCK, D. B.; DE REZENDE, L. C.; DAVID, J. P.; DE QUEIROZ, L. P.; DAVID, J. M. Dois novos isoflavonoids de *Bowdichia virgilioides*. **Nat Prod Res**, v. 20, p. 27-30. 2006.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace Elements in Soils and Plants**. 3rd ed. CRC, 2000, 315p.

KARUPPANAPANDIAN, T; JUN-CHEOL, M; CHANGSOO, K; KUMARIAH, M, WOOK, K. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.6, p. 709-725, 2011.

KHAIRY, A. I. H.; OH, M. J.; LEE, S. M.; KIM, D. S.; ROH, K. S. Nitric oxide overcomes Cd and Cu toxicity in in vitro-grown tobacco plants through increasing contents and activities of rubisco and rubisco activase. **Biochime Open**, v. 2, p. 41-51, 2016.

KOPYRA M.; GWÓZDZ, E. A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology Biochemistry**, v.41, p. 1011-1017. 2003.

LABOURIAU, L.G.; NODA, F.; BORGHETTI, F. Dependência de temperatura na germinação de sementes de *Phaseolus aureus* Roxb. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5, 1995, Lavras. **Resumos...**Lavras: UFLA, 1995. p.1-63.

LANCASTER Jr., J.R. Nitric oxide in cells. *American Scientific*, v.80, p.248-259, 1992.

LARCHER, Walter. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000. p. 341.

LESHEM, Y. Y.; HARAMATY, E. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. **Journal of Plant Physiology**, v. 148, p. 258-263, 1996.

LIMA, D.U. Polissacarídeo de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p. 137-162, 2000.

LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, v.56, p.21-25, 1999.

LINKIES A, GRAEBER K, KNIGHT, C. The evolution of seeds. **New Phytol**, v.186, p. 817-831, 2010.

LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Science Publishers**, p. 45-64, 2010.

LOPES, L. S.; GALLÃO, M. I.; BERTINI, C. H. C. M. Mobilisation of reserves during germination of *Jatropha* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 4, n. 2, p. 371-378, 2013.

LOPEZ-MILLAN, A. F.; SAGARDOY, R.; SOLANAS, M.; ABADIA, A. E.; ABADIA, J. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, vol. 65, n. 2-3, p. 376-385, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v.1,. 386p.

LOW, P.S.; MÉRIDA, J.R. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. **Physiologia Plantarum**, v.96, p.533-542, 1996.

MCCREADY, R. M.; GUGGOLS, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Anal Chem**, v. 22, p.1156–1158. 1950.
MAGUIRRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, 1962.

MAITANI, T.; KUBOTA, H.; SATO, K.; YAMADA, T. The composition of metals bound to class III tallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. **Plant Physiology**, Bethesda, v.110, p.1145–1150, 1996.

MALAVOLTA, E. Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificação e fatos. São Paulo: Produquímica, 1994, 153 p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 495.

MARINHO, L. C.; CUNHA, M. T.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Constituintes de *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia**, v. 65, p. 475-6, 1994.

MARSOLA, T.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro em relação com o extraído do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 92- 100, 2005.

MARTIN-TANGUY, J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). **Plant Growth Regul.**, v. 34, p. 135–148, 2001.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. The germination of seeds. Exeter, Pergamon Press, 208p, 1975.

MEBMER, U.K., ANKARCRONA, M., NICOTERA, P. AND BRUNE, B. *p53* expression in nitric oxide induced apoptosis. **FEBS Letters**, v.355, p.23-26, 1994.

MCDONNELL, M. J.; STILES, E. W. The Structural complexity of the old field vegetation and the recruitment of bird-dispersed plant species. **Oecologia**, v. 56, p. 109-116, 1983.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

MOLLER, I.M., JENSEN, P.E., HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

MONNI, S.; UHLIG, C.; JUNTILA, O.; HANSEN, E.; HYNYNEN, J. Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. **Environmental Pollution**, Albany, v 112, p. 417-426, Mar. 2001.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999, cap. 2, p.1-24.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific

peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

NEILL, S.J., DESIKAN, R., HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytologist**, v.159, p.11-35, 2003.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279, 1998.

NERY, M. C. **Aspectos morfofisiológicos do desenvolvimento de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich.** 2005. 95 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, R. M. C. Ação facilitadora de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (Fabaceae) na colonização de espécies em uma área de cerrado sentido restrito. **Caminhos da Geografia**, v. 16, p. 15-16, 2015.

OROZCO-CARDENAS, M. L.; RYAN, C. A. Nitric Oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. **Plant Physiol**, v. 130, p. 487-493, 2002.

PAGNUSSAT, G.C. et al. Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiology**, v.129, p.954-956, 2002.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O.; MIRANDA, J. R. P.; FERNANDES, A. R. Nutrients absorption by seedlings of ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) in nutrient solution contaminated by cadmium. **Revista Árvore**, v. 28, n. 2, p. 189-197, 2004.

PANDEY, H. Chemical stimulation of seed germination in *Aconitum* peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

PEREIRA, G. J. G.; MOLINA, S. M. G.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, v. 239, p. 123-132, 2002.

PIETRINI, F.; ZACCHINI, M.; IORI, V.; PIETROSANTI, L.; FERRETTI, M.; MASSACCI, A. Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones. **Plant Biol**, v. 12, p.355–363, 2010.

PONTES, A. P.; BORGES, E. E DE. L.; BORGES, R DE.; C.G.; SOARES, C.P.B.

Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. (garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v.26, n. 5, p. 593-601, 2002.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

PRITCHARD, S. E; CHARLTON, W. L; BAKER, L; GRAHAM, I. A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.31, n.5, p.639-647, 2002.

QIN, R; JIAO, Y; ZHANG, S; JIANG, W; LIU, D. Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells and selected physiological and biochemical characters in *Allium cepa* var. *agrogarum* L. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 225, p. 1-11, 2010. DOI: 10.1186/1471-2229-10-225

RAO, M. V.; DAVIS, K. R. The physiology of ozone induced cell death. **Planta**, v. 213 p. 682-690, 2001.

RIBEIRO, M.; SALOMÃO, T.M.F.; CAMBRAIA, J. Atividade de peroxidase como bioindicador da fitotoxicidade de cádmio em plantas aquáticas. In: CONGRESSO RASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5. Lavras, 1995. **Resumos**. Lavras: SBFV/UFLA. p.253.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Org.). **Cerrado Ecologia e Flora**. Brasília: Embrapa. p.151-212, 2008.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. 2 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1990. 296 p.

RODRIGUES, L. C. A.; MARTINS, J. P. R.; JÚNIOR, O. A.; GUILHERME, L. R. G.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. Tolerance and potential for bioaccumulation of *Alternanthera tenella* Colla to cadmium under in vitro conditions. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, DOI 10.1007/s11240-017-1241-4.

ROGERS, N. J.; FRANKLIN, N. M.; APTE, S. C.; BATLEY, G. E. The importance of physical and chemical characterization in nanoparticle toxicity studies. **Integr Environ Assess Manag**, v. 3, p. 303–304, 2007.

ROMERO-PUERTAS, M. C.; CORPAS, F. J.; RODRÍGUES-SERRANO, M.; GÓMEZ, M.; RÍO, L. A. D.; SANDALIO, L. M. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1346-1357, 2007.

ROSSI, C; LIMA, G. P. P. Cádmio e a atividade da peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.197-199, 2001.

SARACHO, J. M.; BOAVENTURA, R. A. Water remediation using calcium phosphate derived from marine residues. **Water Air Soil Pollut**, v. 223, p.989–1003, 2012.

SANDALIO, M; DALURZO, H. C; GÓMEZ, M; ROMERO-PUERTA, M. C; DEL RÍO, L. A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.364, p.2115-2126, 2001.

SAXENA, I., SHEKHAWAT, G. S. Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitration. **Elsivier**, v. 32, p. 13-20, 2013.

SCHLAWIN, J. R.; ZAHAWI, R. A. ‘Nucleating’ succession in recovering Neotropical wet forests: The legacy of remnant trees. **Journal of Vegetation**, v. 19, p. 485-492, 2008.

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Science Publishers**, cap. 13, cap.13, p.275-293, 2011.

SEREGÉLYES, S.; BARNÁ, B.; HENNIG, J.; KONOPKA, D.; PASTERNAK, T.P.; LUKÁCS, N.; FEHÉR, A.; HORVÁTH, G.V.; DUDITS, D. Phytooglobins can interfere with nitric oxide functions during plant growth and pathogenic responses: a transgenic approach. **Plant Science**, v. 165, p. 541-550, 2003.

SILVA, A. C. M.; SANTOS, M. P.; FRANÇA, S. A.; SILVA, V. C.; SILVA, L. E.; FIGUEIREDO, U. S.; DALL’OGLIO, E. L.; SOUZA-JÚNIOR, P. T.; LOPES, C. F.; BAVIERA, A. M.; KAWASHITA, N. H. Acute and subchronic antihyperglycemic activities of *Bowdichia virgilioides* roots in non-diabetic and diabetic rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, p. 57-63, 2014.

SILVA, M. L. S.; VITTI, G. C.; TREVIZAM, A. R. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.42, p.527-535, 2007.

SILVEIRA, V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 53-60, 2004.

SINGH, T.; DEVI, S.; CHAWLA, G.; GUPTA, M.; VISWANATHAN, P.N. Ultrastructural and biochemical effects of cadmium on the aquatic *Marsilea minuta* Linn. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.21, p.171-181, 1991.

SHARMA, P; JHA, A. B; DUBEY, R. S; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, v.2012, p.1-26, 2012.

SHI, S.; WANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide against stress under ultraviolet-B radiation. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.13, p.1-9, 2005.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G. et al. Fitotoxicidade de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, p.175-183, 2005.

SOLTANI, A; GHOLIPOOR, M; ZEINALI, E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.55, n.1-2, p.195-200, 2006.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and Drought, v. 28, n. 3, p. 567-580, 2000.

SUDA, C. N. K; GIORGINI, J. F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n.3, p. 226-245, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAN, K. H. **Environmental soil Science**. New York: M. Dekker, 2000. p. 452.

TAO, K. L. Genetic alteration and germoplasm conservation. In: FU, J.; KHAN, A. A. (Ed.) *Advanced in the science and technology of seeds*. **Tecnology**, v.28, p. 249-252, 2000.

THOMAS, D.D. et al. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v.98, p.355-360, 2001.

THOMAZZI, S. M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C.; VASCONCELLOS, C. L.; LIRA, A. F.; CAMBUI, E. V. Atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias de *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **J Ethnopharmacol**, v. 127, p. 451-6, 2010.

VIEIRA, L. F. A.; REIS, M. D. S.; BRANDÃO, A. R. A.; VIANA, I. M. M. N.; SILVA, J. P.; BARRETO, E.; SMANIOTTO, S. Anxiolytic-like effect of the extract from *Bowdichia virgilioides* in mice. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn**, v. 23 (4), p. 680-686, 2013.

VÖGELLI-LANGE, R.; WAGNER, G. J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v.92, n.4, p.1086-1093, 1990.

WANG, S; SHI, X; SUN, H; CHEN, Y; PAN, H; YANG, X; RAFIQ, T. Variations in Metal Tolerance and Accumulation in Three Hydroponically Cultivated Varieties of *Salix integra* Treated with Lead. **Plos One**, 2014.

WIECZOREK, J. F; MILCAREK, G; ARASIMOWICZ, M; CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, v. 224, p.1363-1372, 2006.

WILSON, I. D.; RIBIERO, D. M.; BRIGHT, J.; HARRISON, J.; DESIKAN, R. Role of nitric oxide in regulating stomatal apertures, *Plant Signal*. **Behav**, v.4, p. 467-469, 2009.

WINK, D.A; COOK, J. A; PACELLI, R; LIEBMANN, J; KRISHNA, M. C; MITCHELL, J. B. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. **Toxicology Letters**, v.82/83, p.221-226, 1995.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, v.25, p.434-456, 1998.

WOJTASZEK, P. Nitric oxide in plants. To NO or not to NO. **Phytochemistry**, v.54, p.1-4, 2000.

XIE, W. Y.; HUANG, Q.; LI, G.; RENSING, C.; ZHU, Y. G. Cadmium accumulation in the rootless macrophyte *Wolfia globosa* and its potential for phytoremediation. **Int J Phytoremediat**, v. 15, p. 385-397, 2013.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochem. J**, v. 57, p. 508-514, 1954.

ZADEH, B. M.; SAVAGHEBI-FIROZABADI, G. R.; ALIKHANI, H. A.; HOSSEINI, H. M. Effect of sunflower and *Amaranthus* culture and application of inoculants on phytoremediation of the soils contaminated with cadmium. **Am Eur J Agric Environ Sci**, v. 4, p. 93–103, 2008.

ZHANG, L; ZHOU, S; XUAN, Y; SUN, M; ZHAO, L. Protective effect of nitric oxide against oxidative damage in *Arabidopsis* leaves under ultraviolet-B irradiation. **Journal of Plant Physiology**, v.52, p.135-140, 2009

ZHAO, M; ZHAO, L; WU, Y; ZHANG, L. Enhanced sensitivity to oxidative stress in an *Arabidopsis* nitric oxide synthase mutant. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.737-745, 2007.