

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

RODRIGO MIRANDA MORAES

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, METABÓLICOS E ALTERAÇÕES NO CICLO
CELULAR DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) EM RESPOSTA AO COBRE,
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO**

**Alfenas/MG
2015**

RODRIGO MIRANDA MORAES

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, METABÓLICOS E ALTERAÇÕES NO CICLO
CELULAR DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) EM RESPOSTA AO COBRE,
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Área de concentração: Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Barbosa

Coorientador: Prof. Dr. Plinio Rodrigues Santos Filho

Colaboradores: Dr^a. Marília Carvalho (Bolsista PNPd/Capes) e Antonio Rodrigues da Cunha Neto (Bolsista PIBIC/CNPq).

**Alfenas/MG
2015**

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

Moraes, Rodrigo Miranda.

Aspectos fisiológicos, metabólicos e alterações no ciclo celular de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) em resposta ao cobre, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico / Rodrigo Miranda Moraes. – Alfenas - MG, 2015.

94 f.

Orientador: Sandro Barbosa.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) -
Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Plantas – Efeito do cobre. 2. Metais Pesados. 3. Espécies de Oxigênio Reativas. 4. Alface. I. Barbosa, Sandro. II. Título.

CDD-581.7

RODRIGO MIRANDA MORAES

**“ASPECTOS FISIOLÓGICOS, METABÓLICOS E ALTERAÇÕES NO CICLO
CELULAR DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) EM RESPOSTA AO COBRE,
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO.”**

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ecologia e Tecnologia Ambiental pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de
Pesquisa: Tecnologia Ambiental.

Aprovado em: 27 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Sandro Barbosa
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga
Instituição: UFLA

Assinatura:



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

Assinatura:



Dedico este trabalho aos meus pais Sebastião (Zico) e Heloisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela sua fundamental ação em minha vida, que me motiva e me conduz conforme seus desígnios, mesmo nos momentos de tribulações.

Ao meu orientador Prof. Sandro Barbosa, pelo incentivo, pelas orações, pelo zelo nas orientações, pela amizade, e principalmente pelo seu testemunho de vida.

Ao meu coorientador Prof. Plinio Rodrigues Santos Filho, pelas partilhas e por todo ensinamento que contribuiu muito em minha formação.

Aos meus pais, Sebastião (Zico) e Heloisa, pelo incentivo, carinho, paciência e pelos cuidados comigo.

A Evellyn, minha companheira, intercessora, inspiração e principal motivadora desta etapa de minha vida.

Aos amigos do BIOGEN, por toda colaboração nos trabalhos de grupo, pela acolhida e tudo mais.

A Lucimar de Sousa Martins, minha amiga e diretora da Escola Estadual Monsenhor Silveira, pela paciência e incentivo nestes dois anos de convivência.

A Comunidade Pietà, todos os amigos, servos e filhos que rezaram e intercederam por mim, neste período de ausência para dedicação aos estudos.

A CAPES por meio do AUX-PE-PNPD 2297/2011.

A todos, muito OBRIGADO!!!

“Nunca é tarde demais para ser aquilo que sempre se desejou ser.”

George Eliot

RESUMO GERAL

Compreender os mecanismos que tornam a presença do cobre uma substância tóxica, bem como a regulação da resposta das plantas a sinais e estímulos ambientais tem se tornado um aspecto fundamental da biologia vegetal. Nesse contexto, foi objetivo deste trabalho caracterizar o efeito de diferentes concentrações de cobre (Cu), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO) sobre a germinação, crescimento inicial, ciclo celular e o metabolismo de *Lactuca sativa* L., bem como a possível ação protetora do NO sobre a fitotoxicidade do Cu. Para tal, foram realizados três experimentos conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado. Para caracterizar o efeito do Cu e H₂O₂ sobre os aspectos fisiológicos e citológicos em *L. sativa*, sementes foram expostas às concentrações 50; 100; 250 e 500 µM de CuSO₄ e 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mM de H₂O₂ sendo água destilada utilizada como controle negativo. O Cu não influenciou a germinação (G%) e a biomassa seca (BS), no entanto, comprimento de raiz (CR) e biomassa fresca (BF) foram reduzidos conforme o aumento da concentração. Isso pode ser atribuído a redução do índice mitótico (IM) de 29,02% no tratamento controle para 1,5% na concentração 500 µM de CuSO₄. Embora essa concentração tenha sido citotóxica não foi clastogênica nas condições testadas. Para o conteúdo de prolina foi observado um comportamento concentração-dependente e a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi significativa. Ressalta-se que o Cu foi citotóxico, porém o sistema antioxidante da planta alvo impediu a peroxidação lipídica das membranas. Para H₂O₂, houve redução significativa na G% nas concentrações acima de 5 mM. O CR e IM foram negativamente influenciados e apresentaram comportamento concentração-dependente. O mesmo comportamento foi observado para prolina, que apresentou maior acúmulo nas concentrações 7,5 e 10 mM diferindo dos demais tratamentos. Além disso, houve atividade significativa das enzimas SOD e ascorbato peroxidase (APX). Ressalta-se ainda que a SOD teve maior atividade e assim, possivelmente, associada a prolina tenha atenuado a peroxidação lipídica das membranas. A fitotoxicidade do H₂O₂ interferiu negativamente no crescimento inicial de *L. sativa*. O efeito protetor do NO foi verificado pela utilização de nitroprussiato de sódio (SNP) como doador de NO. Sementes de *L. sativa* foram expostas a 250 e 500 µM de CuSO₄ e a 100, 250 e 500 µM do agente protetor isoladamente e da combinação dos dois, sendo água destilada utilizada como controle negativo. Não houve diferença significativa para G%. Para CR os tratamentos com 250 e 500 µM de SNP, diferiram entre si e dos demais tratamentos reduzindo o crescimento de maneira concentração-dependente. A combinação SNP mais Cu impediu o efeito fitotóxico desse metal nas maiores concentrações. O organismo-teste exposto a água destilada apresentou IM 26,24%, enquanto nos tratamentos com Cu isoladamente o IM foi 1,36% e 1,18% para as concentrações 250 e 500 µM, respectivamente. Dessa forma, o NO atenuou o efeito citotóxico do Cu, no entanto, isoladamente nas maiores concentrações mostrou-se citotóxico. Para BF houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo 250 e 500 µM de Cu aqueles que apresentaram menor acúmulo de biomassa. Quando 250 e 500 µM de SNP foram combinados com 250 µM de Cu os efeitos tóxicos do Cu foram atenuados, pois não houve redução da BF. O acúmulo de prolina corroborou para evidenciar o efeito protetor do NO. A divisão celular, CR e BF foram reduzidos quando *L. sativa* foi exposta ao Cu. A aplicação exógena de NO foi capaz de reduzir os efeitos deletérios do Cu.

Palavras chave: Fitotoxicidade. Metais pesados. Espécies Reativas de Oxigênio. Alface.

ABSTRACT

Understanding the mechanisms that make the presence of copper a toxic substance, as well as a regulation of the plants' response to signals and environmental cues has become a fundamental aspect of Plant Biology. In this context, the goal of this work was to characterize the effect of different concentrations of copper (Cu), hydrogen peroxide (H₂O₂) and nitric oxide (NO) on the germination, initial growth, cellular cycle and the metabolism of *Lactuca sativa* L., as well as a possible protector action of NO on the phytotoxicity of the copper. Three experiments were carried out in completely randomized experimental design. To characterize the effect of the copper and H₂O₂ on the physiological and cytological aspects on *L. sativa*, seeds were exposed to 50; 100; 250 e 500 µM of CuSO₄ and 1.0; 2.5; 5.0; 7.5 e 10 mM of H₂O₂, being the water used as negative control. The copper did not influence the germination (G%) and the dry matter (BS), however, root length (CR) and fresh matter (BF) was reduced as the concentration increased. This can be attributed to the reduction of the mitotic index (IM) of 29.02% in the control (treatment) to 1.5% in the concentration 500 µM of CuSO₄. Although this concentration has been toxic, it was not clastogenic in the tested conditions. To the content of proline, concentration-dependent behavior was observed and the activity of superperoxide dismutase (SOD) was significant. It is noteworthy that the copper was cytotoxic, but the antioxidant system of the target plant prevented the lipid peroxidation of the membranes. To H₂O₂, it had a significant reduction of G% in the concentrations over 5mM. The CR and IM were negatively influenced and showed concentration-dependent behavior. The same behavior was observed to proline, that present higher accumulation in the concentration of 7.5 e 10 mM, differing of the others treatments. Furthermore, the activity of the enzymes (SOD) and ascorbato peroxidase (APX) was significant. It is noteworthy that the SOD had higher activity and thus, possibly, associated to the proline has attenuated the lipid peroxidation of the membranes. The phytotoxicity of H₂O₂ interfered negatively in the initial growth of *L. sativa*. The protector effect of the NO was verified by use of Sodium nitroprusside (SNP) as a donor of NO. Seeds of *L. sativa* were singly exposed to 250 and 500 µM of CuSO₄ and to 100, 250 and 500 µM of the protector factor and to the combination of those two, being the water used as negative control. It has no significant difference for G%. CR treatments with 250 e 500 µM of SNP differed from each other and from the others treatments, reducing the growth in a concentration-dependent behavior. The combination SNP plus copper prevented the phytotoxic effect of this metal in the higher concentrations. The organism-test exposed to water showed IM 26.24%, while the treatments with singly copper the IM was 1.36% e 1.18% for the concentration of 250 and 500 µM, respectively. Thus, NO attenuated the cytotoxic effect of copper, however, singly in the higher concentrations showed itself cytotoxic. BF presented significant difference between treatments, being 250 and 500 µM of copper those that showed lower accumulation of biomass. When 250 and 500 µM of SNP were combined with 250 µM of copper the toxic effects of copper were attenuated, because there was not reduction of BF. The accumulation of proline supports to evidence the protector effect of NO. The cellular division, CR and BF were reduced when *L. sativa* was exposed to copper. The exogenous application of NO was capable of reducing the deleterious effects of copper.

Keywords: Phytotoxicity. Heavy Metals. Reactive Oxygen Species. Lettuce.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1	O cobre e seu efeito biológico em plantas.....	11
2.2	Estresse oxidativo provocado pelo cobre.....	14
2.3	Metabolismo antioxidante nas plantas.....	16
2.4	Óxido nítrico e sinalização.....	19
2.5	Bioensaios aplicados à avaliação da toxicidade de metais.....	21
3	JUSTIFICATIVA.....	24
4	OBJETIVOS.....	25
4.1	Objetivo geral.....	25
4.2	Objetivos específicos.....	25
	REFERÊNCIAS.....	26
	SEGUNDA PARTE	37
	ARTIGO I Copper effect on physiological and cytological aspects in <i>Lactuca sativa</i> L.....	38
	RESUMO.....	40
	INTRODUCTION.....	42
	MATERIAL AND METHODS.....	43
	RESULTS AND DISCUSSION.....	46
	CONCLUSIONS.....	53
	REFERENCES.....	54
	ARTIGO II Aspectos fisiológicos e efeito inibitório da proliferação celular em <i>Lactuca sativa</i> L. exposta ao peróxido de hidrogênio.....	63
	RESUMO.....	64
	INTRODUÇÃO.....	65
	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS.....	75
	ARTIGO III Efeito protetor do óxido nítrico sobre a fitotoxicidade do cobre em <i>Lactuca sativa</i> L. (ASTERACEAE).....	82
	RESUMO.....	83
	INTRODUÇÃO.....	84
	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	91

1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados ocorrem naturalmente no meio ambiente, como constituintes de rochas, nos solos, na água e nos seres vivos. Desta forma, entende-se que só ocorre poluição, quando a concentração destes elementos é amplamente superior aos níveis naturais existentes no ambiente (GONÇALVES JR.; PESSOA, 2002).

A existência de áreas contaminadas por metais pesados provoca danos ambientais, como comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e prejuízos à saúde humana. Casos de contaminação do solo por metais em áreas agricultáveis do estado de Minas Gerais foram relatados por Fernandes et al. (2007). Relatos apresentados pela CETESB mostram que a contaminação do solo por metais pesados representa 12% das áreas contaminadas no estado de São Paulo (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB, 2005).

Os metais pesados são convencionalmente definidos como elementos com propriedades metálicas (ductilidade, condutividade, estabilidade de cátions, a especificidade do ligante, dentre outras) que possuem número atômico maior que 20 e densidade maior que 5 g cm^{-3} . Dentre os 90 elementos naturais, 53 são metais pesados e nesse grupo encontram-se o Cu, Fe, Mn, Ni e Zn, que são considerados micronutrientes essenciais para plantas (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005).

Os metais presentes no solo podem ser provenientes de fontes geológicas, liberados pelo intemperismo, ou provenientes de atividades antrópicas. No final do século XIX e início do século XX, a contaminação do ar, águas e solos, por metais pesados devido às ações antrópicas, tornou-se mais comum (NRIAGU; PACYNA, 1988). As principais fontes antrópicas de contaminação do solo por metais são: mineração e beneficiamento de metais, aplicação de defensivos agrícolas e fertilizantes, lodos de esgoto urbanos e industriais, queima de combustíveis fósseis, águas residuárias, resíduos de indústrias de beneficiamento químico, disposição de artigos eletrônicos, de caça e pesca, e treinamento militar e de guerra. Dentre os metais contaminantes, os mais comuns são o Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn (KABATA-PENDIAS, 2011).

O cobre tem despertado especial interesse, devido a seus efeitos tóxicos no ambiente e sobre saúde humana (HU et al. 2009). No entanto, os estudos realizados para compreender o efeito tóxico do cobre na fisiologia das principais culturas alimentares ainda são incipientes (DIMKPA et al., 2012; SHAW; HOSSAIN, 2013).

As principais fontes de contaminação do solo por cobre estão associadas a atividades antrópicas, como as resultantes da acumulação de fertilizantes, de chorumes, estrumes de aviários e pocilgas, fungicidas, bactericidas e a mineração (DUČIĆ; POLLE, 2005).

Segundo Bowen (1979), o teor normal de cobre no solo varia de 2 a 250 mg kg⁻¹. Estimativas afirmam haver um acréscimo de cobre nos solos, sendo de 3 a 38 x 10⁶ t ano⁻¹ devido ao uso de resíduos agrícolas, e de 660 a 1580 x 10⁶ t ano⁻¹ em consequência da aplicação de lodos de esgoto urbano e industrial (NRIAGU; PACYNA, 1988).

Nos solos agrícolas, as concentrações de cobre podem chegar a valores entre 110 e 1500 mg kg⁻¹, causando toxicidade, e está associada, sobretudo, a utilização de fungicidas (BAKER; SENFT, 1995). Na serra gaúcha, por exemplo, a maior região vitivinícola do Brasil, as videiras são submetidas a aplicações sucessivas de calda bordalesa [(CuSO₄ + 5H₂O + Ca(OH)₂)] como fungicida para controle do míldio (*Plasmopara viticola*) (SONEGO, 2002). O uso continuado desse produto pode adicionar até 30 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de cobre, ultrapassando o seu teor crítico no solo e a capacidade máxima de adsorção, inviabilizando o cultivo de plantas nessas condições (ARIAS et al., 2004; FERNÁNDEZ-CALVIÑO et al., 2008). Estudos indicam que a aplicação de fungicidas cúpricos em videiras aumenta tanto o teor total de cobre no solo, inclusive quando amostras de solo da camada de 20–40 cm de profundidade são analisadas (CASALI, 2008). Ainda, a concentração de cobre no solo depende da sua adsorção às partículas orgânicas e inorgânicas, tornando-o praticamente imóvel no solo, não sendo lixiviado para as camadas mais profundas (MENGEL; KIRKBY, 2001).

As plantas, quando submetidas a ambientes contaminados por metais pesados como o cobre, apresentam uma série de distúrbios fisiológicos e nutricionais, como alteração na absorção, translocação e funções dos nutrientes (PAIVA; CARVALHO; SIQUEIRA, 2002). Podem ainda apresentar mudanças em processos fisiológicos importantes, tais como fotossíntese, respiração, atividade enzimática e crescimento, resultando em diminuição da produtividade agrícola (KÄRENLAMPI et al., 2000). Desse modo, é necessário conhecer as interações entre plantas e metais, para avaliar os riscos associados à entrada destes na cadeia alimentar, através da sua absorção pelos vegetais, uma vez que, em quantidades excessivas, podem causar sérios problemas a todos os organismos (NRIAGU; PACYNA, 1988).

Nesse contexto, estudar o efeito do cobre sobre o metabolismo antioxidante enzimático e alterações citogenéticas em bioensaios com *Lacuta sativa* L. bem como as interações com espécies reativas de oxigênio e os possíveis mecanismos de proteção podem trazer subsídios para compreender a fitotoxicidade desse metal.

2 DESENVOLVIMENTO

A seguir, é apresentada uma revisão de literatura atualizada acerca dos temas abordados nesta dissertação, com intuito de gerar embasamento teórico para a análise e discussão dos resultados.

2.1 O cobre e seu efeito biológico em plantas

Os metais pesados são componentes naturais dos solos e alguns, como é o caso do cobre (Cu), são considerados micronutrientes essenciais para as plantas. Porém, a intensificação das atividades antrópicas industriais e agrícolas, têm elevado os níveis de metais no ambiente e, desta forma, comprometendo importantes funções metabólicas associadas à fisiologia, bioquímica e biologia molecular das plantas (YRUELA, 2009).

As plantas são organismos autotróficos que possuem a habilidade de captar energia luminosa e sintetizar componentes vitais a partir do dióxido de carbono (CO₂), água (H₂O) e nutrientes. Os minerais, macro e micronutrientes, são essenciais para promover e manter o crescimento harmonioso e seu desenvolvimento normal, bem como, completar seu ciclo de vida (HENRIQUES; CHALFUN-JUNIOR; AARTS, 2012; YRUELA, 2009).

A planta necessita basicamente de dezessete elementos essenciais que podem ser divididos em não-minerais e minerais. Os nutrientes não-minerais, carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), são absorvidos a partir da água (H₂O) e do gás carbônico (CO₂). Dentre os nutrientes minerais, seis são absorvidos e exigidos em quantidades superiores aos demais (N, P, K, Ca, Mg e S) e são chamados de macronutrientes. Já os elementos Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl e Ni, que são exigidos em menores quantidades, são, por isso, denominados micronutrientes (MENGEL; KIRKBY, 2001).

A construção de grupos proteicos e a ativação enzimática são as principais funções dos micronutrientes. Desse modo, é importante conhecer a bioatividade e distribuição dos micronutrientes nas diferentes partes das plantas, a fim de estabelecer os sintomas causados pela falta ou excesso desses nutrientes (MARSCHNER, 1995).

O cobre é um micronutriente que atua como elemento estrutural de várias proteínas, envolvidas na cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria e cloroplastos, bem como na

resposta ao estresse oxidativo em plantas (GRATÃO et al., 2005; YRUELA, 2009). Está também envolvido no metabolismo da parede celular, sinalização de hormônios, no metabolismo de proteínas e mobilização do ferro (PILON et al., 2006; YRUELA, 2005).

Uma característica particular e importante dos íons Cu^{+2} é a sua capacidade para se ligar a pequenas moléculas como oxigênio (O^2), o que explica porque o cobre é um cofator num grande número de oxidases, tais como superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX), dentre outras (KRAMER; CLEMENS, 2005; YRUELA, 2009).

As plantas absorvem o cobre na forma iônica (Cu^{+2}) e a quantidade média encontrada nas folhas é de 10 mg g^{-1} da matéria seca ($5\text{-}20 \text{ mg g}^{-1}$ de matéria seca), embora estas concentrações possam variar entre espécies e suas variedades (MARSCHNER, 1995; YRUELA, 2009).

O Regulamento da Comissão Européia (CE) N.º 149/2008 de 29 de Janeiro de 2008 que altera o Regulamento (CE) nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ao criar os anexos II, III e IV que fixam limites máximos de resíduos para os produtos abrangidos pelo anexo I do mesmo regulamento, estabelece o limite máximo de Cu em alface de 100 mg kg^{-1} da biomassa fresca.

Embora a mobilidade do Cu nas plantas seja restrita, Marschner (1995) argumenta sobre vários aspectos fisiológicos envolvendo a translocação de cobre de folhas senescentes para folhas jovens. No entanto, este processo parece ser dependente da concentração. Assim, considera-se haver deficiência de cobre, quando o teor deste elemento varia entre 1 a 5 mg kg^{-1} na biomassa seca. Do ponto de vista molecular, pouco se conhece acerca dos efeitos e respostas que resultam da deficiência de cobre (KRAMER; CLEMENS, 2005).

A presença de altas concentrações de cobre no solo afeta negativamente o crescimento e a produtividade das plantas, devido à peroxidação lipídica das membranas celulares, ao comprometimento da atividade fotossintética, e aos processos de absorção e assimilação de nutrientes (BUENO; PIQUERAS, 2002; DEVRIESE et al., 2001; FIDALGO et al., 2013; LANARAS et al., 1993; LLORENS et al., 2000;).

Nos solos, a faixa de concentração tóxica de Cu para plantas é de 20 a 100 mg kg^{-1} . Os sintomas associados ao excesso de cobre podem ser cloroses, necroses e inibição do crescimento (KABATA-PENDIAS, 2011; MARSCHNER, 1995; YRUELA, 2005). Pode gerar ainda, danos oxidativos e interferir com estruturas e processos celulares importantes como a fotossíntese, síntese de pigmentos fotossintéticos, permeabilidade da membrana celular e outros mecanismos metabólicos, provocando forte inibição do desenvolvimento da planta (BERTRAND; POIRER, 2005; YRUELA, 2005). Sintomas característicos da

toxicidade de Cu foram observados por Mourato et al. (2009) em plantas de tremoço com teor de Cu de $60 \mu\text{g g}^{-1}$ na parte aérea. Por outro lado, Berton et al. (1997) citam que plantas de milho apresentando teor de 335 mg kg^{-1} de Cu nas folhas, não manifestaram sintomas de toxicidade ou diminuição na biomassa seca.

Alterações no conteúdo de Cu provocam ainda mudanças nos teores de vários elementos minerais nas plantas (BRUN et al., 2003). De acordo com Kabata-Pendias (2011), o Cu possui interação com o Zn, Mo, Fe, Cd, Cr, P e Ca, podendo seus efeitos ser antagônicos ou sinérgicos. Altas concentrações de Cu na planta diminuem o conteúdo de Fe no cloroplasto. O Cu interfere no papel do Mo que atua na redução de nitrato. A interação entre Cu e Cd e entre Cu e Mn é tanto antagônica quanto sinérgica, e somente sinérgica para Cu-Ni. O efeito antagônico do Cu com o Fe e o P pode ser devido à competição por sítios disponíveis de adsorção na superfície da raiz.

Mourato et al. (2009) verificaram que o teor de Na, K, Ca, Mg e Fe, não foi alterado com o aumento das doses de Cu. Já os nutrientes Mn, P e Zn, foram mais afetados, sendo que o aumento na concentração do metal diminuiu o teor de Mn tanto nas raízes quanto nas folhas; para o P foi observado diminuição somente nas folhas; e para o Zn aumento na absorção pelas raízes.

Barbosa Filho et al. (1990) observaram que doses crescentes de Cu, na ausência do Zn, estimularam a absorção deste último, caracterizando uma interação sinérgica entre os dois elementos. Tal interação é explicada pela substituição parcial do Zn pelo Cu nos sítios de troca dentro da planta.

Bertoni et al. (1999) verificaram que os teores de N, P, K e Ca na parte aérea das plantas de arroz não foram influenciados pelas doses de Cu (0; 0,75; 1,5; 2,25 e $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo). Entretanto, dentre os macronutrientes, apenas o Mg e o S foram influenciados significativamente pelas doses de Cu aplicadas. Desta forma, a presença de altas concentrações de Cu no ambiente pode tornar-se tóxica afetando o desenvolvimento da planta devido às interferências diretas ou indiretas com inúmeros processos fisiológicos (MENGEL; KIRKBY, 2001).

Os mecanismos envolvidos no aumento da tolerância das plantas ao Cu podem ser bastante diversificados (LASAT et al., 2002). No entanto, sabe-se que a fim de evitar o acúmulo de Cu, as plantas têm uma complexa rede de transportadores envolvidos no equilíbrio intracelular, e com isso, asseguram a alocação adequada do elemento à proteína alvo (YRUELA, 2009). Os membros da COPT1 e COPT5 da família das proteínas

transportadoras de Cu (COTP) têm sido encontrados no citoplasma e vacúolo de plantas (MARTINOIA et al., 2012; YRUELA, 2009).

Um mecanismo de defesa que provavelmente está presente na maioria das plantas, é a baixa translocação do Cu das raízes para a parte aérea. Esse processo é caracterizado como a primeira barreira contra a entrada de metais pesados e consiste na imobilização desses na parede celular das raízes por carboidratos extracelulares como mucilagem e calose, evitando a presença de íons livres nos tecidos radiculares e a translocação dos metais para a parte aérea das plantas (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2003).

2.2 Estresse oxidativo provocado pelo cobre

O Cu pode ser considerado micronutriente essencial para as plantas em baixas concentrações, porém pode ser tóxico em concentrações mais elevadas, devido a sua ação próoxidativa (HATTAB et al., 2009). O estresse oxidativo pode ser avaliado como um dos principais mecanismos de toxicidade de metais pesados em plantas (POBORILOVA; OPATRILOVA; BABULA, 2013; SHAW; HOSSAIN, 2013; SHAW et al., 2014). O excesso de Cu pode causar estresse oxidativo em plantas, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) altamente tóxicas (APEL; HIRT, 2004; ARASIMOWICZ; FLORISZAK-WIECZOREK, 2007; FOYER; SHIGEOKA, 2011; GILL; TUTEJA, 2010).

As ERO também são subprodutos do metabolismo aeróbio das plantas, que resultam de variadas vias metabólicas (tais como a respiração celular, fotorrespiração, oxidação de lipídios e fotossíntese) localizadas em diversos compartimentos celulares, como as mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (APEL; HIRT, 2004; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007; NAVROT et al., 2007). As ERO são normalmente referidas como subprodutos de reações redoxes, que se apresentam tanto como radicais livres, como na forma molecular de um não radical (KOVALCHUK, 2010). Essas moléculas podem ser geradas como resultado de excitação, formando oxigênio singlete, ou de sucessivas adições de elétrons ao O_2 , reduzindo-o ao radical aniônico superóxido (O_2^-), radical hidroperoxila (HO_2) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\bullet$) (BHATTACHARJEE, 2010; D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007). O óxido nítrico (NO), o dióxido de nitrogênio (NO^2), peroxinitrito (ONOO-), S-nitroiois (RSNO) e a S-nitrosoglutaciona (GSNO) são conhecidas

espécies reativas de nitrogênio (SOUZA et al., 2007). Tais substâncias podem ser altamente destrutivas, pois aumentam a permeabilidade das membranas (desestabilização estrutural das proteínas) e induzem a peroxidação lipídica e a degradação do ácido indolacético (AIA), levando a uma diversidade de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas nas plantas (MEDIOUNI et al., 2006).

Em outras palavras, os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um elétron não pareado e, portanto, são extremamente reativos. Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. Estes radicais podem ser formados por vários mecanismos, tais como a adição de um único elétron a uma molécula não radical. Além disso, também podem ser formados quando a ligação covalente é quebrada, permanecendo um elétron do par de ligação em cada átomo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Dentre as ERO, o O_2^- é moderadamente reativo e considerado instável por possuir número ímpar de elétrons (13) na última camada eletrônica. Já o H_2O_2 é uma ERO moderadamente reativa com uma meia-vida relativamente longa (1 ms) e cujo pequeno tamanho permite-lhe atravessar membranas celulares e migrar para diferentes compartimentos. Dessa forma, difunde os danos e também atua como um mensageiro da condição de estresse. Ressalta-se ainda que o H_2O_2 tem uma ação deletéria, porque participa da reação formadora de $(OH\bullet)$ (GADJEV et al., 2008; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). O radical $(OH\bullet)$ é considerado a mais oxidante dentre as ERO e sua alta reatividade resulta em reações rápidas e inespecíficas com distintos substratos, podendo potencialmente reagir com todos os tipos de moléculas biológicas (AGUIAR; FERRAZ, 2007; MYLONA; POLIDOROS, 2011). Em sistemas biológicos, pode ocasionar modificações nas bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA; desnaturar proteínas pela oxidação de grupos sulfidril (-SH) e pontes dissulfeto (-SS), além de causar danos a moléculas de carboidratos e retirar átomos de hidrogênio de grupos metileno de ácidos graxos poli-insaturados, dando início à peroxidação lipídica (BARREIROS; DAVID, 2006; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Assim, as espécies reativas podem reagir rapidamente desestabilizando outras moléculas e gerando outros radicais livres e, conseqüentemente, o estresse oxidativo.

Dada a capacidade para mudar o seu estado redox, alterações no teor de cobre podem provocar estresse oxidativo direto. Os íons Cu^+ podem reagir, segundo as reações de Fenton, com o H_2O_2 gerando radicais hidroxila $(OH\bullet)$ e segundo a reação Haber-Weiss, podem ser reduzidos pelos radicais superóxido (O_2^-) , e reagir em seguida com o H_2O_2 (BARTOSZ, 1997;

KRAMER; CLEMENS, 2005; MARSCHNER, 1995). É importante notar que a função de ser um sinalizador de estresse ou uma molécula prejudicial à célula depende de um equilíbrio entre a produção de ERO e a produção de substâncias antioxidantes (GRATÃO et al., 2005; GECHEV et al., 2006). Desta maneira, é necessário que o nível de ERO na célula seja mantido sob controle, uma vez que o acúmulo dessas espécies pode causar inúmeros danos às células (MITTLER, 2002; SHARMA, 2012).

2.3 Metabolismo antioxidante nas plantas

As plantas respondem aos desafios ambientais, alterando o metabolismo celular e acionando vários mecanismos de defesa. Sua sobrevivência a condições de estresse depende da capacidade da planta de perceber o estímulo, gerar e transmitir sinais, instigando mudanças bioquímicas que ajustem seu metabolismo. A ação fitotóxica do cobre produz ERO, que podem agir oxidando proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, caracterizando o estresse oxidativo (ASADA, 1999; DAT et al., 2000). Neste contexto, as plantas têm demonstrado uma variedade de mecanismos para combater os radicais livres (ZHANG et al., 2006).

O termo antioxidante foi inicialmente utilizado para identificar compostos inibidores de radicais livres. Com o tempo, a aplicação dos termos ‘sistema antioxidante’ e ‘antioxidante’ foi ampliada e atualmente, inclui não somente o sistema de eliminação de espécies reativas e a prevenção de sua formação, mas também o sistema de detoxificação, que eliminam compostos que possam sofrer oxidação espontânea por oxigênio (PRADEDOVA; ISHEEVA; SALYAEV, 2011).

Segundo Hernandez et al. (2010) plantas que apresentam maior atividade do sistema antioxidante são mais resistentes aos danos oxidativos. Isso foi verificado por Alves et al. (2013), estudando uma espécie tolerante ao alagamento (*Sesbania virgata*), que observou aumento na atividade enzimática do sistema antioxidante ao longo do estresse. Portanto, dentre os antioxidantes estão substâncias capazes de neutralizar os radicais livres, suprimir a oxidação desses radicais e ainda aquelas capazes de proteger estruturas biológicas (PRADEDOVA; ISHEEVA; SALYAEV, 2011).

O sistema antioxidante verificado nas plantas inclui tanto atividades enzimáticas quanto não enzimáticas. A atividade coordenada desses antioxidantes regula a detoxificação e/ou eliminação das espécies reativas (CHOUDHURY et al., 2013). Nesses organismos, de

acordo com Sharma et al. (2012), o complexo sistema de defesa antioxidante é distribuído nas diferentes organelas celulares, como mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos.

O sistema não enzimático inclui ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides e flavonoides, entre outros compostos de baixa massa molecular. Eles podem ser divididos em duas categorias: antioxidantes lipossolúveis e os hidrossolúveis. Tocoferol, quininas, bilirrubina e alguns polifenóis fazem parte dos antioxidantes lipossolúveis, enquanto o ácido ascórbico, glutathione, ácido úrico e também outros polifenóis pertencem aos hidrossolúveis. Esses compostos agem como tampões redoxes, interagindo com inúmeros componentes celulares. Também influenciam no crescimento e desenvolvimento das plantas através da modulação de processos como mitose e crescimento radicular, e até senescência e morte celular. É importante ressaltar ainda que estes compostos podem influenciar a expressão gênica associada à resposta ao estresse biótico e abiótico, maximizando a defesa (FOYER; NOCTOR, 2005). A regulação da expressão de genes codificantes de enzimas antioxidantes, cuja atividade evita ou reduz os danos potenciais causados pelas ERO, faz parte da resposta ao estresse oxidativo (CYRNE et al., 2003). Contudo, os pontos de regulação mais importantes são aqueles relacionados à economia de energia e ao controle da formação de ERO (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010).

O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX), a catalase (CAT), a dehidroascorbato redutase (DHAR), a guaiacol peroxidase (GPX), a glutathione redutase (GR) e a monodehidro ascorbato redutase (MDHAR) (YRUELA, 2009).

Dentro das células, a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra ERO, e catalisa a dismutação dos íons superóxido (O_2^-) para H_2O_2 e O^2 . Como dito anteriormente, os íons superóxido são sintetizados em qualquer compartimento celular onde há um transporte de elétrons, portanto a SOD está presente em todos os compartimentos celulares susceptíveis ao estresse oxidativo (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; MITTLER, 2002). A SOD é classificada de acordo com seu metal cofator. Assim, as FeSOD (utilizam o ferro como cofator) são encontradas no estroma dos cloroplastos e mantêm similaridade estrutural com as MnSOD (utilizam manganês como cofator), as quais são encontradas principalmente em mitocôndrias. Já as Cu/ZnSOD (utilizam cobre e/ou zinco como cofator) podem estar localizadas tanto em cloroplastos, como no citosol, apoplasto e peroxissomos, e não possuem estrutura relacionada com as outras duas. Os genes da SOD já demonstraram ser sensíveis ao estresse, como consequência da formação de ERO (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002;

BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; CAVALCANTI et al., 2004; DUTILLEUL et al., 2003; FERREIRA; DOMINGOS, 2012).

A APX é considerada a enzima mais importante na eliminação de H_2O_2 no citosol e nos cloroplastos (INZÉ; VAN MONTAGU, 1995). Essa enzima utiliza ascorbato como doador de elétrons para reduzir H_2O_2 à água, fazendo parte do ciclo ascorbato-glutationa (SHIGEOKA et al., 2002). Segundo Polle (2001), esse ciclo é uma via eficiente para plantas que apresentam disponível o H_2O_2 , em alguns compartimentos celulares onde não existe catalase presente, como por exemplo, nos cloroplastos (MITTLER, 2002). As isoenzimas de APX são distribuídas em, pelo menos, quatro compartimentos celulares distintos: mitocôndria (miAPX), citosol (cAPX), peroxissomo/glioxissomo (mAPX) e nos cloroplastos (chlAPX). No entanto, nos cloroplastos, a APX ocorre em duas isoformas: a da membrana do tilacoide (tAPX) e a forma solúvel no estroma (sAPX). A APX da membrana dos tilacoides e a estromal estão envolvidas na eliminação do H_2O_2 produzido pela fotossíntese e a mAPX e a miAPX eliminam o H_2O_2 produzido pela fotorrespiração e pela respiração, respectivamente. A função fisiológica da cAPX é de proteção das plantas sob diferentes condições de estresse (MANO; OHNO; ASADA, 1999; SHIGEOKA et al., 2002).

A CAT, enzima que possui diferentes isoformas em vegetais, tem a função de neutralizar o H_2O_2 em água e oxigênio molecular e está presente nos peroxissomos e glioxissomos. Juntamente com a APX a CAT é uma das principais enzimas de detoxificação do H_2O_2 em plantas e podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico. As catalases podem ser divididas em três classes: classe 1, que removem o H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração em tecidos fotossintéticos; classe 2, produzidas em tecidos vasculares e cuja função biológica permanece desconhecida; e classe 3, onde estão as catalases presentes em sementes e plantas jovens, cuja atividade está relacionada à remoção do H_2O_2 produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (GARG; MANCHANDA, 2009; GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA, 2012).

A glutaciona (GSH) é regenerada pela glutaciona redutase (GR), enquanto que a guaiacol peroxidase (GPX) é uma enzima que catalisa a redução de H_2O_2 e de hidroperoxilípídeo gerado durante a peroxidação lipídica e vai formar água utilizando guaiacol como substrato (APEL; HIRT, 2004; DIETZ, 2011; FOYER; SHIGEOKA, 2011).

A superexpressão de isoformas das enzimas supressoras de radicais livres, como SOD, APX, CAT, GR e GPX resultou em tolerância a estresse abiótico em várias espécies de plantas devido à eficiente capacidade de supressão dos radicais livres (GILL; TUTEJA, 2010). Uma forma de controlar os danos oxidativos causados pela fitotoxicidade do cobre é por meio da

ação das enzimas antioxidantes. De forma geral, a função deste sistema antioxidante é sequestrar ou suprimir as ERO produzidas durante o estresse oxidativo e, assim, ajudar a planta a sobreviver a tais condições (APEL; HIRT, 2004; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; FOYER; SHIGEOKA, 2011; GILL; TUTEJA, 2010).

Os compostos antioxidantes vão inibir o processo de oxidação, mesmo que estejam em concentração relativamente baixa, convertendo os radicais em espécies menos reativas (GILL; TUTEJA, 2010; SHAO et al., 2008). Desse modo, um antioxidante é qualquer substância que retarda ou previne significativamente a oxidação do conteúdo celular, envolvendo proteínas, carboidratos e DNA, mantendo estas biomoléculas no estado ativo para o metabolismo (FOYER; NOCTOR, 2005). Essa ampla variedade de antioxidantes difere na sua composição, propriedades físicas e químicas, mecanismos e sítios de ação.

Considerando que estes antioxidantes estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, qualquer incitação que perturbe o balanço redox celular, pode servir como um estímulo indutor a qualquer gene relacionado à defesa. Assim, não é necessário que apenas aqueles genes relacionados diretamente com o controle de ERO e ERN, sejam estimulados, mas também qualquer gene das vias de síntese dos compostos antioxidantes ou genes relacionados a essas vias (FOYER; NOCTOR, 2005; VRANOVA et al., 2002).

Diante do exposto, o estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e sua eliminação, e dessa forma, a homeostase redox celular é governada pela presença de grandes grupos de antioxidantes que absorvem e tamponam redutores e oxidantes (FOYER; NOCTOR, 2005). O sistema de defesa antioxidante neutraliza os efeitos danosos das espécies reativas através de diferentes mecanismos, como atividade redutora e complexação potencial de metais pró-oxidantes. Estas atividades variam entre diferentes espécies e partes das plantas (TACHAKITTIRUNGROD; OKONOJI; CHOWWANAPONPOHN, 2007).

2.4 Óxido nítrico e sinalização

O óxido nítrico (NO) é uma molécula lipofílica bioativa pequena, ubíqua e postulada como um composto que age contra diferentes tipos de estresses em plantas. Este gás altamente difusível e que rapidamente transpõe a membrana celular, possui uma meia vida curta (aproximadamente 3 segundos) na presença de O^2 devido a sua alta reatividade

(CRAWFORD, 2006; STEFANO et al., 2006). Por isso, a grande maioria das pesquisas com NO em organismos vivos envolve aplicação de doadores de NO, como o nitroprussiato de sódio (SNP) (TOSSI; CASSIA; LAMATTINA, 2009).

Além de reagir com o NO atmosférico e do solo, as plantas também são capazes de emitir grandes quantidades de NO. Essa molécula pode ser gerada por mecanismos não enzimáticos, tais como por meio da redução química do NO₂, por carotenoides, na presença de luz e em pH ácido e na presença de um redutor como o ácido ascórbico (COONEY et al., 1994; CRAWFORD, 2006).

Contudo, a origem principal da produção de NO em plantas, é provavelmente por meio da ação da nitrato redutase (NR) que utiliza NADPH como doador de elétrons. (YAMASAKI; SAKIHAMA; TAKAHASHI, 1999). A NR foi o primeiro mecanismo descoberto, de produção de NO em plantas. Esta enzima normalmente reduz nitrato em nitrito, mas pode também reduzir nitrito a NO (CRAWFORD, 2006). A atividade produtora de NO da NR, tem sido constantemente verificada tanto *in vivo*, como *in vitro* (COURTOIS et al., 2008).

Esse mensageiro secundário foi descrito primeiramente como um composto tóxico e mais tarde como um importante sinalizador na fisiologia celular de animais e plantas (FRUGILLO et al., 2014; GARCÍA-MATA; LAMATTINA, 2002; PAGNUSSAT et al., 2002). As funções fisiológicas do NO têm sido amplamente documentadas em mamíferos, destacado sua importância como molécula sinalizadora em sistemas imune, vascular e nervoso. Já em plantas, evidências sugerem que o NO esteja envolvido no crescimento, desenvolvimento e em resposta a sinais ambientais que afetam a fotomorfogênese, a expansão foliar, o crescimento de raiz, o crescimento do tubo polínico e a senescência (EDERLI et al., 2009). Além disso, o NO também exerce atividade antioxidante em vias similares a dos flavonoides (TOSSI et al., 2011).

Estudos indicam que a aplicação de NO exógeno, sob a forma de SNP, melhora a tolerância de plantas ao estresse induzido por metais pesados (PANDA; CHAUDHURY; KHAN, 2011; WANG et al., 2013). Esses estudos indicam que o efeito protetor do SNP foi devido à liberação de NO. A função protetora do NO inclui a regulação das ERO e antioxidantes, indução da expressão de genes, e a absorção e distribuição de elementos (HSU; KAO, 2004). No entanto, por se tratar de uma espécie reativa de nitrogênio (ERN), os efeitos do NO podem ser citotóxicos ou de proteção dependendo da sua concentração (LAMATTINA et al., 2003).

Interagindo com ERO e outras pequenas moléculas, o NO é parte fundamental de muitas vias de transdução de sinal e participa na regulação de múltiplas respostas a uma variedade de estresses bióticos e abióticos, tais como seca, calor e até infecção por patógenos (LOMBARDI et al., 2010).

Em muitas plantas, o NO tem influenciado de forma importante o crescimento, desenvolvimento e a defesa celular (STEFANO et al., 2006; ZAGO et al., 2006). Evidências sugerem, por exemplo, que a ativação da morte celular programada durante a reação de hipersensibilidade em defesa a patógenos, a qual é codificada pelo genoma, é ativada pela fina modulação dos níveis de O_2^- , H_2O_2 e NO. Assim, tanto NO quanto ERO são necessários para desencadear a morte celular. Ambos são também componentes de um sistema de defesa altamente integrado que envolve a ativação do fluxo de íons, mudança no padrão de fosforilação de proteínas, no pH extracelular, no potencial de membrana, na oxidação de proteínas da parede celular e alterações nos níveis de cálcio (Ca^{2+}) que desencadeiam a expressão local de genes de resistência (STEFANO et al., 2006). Isso indica que NO e ERO exercem um papel chave na regulação da resposta das plantas a contaminantes ambientais (ZAGO et al., 2006). Nesse sentido, o NO age como molécula sinalizadora, uma vez que ele pode ativar uma sequência de eventos acionando respostas de defesa celular (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Em relação à atividade antioxidante, o NO pode reagir diretamente com ERO, como mencionado anteriormente, e também com metais de transição. Além disso, pode gerar outras ERN, como peroxinitrito ($ONOO^-$), S-nitrotiois (RSNO) e a S-nitrosoglutathiona (GSNO). Estas ERN são moléculas tóxicas em altas concentrações, ou funcionam também como sinalizadores em resposta a estresse, podendo regular muitas funções biológicas pela reação com moléculas celulares, incluindo proteínas, vitaminas e ácidos nucleicos (TOSSI et al., 2011). Dessa maneira, o NO não é apenas uma molécula sinalizadora de estresse, mas também pode agir como um sinalizador intrínseco do crescimento e desenvolvimento da planta (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

2.5 Bioensaios aplicados à avaliação da toxicidade de metais

Um dos mecanismos usados para monitorar a toxicidade de contaminantes ambientais, é a utilização de organismos sensíveis à presença de toxicantes como bioensaios. Espécies

vegetais são amplamente utilizadas em testes de toxicidade e genotoxicidade, incluindo estudos de bioacumulação de metais pesados (ALVIM et al., 2011; GIORGETTI et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; SIMÕES et al., 2013).

Os bioensaios demonstram grande eficiência no monitoramento de poluentes ambientais sendo importantes para avaliar o nível de prejuízo ambiental decorrido da contaminação por metais pesados e representam uma alternativa para complementar as análises químicas (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000; PANDARD et al., 2006; RODRIGUES et al., 2013; WILKE et al., 2008).

Bioensaios em que se utilizam plantas superiores são considerados eficientes para a avaliação e monitoramento da toxicidade de poluentes (CZERNIAWSKA-KUSZA; KUSZA, 2011; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Sua principal vantagem é a ampla variedade de parâmetros de toxicidade, como a taxa de germinação, ganho de biomassa, comprimento de raízes e aspectos bioquímicos, além de apresentar baixo custo e possibilidade de serem realizados continuamente (GUSTAVSON et al., 2000; ŽALTAUSKAITĖ; ČYPAITĖ, 2008).

Bioensaios vegetais que avaliam a germinação são realizados durante os primeiros dias do desenvolvimento das plantas nos quais ocorrem uma série de processos fisiológicos importantes e a presença de uma substância fitotóxica pode causar efeitos adversos, resultando em uma série de anomalias, podendo até mesmo interferir na sobrevivência da planta (SOBRERO; RONCO, 2004).

Lactuca sativa L. é uma das principais espécies pertencentes à família Asteraceae, que representa a maior família de dicotiledôneas e abrange aproximadamente 23.000 espécies, distribuídas por mais de 1.500 gêneros. As espécies dessa família encontram-se principalmente nas regiões temperadas, sendo que algumas são utilizadas como produtos hortícolas, plantas aromáticas e medicinais (ALMEIDA, 2006).

A Alface é uma planta herbácea, anual, amplamente utilizada como organismo-teste em bioensaios devido a sua tolerância a diferentes potenciais osmóticos, pequeno período requerido para sua germinação (24 a 48 horas), além de serem facilmente encontradas no comércio durante o ano todo, a um baixo custo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2005; MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000; RICE et al., 1984; RODRIGUES et al., 2013; ŽALTAUSKAITE; CYPATE, 2008). Em testes de fitotoxicidade, comumente avalia-se a inibição do processo germinativo e o comprimento das raízes que ocorre na presença de pequenas concentrações do composto tóxico, tornando este organismo um indicador sensível aos efeitos biológicos de contaminantes (PALÁCIO et al., 2012; SIMÕES et al., 2013).

Modificações no índice mitótico são bons indicadores de poluição ambiental, especialmente na avaliação de substâncias com potencial citotóxico como o Cu (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009). As anormalidades como pontes e quebras cromossômicas são indicadores de ação clastogênica, ao passo que, perdas cromossômicas, adesões e C-metáfases resultam de efeitos aneugênicos (PEREIRA et al., 2013).

3 JUSTIFICATIVA

A presença de agentes contaminantes no ambiente como os metais pesados é uma realidade nos dias atuais, principalmente devido à intensificação das atividades antrópicas tais como mineração e agricultura. O cobre em pequenas concentrações atua como micronutriente essencial para o desenvolvimento vegetal, porém em altas concentrações pode ser fitotóxico devido a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Há poucos relatos na literatura sobre a avaliação da toxicidade desse metal em plantas, bem como as interações com H_2O_2 e NO sobre o metabolismo antioxidante e alterações citogenéticas sobre organismos-teste vegetal. Nesse sentido, a exposição de *Lactuca sativa* L. a diferentes condições do agente toxicante cobre bem como as interações com espécies reativas de oxigênio e os possíveis mecanismos de proteção podem trazer subsídios para compreender a fitotoxicidade desse metal.

4 OBJETIVOS

A sessão a seguir trata dos objetivos gerais e específicos pretendidos neste trabalho.

4.1 Objetivo geral

Estudar a fitotoxicidade e citotoxicidade do cobre, H_2O_2 e NO, suas interações e os possíveis mecanismos de proteção em bioensaios com *Lactuca sativa* L.

4.2 Objetivos específicos

Caracterizar o efeito de diferentes concentrações do cobre, H_2O_2 e NO, sobre a germinação, crescimento inicial, ciclo celular e a atividade antioxidante enzimática de *Lactuca sativa* L.

Investigar o efeito protetor do NO sobre fitotoxicidade do cobre em Alface, avaliando a germinação e crescimento inicial, bem como as alterações no ciclo celular e possível ocorrência de anormalidades cromossômicas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, p. 623-628, 2007.
- ALMEIDA, D. **Manual de culturas hortícolas**. Presença, 2006. v. 2, p. 323.
- ALSCHER R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal Exp Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- ALVES, J. D, et al. Antioxidative responses and morpho-anatomical adaptations to waterlogging in *Sesbania virgate*. **Trees**, v. 27, n. 3, p. 717-728, 2013.
- ALVIM, L. B. et al. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, p. 255-165, 2011.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, v. 172, p. 876-887, 2007.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 3, p. 286-290, 2005.
- ARIAS, M. et al. Copper distribution and dynamics in acid vineyard soils treated with copper-based fungicides. **Soil Science**, v. 169, p. 796-805, 2004.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.
- BAKER, D. E.; SENFT, J. P. Copper. *In*: ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. Wiley, 1995. p. 151-175.

BARBOSA FILHO, M. P.; DYNIA, J. F.; ZIMMERMANN, F. J. P. Resposta do arroz de sequeiro ao zinco e ao cobre, com efeito residual para o milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, n. 3, p. 333-338, 1990.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Phytoremediation: principles and perspectives. **Contributions to Science**, v. 2, n. 3, p. 333-334, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, p. 47-64, 1997.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Braz. J. Plant Physiol**, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.

BERTON, R. S. et al. Peletização do lodo de esgoto e adição de CaCO₃ na produção de matéria seca e absorção de Zn, Cu e Ni pelo milho em três latossolos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, p. 685-691, 1997.

BERTONI, J. C. et al. Efeito de cobre na nutrição do arroz irrigado por inundação – teores e acúmulo de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 3, p. 547-559, 1999.

BERTRAND, M.; POIRIER, I. Photosynthetic organisms and excess of metals. **Photosynthetica**, v. 43, n. 3, p. 345–353, 2005.

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.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. **Physiologia Plantarum**, v. 139, n. 4, p. 447-462, 2010.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, n. 2, p. 179-194, 2003.

BOWEN, H. J. M. **Environmental chemistry of the elements**. London: Academic Press, 1979, p. 333.

BRUN, L. A. et al. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. **Environmental Pollution**, v. 122, n. 2, p. 361-368, 2003.

BUENO, P.; PIQUERAS, A. Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures. **Plant Growth Regul**, v. 36, p. 161-167, 2002.

CASALI, C. A. et al. Formas e dessorção de cobre em solos cultivados com videira na Serra Gaúcha do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Ciência Solo**. v. 32, n. 4, p. 1479-1487, 2008.

CAVALCANTI, F. R. et al. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v. 163, n. 3, p. 563-571, 2004.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Decisão de Diretoria N° 195-2005-E de 23/11/2005**, Dispõe sobre a aprovação dos valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo, em substituição aos valores orientadores de 2001, e dá outras providências. Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHOUDHURY, S. et al. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signal Behav**, v. 8, p. 681, 2013.

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

COURTOIS, C. et al. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 155-163, 2008.

CRAWFORD, N. M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p. 471-478, 2006.

CYRNE, L. et al. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 3, p. 385-393, 2003.

CZERNIAWSKA-KUSZA, I.; KUSZA, G. The potential of the phytotoxkit microbiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 179, p. 113-121, 2011.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 813-824, 2007.

DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 57, p. 779-795, 2000.

DEVRIESE, M. et al. Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 443-448, 2001.

DIETZ, K. J. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, p. 1129-1159, 2011.

DIMKPA, C. O. et al. CuO and ZnO Nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. **Journal Nanopart Research**. v. 14, p. 1125–1129, 2012.

DUČIĆ, T.; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.** v. 17, n. 1, p. 103-112, 2005.

EDERLI, L. et al. NO release by oxide donors in vitro and in planta. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 42-48, 2009.

FERNANDES, R. B. A. et al. Avaliação da concentração de metais pesados em áreas olerícolas no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 81-93, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D. et al. Copper distribution and acid-base mobilization in vineyard soils and sediments from Galicia (NW Spain). **European Journal of Soil Science**, v. 59, n. 2, p. 315-326, 2008.

FERREIRA, M. L.; DOMINGOS, M. Seasonal characterization of antioxidant responses in plants of *Ipomea nil* cv. Scarlet O'Hara. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 4, p. 831-837, 2012.

FIDALGO, F. et al. Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses. **Food and Energy Security**, v. 2, n. 1, p. 70–80, 2013.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v. 17, n. 7, p. 1866–1875, 2005.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 93-100, 2011.

FRUGILLO, L. et al. S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. **Nature communications**, v. 5, p. 5401, 2014.

GADJEV, I. et al. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 270, p. 87-144, 2008.

GARCIA-MATA, C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. **Plant Physiology**, v. 128, p. 790-792, 2002.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: Boon or bane? **Plant Biosystems**, v. 143, n. 1, p. 81-96, 2009.

GECHEV, T. S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, v. 28, p. 1091-1101, 2006.

GILL, 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.

GIORGETTI, L. et al. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: A case study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2275–2283, 2011.

GONÇALVES JR.; PESSOA, A. C. S. Fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em argissolo vermelho eutrófico a partir de adubos comerciais. **Scientia Agraria**, v. 3, n. 1-2, p.19-23, 2002.

GRATÃO, P. L. et al. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

GUSTAVSON, K. E. et al. Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analysis. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 421-430, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology & medicine. **Oxford Science**, p. 266, 2007.

HATTAB, S. et al. Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 1552–1556, 2009.

HENRIQUES, A. R.; CHALFUN-JUNIOR, A.; AARTS, M. Strategies to increase zinc deficiency tolerance and homeostasis in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 3-8, 2012.

HERNANDEZ, M. et al. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 2, p. 521-535, 2010.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009.

HSU, Y. T.; C. H. KAO. Phosphinothricin tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is associated with Elevated abscisic acid in the leaves. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 45, p. 41-48, 2004.

HU, A. et al. Transient response of the MOC and climate to potential melting of the Greenland Ice Sheet in the 21st century. **Geophysical Research**, v. 36, L. 10707, 2009.

INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 153-158, 1995.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**, 4. ed. CRC Press, 2011, p. 315-365-413.

KÄRENLAMPI, S. et al. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. **Environment Pollution**, v. 107, n. 2, p. 225–231, 2000.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. 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.

KOVALCHUK, I. Multiple roles of radicals in plants. In: DUTTA, G. S. **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in higher plants**. New York: CRC Press, 2010. p. 31–44.

KRÄMER, U.; CLEMENS, S. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. **Topics in Current Genetics**, v. 14, p. 215-271, 2005.

LAMATTINA, L. et al. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 109–136, 2003.

LANARAS, T. et al. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. **Physiologia Plantarum**, v. 88, p. 307-314, 1993.

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

LLORENS, N. et al. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Plant Science**, v. 160, p. 159-163, 2000.

LOMBARDI, L. et al. Nitric oxide and hydrogen peroxide involvement during programmed cell death of *Sechium edule* nucellus. **Physiologia Plantarum**, v. 140, p. 89–102, 2010.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agric Food Chem**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MANO, J.; OHNO, C.; ASADA, K. Ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its assessment by *in vivo* electron spin resonance spectrometry. **Plant Cell Physiology**, v. 40, 1999.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 1995. p. 889.

MARTINOIA, E. et al. Vacuolar transporters in their physiological context. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 183–213, 2012.

MEDIOUNI, C. et al. Cadmium and copper toxicity for tomato seedlings. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 26, p. 227-232, 2006.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition**. 5. ed. Kluwer: Academic Publishers, 2001. p. 687-849.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MØLLER, 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.

MOURATO, M. P.; MARTINS, L. L.; CAMPOS-ANDRADA, M. P. Physiological responses of *Lupinus luteus* to different copper concentrations. **Biologia Plantarum**, v. 53, p. 105-111, 2009.

MYLONA, P. V.; POLIDOROS, A. N. ROS regulation of antioxidant genes. *In*: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011, Cap. 6, p. 101-128.

NAVROT, N. et al. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 129, p. 185-195, 2007.

NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, **Nature**, v. 333, p. 134–139, 1988.

PAGNUSSAT, G. C. et al. Nitric Oxide Is Required For Root Organogenesis. **Plant Physiology**, v. 129, p. 954-6, 2002.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O. Índice de translocação de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo. **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 467-473, 2002.

PALÁCIO, S. M. et al. Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por foto-fenton artificial utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *Artemia salina*. **Engevista**, v. 14, n. 2, p. 127-134, 2012.

PANDA, S. K.; CHAUDHURY, I.; KHAN, M. H. Heavy metals induced lipid peroxidation and effect antioxidants in wheat leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 2, p. 289-294, 2011.

PANDARD, P. et al. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment**, v. 363, p. 114-125, 2006.

PEREIRA, M. P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@ambiente**, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2013.

PILON, M. et al. Copper cofactor delivery in plant cells. **Curr. Opin. Plant Biol**, v. 9, p. 256–263, 2006.

POBORILOVA, Z.; OPATRILOVA, R.; BABULA, P. Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a BY-2 plant cell suspension culture model. **Environ Exp. Botany**, v. 91, p. 1–11, 2013.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modelling. Computer simulations as a step toward flux analysis. **Plant Physiology**, v. 126, n. 1, p. 445–462, 2001.

PRADEDOVA, E. V.; ISHEEVA, O. D.; SALYAEV, R. K. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, n. 2, p. 210-217, 2011.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. ed. New York: Academic Press, 1984. p. 422.

RODRIGUES, L. C. A. et al. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1099–1108, 2013.

SHAO, H. B. et al. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 8-14, 2008.

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

SHAW, A. K.; HOSSAIN, Z. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 906-915, 2013.

SHAW, C. A. et al. Aluminum-Induced Entropy in Biological Systems: Implications for Neurological Disease. **Journal of Toxicology**, v. 2014.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, 2002.

SIMÕES, M. S. et al. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando Alface. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 29-36, 2013.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidade aguda com semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: MORALES, G. C. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. IMTA, México, p. 63-72, 2004.

SÔNIGO, O. R. et al. Recomendações para o manejo das doenças fúngicas e das pragas da videira. **EMBRAPA Uva e Vinho**, Circular técnica, 39, p. 12, 2002.

SOUZA, W. M. et al. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 191-196, 2007.

STEFANO, M. et al. Nitric oxide-mediated signaling functions during the plant hypersensitive response. **Plant Cell Monographs**, v. 5, p. 207-222, 2006.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOJI, S.; CHOWWANAPHOONPHON, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, v. 103, p. 381-398, 2007.

TOSSI, V.; CASSIA, R.; LAMATTINA, L. Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1336-1441, 2009.

TOSSI, V. et al. Nitric oxide enhance plant ultraviolet-B protection up-regulation gene expression of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. **Plant, Cell & Environmental**, v. 34, n. 6, p. 909-921, 2011.

VRANOVA, E. et al. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 99, p. 10870-10875, 2002.

WANG, P. et al. Delay in leaf senescence of *Malus hupehensis* by long-term melatonin application is associated with its regulation of metabolic status and protein degradation. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 3, p. 424-434, 2013.

WILKE, B. M. et al. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 283-293, 2008.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; TAKAHASHI, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 128-129, 1999.

YRUELA, I. Copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, n. 1, p. 145-156, 2005.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 409-430, 2009.

ZAGO, E. et al. Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. **Plant Physiology**, v. 141, p. 404-411, 2006.

ŽALTAUSKAITĖ, J.; ČYPAITĖ, A. Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants. **Environmental Research - Engineering and Management**, v. 46, p. 42-47, 2008.

ZHANG, Y. et al. Inhibition of Ca^{2+} influx is required for mitochondrial reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion and cell death in leukemia cells. **Mol. Pharmacol**, v. 70, p. 1424-1434, 2006.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO I: Effect of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L.

AUTORES: Rodrigo Miranda Moraes, Plinio Rodrigues Santos Filho, Marília Carvalho, Marina de Lima Nogueira, Sandro Barbosa.

Artigo submetido à Revista Brasileira de Biociências.

ARTIGO II: Aspectos fisiológicos e efeito inibitório da proliferação celular em *Lactuca sativa* L. exposta ao peróxido de hidrogênio

AUTORES: Rodrigo Miranda Moraes, Plinio Rodrigues Santos Filho, Marília Carvalho, Marina de Lima Nogueira, Sandro Barbosa.

Artigo redigido conforme as normas da revista Biotemas

ARTIGO III: Efeito protetor do óxido nítrico sobre a fitotoxicidade do cobre em *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE).

AUTORES: Rodrigo Miranda Moraes, Plinio Rodrigues Santos Filho, Marília Carvalho, Marina de Lima Nogueira, Sandro Barbosa.

Artigo redigido conforme as normas da revista Bioscience Journal

ARTIGO I

Effect of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L.

AUTORES: Rodrigo Miranda Moraes, Plinio Rodrigues Santos Filho, Marília Carvalho, Marina de Lima Nogueira, Sandro Barbosa.

Artigo submetido à **Revista Brasileira de Biociência**

Effect of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L.

Rodrigo Miranda Moraes¹, Plínio Rodrigues dos Santos Filho², Marília Carvalho¹, Marina de Lima Nogueira¹, Sandro Barbosa^{1*}

Effect of copper on physiological and cytological aspects in letucce

¹Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade / Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais / ICN-Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, Rua Gabriel Monteiro da Silva , nº 700, CEP: 37.130-000, Alfenas, MG, Brasil.

²Laboratório de Bioquímica / Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais / ICB-DBq-Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, Rua Gabriel Monteiro da Silva , nº 700, CEP: 37.130-000, Alfenas, MG, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br

RESUMO: (Efeito do cobre sobre aspectos fisiológicos e citológicos em *Lactuca sativa* L.) O objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito do cobre sobre os aspectos fisiológicos e citológicos em *Lactuca sativa* L. Sementes de Alface foram expostas às concentrações 50; 100; 250 e 500 μM de CuSO_4 e água destilada foi utilizada como controle, utilizando-se cinco repetições constituídas de 30 sementes e 3 mL de solução por tratamento para os testes de fitotoxicidade e três para citotoxicidade. Para prolina, atividade antioxidante enzimática, peroxidação lipídica foram utilizadas quatro repetições com 50 sementes e 5 mL de solução. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. O alongamento de raiz e biomassa fresca foram reduzidos conforme o aumento da concentração. Isso pode ser atribuído ao índice mitótico reduzido de 29,02 %, no tratamento controle, para 1,5 % na concentração 500 μM de CuSO_4 . Anormalidades cromossômicas não mostraram diferença significativa. O acúmulo de prolina nas plântulas aumentou de maneira dependente da concentração do metal. A dismutase do superóxido (SOD) foi a principal enzima responsável pela eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO). Peroxidase do ascorbato, do guaiacol e catalase não apresentaram alteração significativa. A ação da SOD juntamente com a prolina, atenuou a peroxidação lipídica das membranas. Embora a concentração 500 μM de CuSO_4 tenha sido citotóxica não foi clastogênica nas condições testadas. Além disso, o cobre não influenciou a germinação e biomassa seca. Ressalta-se ainda que *L. sativa* apresentou eficiente sistema antioxidante, não permitindo danos significativos às membranas celulares.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Metal pesado; Fitotoxicidade; Atividade antioxidante enzimática.

ABSTRACT: (Effect of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L.)

The objective of this work was to characterize the effect of copper over physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. Lettuce seeds were exposed to the concentrations of 50, 100, 250 and 500 μM of CuSO_4 and distilled water was used as control, using five replicates constituted of 30 seeds and 3 mL of solution per treatment for phytotoxicity and three for cytotoxicity tests. For proline, enzymatic antioxidant activity, lipid peroxidation, we used four replicates with 50 seeds and 5 mL of solution. The experimental design used was completely randomized. The root elongation and fresh matter were reduced according to the increase of concentration. This can be attributed to the reduced mitotic index of 29.02 % in the control treatment to 1.5 % in the concentration of 500 μM of CuSO_4 . Chromosomal abnormalities did not show significant difference. The accumulation of proline in the seedlings increased depending on the concentration of the metal. Superoxide dismutase (SOD) was the enzyme main responsible for the elimination of reactive oxygen species. Ascorbate and guaiacol peroxidase, and catalase did not present significant alteration. The action of SOD along with proline attenuated lipid peroxidation in the membranes. Although the concentration of 500 μM of CuSO_4 has been cytotoxic, it was not clastogenic in the tested conditions. In addition, the copper did not influence germination and dry biomass. We also highlight that *L. sativa* presented efficient antioxidant system, not allowing significant damage to cell membranes.

Key words: Cytotoxicity; Heavy metal; Phytotoxicity; Enzyme antioxidant activity.

INTRODUCTION

Studies on the effect of copper showed that, in low concentrations, this metal is considered an essential micronutrient for plants for being a constituent and activator of many enzymes (Burkhead *et al* 2009), however, in excess, it can negatively affect plant growth and metabolism, becoming phytotoxic (Fidalgo *et al* 2013, Cambrollé *et al* 2013).

Bioassays demonstrate high efficiency in monitoring environmental pollutants, and are important to evaluate the level of environmental damage occurred from contamination by heavy metals (Pandard *et al* 2006; Rodrigues 2013). Superior plants are widely used in bioassays and are considered efficient, overall, in heavy metal phytotoxicity studies (Pandard *et al* 2006; Czerniawska & Kusza 2011). *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) is a species widely used as test-organism. This is due to its sensitivity to chemical agents, germination and rapid and linear growths in an ample range of pH, and low sensitivity to osmotic potentials (Rice 1984, Araújo & Monteiro 2005, Ribeiro *et al* 2012).

Studies of the effects of bioaccumulation of heavy metals, such as copper, show that these are phytotoxic, causing oxidative damage, and can interfere on structures and cellular processes such as photosynthesis, mitochondrial respiration, carbon metabolism, nitrogen assimilation, permeability of the cell membrane and other metabolic mechanisms, inhibiting the vegetable development (Shi-Sheng 2007, Burkhead *et al* 2009, Yruela 2009, Cambrollé *et al* 2013). This occurs due to the chemical properties that make the transition metals important components of the cellular oxidation-reduction system and can also be responsible for undesirable reactions and cell damage (Kim & Kwak 2010, Ravet & Pilon 2013).

Copper, when in excess, is capable of catalyzing the production of Reactive Oxygen Species (ROS), causing damage to biological molecules (DNA, RNA and proteins) and lipid peroxidation in cell membranes (Shi-Sheng 2007). However, to combat the oxidative stress, the plants developed a complex antioxidant metabolism that regulates the detoxification

and/or elimination of ROS and, consequently, reduces oxidative damage (Choudhury *et al* 2013).

In phytotoxicity tests, we commonly evaluate the inhibition of the germination process and root elongation that occurs in the presence of small concentrations of the toxic compound (Palácio *et al* 2012). In addition, inferences regarding the cytotoxicity may be performed by analyzing changes in the cellular cycle (Fernandes *et al* 2007). Therefore, we aimed at characterizing the effect of different concentrations of copper on germination, initial growth, change in the cellular cycle and enzyme antioxidant activity in *Lactuca sativa*.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and treatments

For the evaluation of germination (G %), root elongation (RE), fresh matter (FM) and dry matter (DM), mitotic index (MI) and chromosomal abnormalities (CA), 30 *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids seeds were randomly distributed in Petri dishes lined with a double layer of Whitmann paper n° 2, humidified with 3 mL of CuSO₄ solution in the concentrations of 50, 100, 250 and 500 µM, using distilled water as negative control. For the quantification of proline, enzyme antioxidant activity and lipid peroxidase we used 50 seeds and 5 mL of solution per treatment. The dishes were maintained in Biochemical Oxygen Demand chamber (B.O.D.) at 20°C and photoperiod of 12 hours (SIMÕES *et al* 2013). Both the pH and the osmotic potential of the solutions were evaluated using, respectively, a digital pH-meter (Tecnonon mPA 210) and automatic osmometer (Advanced Instruments – 3320 Micro-Osmometer).

Phytotoxicity and cytotoxicity

The G % was evaluated 24 and 48 hours after experiment installation. The RE was obtained by measuring ten randomly selected roots at the end of the seven day of cultivation. Subsequently, these plants were weighed on precision analytical scale (Marte, Model AY 220) in order to determine the FM, and placed into hothouse with air circulation (Nova Era 400 ND) at 45 °C until reaching constant weight for the determination of dry biomass.

To determine the MI and CA, *L. sativa* root tips were obtained 24 hours after the exposure to each treatment. The roots were fixed in Carnoy solution, hydrolyzed in HCl 5M at 25 °C and stained with Schiff reactive. The cytogenic preparations were performed according to Pereira *et al.* (2013). We evaluated 6000 cells/treatments for the MI and CA evaluation.

The statistical design used was completely randomized with five treatments and five replicates for phytotoxicity and three replicated for cytological parameters.

Enzymatic antioxidant activity and proline content

For the extraction of the antioxidant enzymes, 0.2 g of whole plant fresh matter were macerated in liquid nitrogen and homogenized in 1.5 mL of extraction buffer. The homogenized solutions were centrifuged at 15,000 rpm for 10 minutes, at 4 °C, collecting the supernatant for the enzyme analyses of the superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPX) (Biemelt *et al* 1998).

Superoxide dismutase activity was determined by the enzyme's capacity in inhibiting the phytochemical reduction of the nitro blue tetrazolium (NBT), proposed by Giannopolitis & Ries (1977). The tubes containing the buffer along with the sample, as well as the control (same incubation medium without the sample), were illuminated with 20 W fluorescent light for seven minutes and the readings were performed at 560 nm. One unit of SOD was defined as the capacity of the enzyme to reduce 50 % of NBT.

Ascorbate peroxidase activity was determined by the decrease of ascorbate absorbance ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) at 290 nm every 15 seconds, during three minutes, according to Nakano & Asada (1981). In order to do this, an aliquot of 100 μL of the enzyme extract was added to 2000 μL of the incubation buffer. A unit of APX was defined by the amount of enzyme that oxidizes 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ of ascorbic acid.

Catalase activity was determined by the decrease of absorbance to 240 nm every 15 seconds, during three minutes, monitored by the consumption of hydrogen peroxide according to that described by Havir & Michale (1987). The reaction was initiated by the addition of H_2O_2 ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). One unit of CAT was defined by the amount of enzyme necessary to decompose 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ of H_2O_2 .

Guaiacol peroxidase activity was determined by accompanying the change in absorbance of 470 nm every ten seconds, during 0.5 minutes, caused by the reduction of the guaiacol ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) adapted by Urbanek *et al.* (1991). One unit of GPX was defined by the enzyme's capacity to oxidize 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ of guaiacol.

To determine the content of proline, we used the method described by Torello & Rice (1986), when the plants presented seven days of cultivation. For such, 0.1 g samples of whole plant fresh matter were homogenized with 10 mL of 3 % sulfosalicylic acid, vigorously agitated for one hour, filtered and centrifuged at 15,000 rpm for then minutes. After centrifuge, 2 mL of the supernatant was collected and added to 2 mL of acid ninhydrin and 2 mL of acetic acid. Posteriorly, they were heated at 100 °C for one hour and cooled in ice bath. The intensity of the color was measured at 520 nm in spectrophotometer (Halo SB-10 Dynamica) and the obtained absorbance were compared with the standard curve of proline. The results were expressed in μmol of proline per gram of fresh matter.

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was determined by means of quantifying the species reactive to thiobarbituric acid (TBA), according to Buege & Aust (1978). For such, 0.1 g of whole plants were macerated in liquid nitrogen, added of 20 % polyvinylpyrrolidone (m/v) and homogenized in 1.5 mL of 20 % trichloroacetic acid (TCA) (m/v). The homogenized solution was centrifuged at 15,000 rpm for ten minutes. Aliquots (0.75 mL) of the supernatant were added to 0.75 mL of TBA. Subsequently, the tubes were heated at 90 °C for 20 minutes. After heating, the tubes were rapidly cooled in ice bath and the readings determined in spectrophotometer (Halo SB-10 Dynamica), at 540 nm. The concentration of the malondialdehyde (MDA)/thiobarbituric acid (TBA) complex was calculated by the equation: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, in which: ξ (extinction coefficient = $1.56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (optic length = 1).

The statistical design used for the physiological parameters was completely randomized with five treatments and four replicates.

The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Scott-Knott test with 5 % of significance. The variables that did not meet the presuppositions of residue normality and/or homogeneity were submitted transformation by means of square root.

RESULTS AND DISCUSSION

The pH values found in the treatments ranged from 5.14 to 5.45, while the osmotic potential ranged from -0.001 to -0.002 MPa. According to Borella & Pastorini (2010), *L. sativa* tolerates pH values between 4 and 10. Gatti *et al.* (2004) and Gatti *et al.* (2014) highlight that solutions with osmotic potential of up to -0.2 MPa do not cause interference by

the treatments, not presenting significant difference between the copper concentrations tested and the control ($p>0.05$).

Letucce showed G % de 90 % e 95 % with 24 e 48 h of sowing, respectively. The analysis of variance showed no significant difference between the tested concentrations of copper ($p>0,05$). Salvatore *et al.* (2008) also did not verify influence of copper over germination of *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Raphanus sativus* and *Brassica oleracea*. This is probably because germination does not necessarily imply growth by cellular division, a phenomenon known to be inhibited by heavy metals (Liu *et al* 2003, Pereira *et al* 2013) that, however, can also be attributed to cellular elongation or stretching of the embryonic axis after soaking (Haber & Luippold 1960, Bewley & Black 1984, Chon *et al* 2004).

We observed significant difference between the treatments for RE ($p<0.001$) (Fig. 1A). The control differed from the remaining treatments, presenting higher RE, with 18.7 mm. The plants submitted to the concentrations of 50 and 100 μM , differed between each other and the remaining treatments, presenting lengthening of 11.9 and 1.3 mm, respectively. In addition, we observed apical necrosis of the roots in these concentrations, which might have influenced the absorption of water by the plants. This reveals that the initial growth of the plants is more sensitive than germination. Root elongation is a parameter widely used in metal toxicity tests (Voigt *et al* 2006, Kopittke *et al* 2011, Pereira *et al* 2013) and, in general, the roots are more affected by substances present in the environment than other plant structures, since this organ is responsible for absorbing the substances present in the environment (Turk & Tawaha 2002).

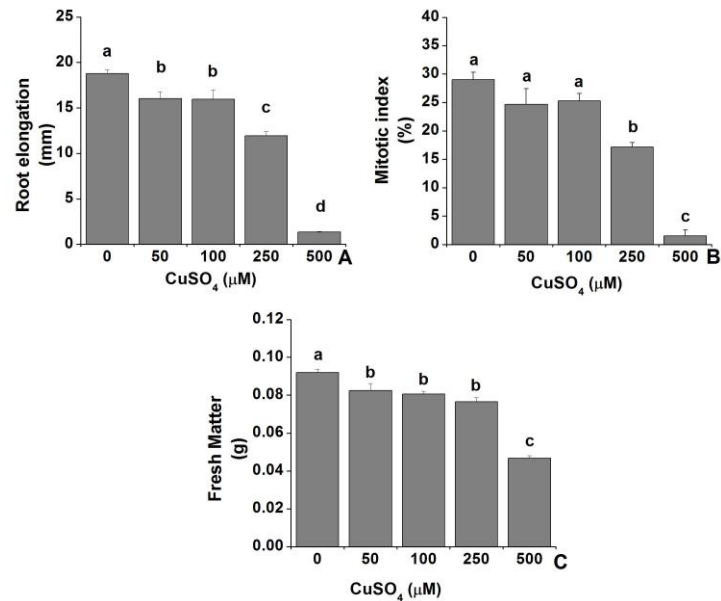


Figure 1. (A) Root Elongation (mm), (B) Mitotic Index (%) and (C) Fresh matter (g) of *Lactuca sativa* L. in relation to different concentrations of CuSO₄. Bar: standard error. Same letter do not differ by the Scott-Knott test at 5% significance level.

Studies conducted by Pasternak *et al.* (2005) and Potters *et al.* (2009) report the inhibition of root elongation in plants exposed to copper as a morphological response sensitive to the environmental stress caused by metals. Marschner (1995) reports that an immediate response to the exposure to elevated concentrations of copper consists in the inhibition of root growth as well as damages to cell membranes due to the increase of potassium efflux. In addition, the toxicity level can be based on the increase or decrease of the MI and, thus, can be used as cytotoxicity parameter (Fernandes *et al* 2007). Another consequence of copper toxicity, in addition to inhibiting cellular division, is the inducement of chromosomal abnormalities (Souguir *et al* 2008).

The root meristem of *L. sativa* exposed to distilled water presented MI of 29.01 % (Fig. 1B). The treatment with copper significantly reduced ($p < 0.05$) the MI at the concentrations of 250 (17.1 %) and 500 μM (1.5 %), respectively, differing between each other and from the remaining treatments. Therefore, we verified that the increase in the level

of copper promoted a concentration-dependent cytotoxic action on the meristematic cells of the test-organism root.

The reduction of MI indicates toxic effect of the copper, which can interfere on the normal development of mitosis, resulting on the inhibition of the number of cells that enter prophase and blocking mitosis during interphase (Rijstenbil & Poortvliet 1992). Studies conducted by Yildiz *et al.* (2009) with *Allium cepa* L. showed that copper induces the inhibition of root growth, indicating a delay in growth in a concentration dependent manner, with the value for effective concentration (EC₅₀) being approximately 1.5 mg/L, and reduction of the MI of around 64 % in relation to the control. In addition, we observed the presence of bridge type chromosomal abnormalities, stickyness, fragments, c-metaphase and multipolarity on anaphase-telophase cells after exposed for 4 d to the chemical solutions.

Pereira *et al.* (2013), working with *Lactuca sativa* L. exposed to lead, identified changes to the cellular cycle, as well as structural abnormalities in the chromosomal complement, being them both aneugenic and clastogenic after exposed for 24 h to the chemical solutions, same evaluation period of this study. This corroborates with the results observed for *Vicia faba* and *Pisum sativum*, on which the copper presented clastogenic and aneugenic effect over meristematic root cells, inducing the formation of micronuclei, thus, suggesting this metal acts as genotoxic agent (Souguir *et al* 2008). However, in the present study, there was no significant difference in the occurrence of CA, suggesting that, for the tested concentrations and conditions, copper does not present genotoxic effect. The observed CA possibility corresponding to a background.

For FM, there was difference between the treatments ($p < 0.05$) (Fig. 1C). However, for DM, there was no significant difference ($p < 0.05$). The non-significant loss of dry matter can be attributed to the expansin accumulation involved in cell wall plasticity influenced by the increase of copper concentration, making the most caliber roots. This explains the fact that

plants exposed to higher concentrations have the same dry mass equivalent to the control (Pena *et al* 2015). The concentrations 50, 100 and 250 μM of CuSO_4 were equal between each other and lower than the control for FM. On the concentration 500 μM , we verified the lowest FM. Kováčik *et al.* (2010) attribute the reduction of total biomass to the decrease of root growth of different plants exposed to copper, which corroborates with that exposed by Cambrollé *et al.* (2013), who reports that copper, in high concentrations, as any trace metal, can be translocated to the aerial part of the plant and interfere in many physiological processes. Ahsan *et al.* (2007) observed a significant reduction of biomass between the control and 500 μM of copper on rice seedlings, four days after germination. Studies conducted by Ali *et al.* (2000) and Iannacone *et al.* (2005) with *Allium cepa*, *Beta vulgaris*, *Oriza sativa* and *Raphanus sativus* identified influence of copper in the reduction of fresh and dry matter, inversely proportionate to its concentration.

For the content of proline, in *L. sativa* plants exposed to copper, the control presented 4.8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ of fresh matter and did not differ statistically from the concentrations 50 and 100 μM of CuSO_4 , which presented contents of 7.8 and 6.9 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh matter, respectively (Fig. 2). The concentration of 250 μM of CuSO_4 significantly differed from the remaining treatments, presenting 22.1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ of fresh matter. The highest content of proline was observed for the highest concentration of CuSO_4 (500 μM), presenting value of 33.86 $\mu\text{mol g}^{-1}$ of fresh matter. This reveals an increase of 250 % in the content of proline for the concentration of 250 μM of CuSO_4 and 590 % for the highest concentration tested (500 μM) when the plant was exposed to this metal.

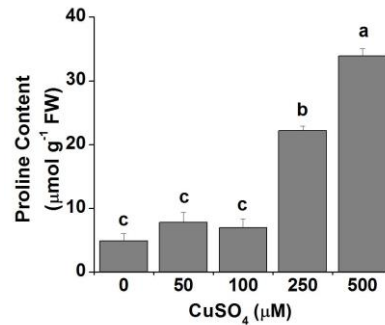


Figure 2. Content of *Lactuca sativa* L. proline exposed to different concentrations of CuSO₄. Bar: standard error. Same letter do not differ by the Scott-Knott test at 5% significance level.

The largest production of proline is directly correlated to oxidative stress caused by the accumulation of metal in plants (Kováčik *et al* 2009; Radič *et al* 2010). Therefore, due to its importance for osmotic adjustment, proline is the compound most studied for plants under abiotic stress (Kavi Kishor *et al* 2005). The presence of stress induces the synthesis of proline and inhibits its degradation, being that its concentration varies between plant species and depends on the level of stress to which they were exposed, being possible the accumulation of 100 times more than in normal conditions (Verbruggen & Hermans 2008). This amino acid is also capable of removing ROS, inhibiting lipid peroxidation of cellular membranes (Rajeb *et al* 2014).

The increase in the content of proline can be related to a response of the plant under stress to avoid the loss of water, since this amino acid presents acknowledged importance on the osmotic adjustment in plant cells (Delauney & Verma 1993). The osmotic adjustment allows water absorption, plant growth and the expansion of foliar turgidity during stress, associated with the partial opening of the stomata, allowing the assimilation of CO₂ (Alves & Setter 2004). However, high levels of proline in higher metal concentrations were not able to prevent mass loss, especially in the concentration of 500 µM CuSO₄.

The increase in the contents of proline can also activate many cellular functions such as carbon and nitrogen supply used during growth for reestablishment after stress (Kavikishor *et al* 2005). This explains the behavior of *L. sativa* DM, since there was no significant difference between treatments, even in the highest concentrations.

The results show that, in order to combat a possible oxidative stress caused by the elevation in the contents of copper, there was a significant increase in the activity of SOD in the manner that the highest concentrations (250 and 500 μM) presented the highest activities (Fig. 3). This response can be attributed to the accumulation of superoxide radicals (O_2^-) induced by copper allowing, according to Meng *et al.* (2007), the codification of genes for the synthesis of the enzyme. For catalyzing the dismutation of the superoxide anion, which is the first ROS formed, the SOD participates in the first line of defense against oxidative stress (Gill & Tuteja 2010). In addition, the removal of the superoxide radical to prevent the formation of hydroxyl radicals before their interaction with target molecules (Xu *et al* 2013). For enzymes APX, GPX and CAT, although presenting change, it was not significant.

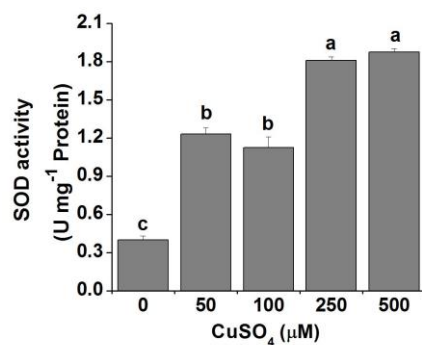


Figure 3. Activity of superoxide dismutase (SOD) in *Lactuca sativa* L. submitted different concentrations of CuSO_4 . Bar: standard error. Same letter do not differ by the Scott-Knott test at 5% significance level.

Olteanu *et al.* (2013) found high SOD activity and decrease in CAT in *Triticum aestivum* submitted to different sources of copper (citrate and acetate) for seven days suggesting that the SOD had primordial function in the prevention of oxidative stress. Therefore, although the CAT presents high specificity for H₂O₂, its affinity is lower than that of the APX (Meng *et al* 2007, Sharma *et al* 2012), being less efficient in removing the H₂O₂, which possibly explains its lower activity in relation to the APX. The decline in CAT, even if not significant, might be attributed to the modifications induced by copper in the assembly of the enzyme's subunits (Verma & Dubey 2003). In addition, it is known in literature that the CAT is sensitive to the stress caused by copper that, in low concentrations, might stimulate the activity of this enzyme, however, elevated concentrations can lock it (Srivastava *et al* 2006).

The accumulation of malondialdehyde is frequently used as indicator of damage to cellular wall (Bouazizi *et al* 2010, Sharma *et al* 2012, Shi-Sheng 2007), however, we did not observe significant difference on the level of lipid peroxidation between treatments. This can be attributed to the accumulation of proline and the activity of SOD (Figs. 2 and 3), acting, concomitantly, in the removal of ROS, thus, contributing for maintaining the integrity of the cellular membrane and of the remaining cellular components. These results diverge from those observed by Devi & Prasad (2005), who demonstrated that the accumulation of copper resulted in an increase of lipid peroxidation and changes in the activity of antioxidant enzymes in *Brassica juncea*.

CONCLUSIONS

The present results shows that concentrations above 250 µM of copper caused oxidative damage and resulted in the reduction of the mitotic index in the root tips that were responsible for root growth and fresh matter reduction. However was not observed clastogenic

effect. So, the copper can be considered phytotoxic and cytotoxic, but not genotoxic on the test conditions.

Lactuca sativa L. presented an efficient antioxidant system, initiated by the activity of SOD that, along with proline, guaranteed an effective removal of the ROS, not allowing significant damage to the lipid membranes.

ACKNOWLEDGMENTS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Grant AUX PE-PNPD-2297.2011).

REFERENCES

- AHSAN, N., LEE, D. G., LEE, S. H., KANG, K. Y., LEE, J. J., KIM, P. J., YOON, H. S., KIM, J. S. & LEE, B. H. 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*, 67(6): 1182-1193.
- ALI, N. A., ATER, M., SUNAHARA, G. I. & ROBIDOUX, P. Y. 2000. Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 363–374.
- ALVES, A. A. C. & SETTER, T. L. 2004. The Response of cassava leaf area expansion to water deficit: Cell proliferation, cell expansion, and delayed development. *Annals of Botany*, 94: 605-613.
- ARAÚJO, A. S. F. & MONTEIRO, R. T. R. 2005. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Scientia Agricola*, 62(3): 286-290.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. 1984. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2nd ed. New York: Plenum Press. 445p.

- BIEMELT, S., KEETMAN, U. & ALBRECHT, G. 1998. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiology*, 116(2): 651-658.
- BORELLA, J. & PASOTORINI, L. H. 2010. Efeito Alelopático de Umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. *Ciência & Agrotecnologia*, 34(5): 1129-1135.
- BOUAZIZI, H., JOULI, H., GEITMANN, A. & FERJANI, E. E. 2010. Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1304-1308.
- BUEGE, J. A. & AUST, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymology*, 52: 302-310.
- BURKHEAD, J. L., GOGOLIN REYNOLDS, K. A., ABDEL-GHANY, S. E., COHU, C. M. & PILON, M. 2009. Copper homeostasis. *New Phytologist*, 182 (4): 799-816.
- CAMBROLLÉ, J., GARCÍA, J. L., OCETE, R., FIGUEROA, M. E. & CANTOS, M. 2013. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. *Chemosphere*, 93(2): 294-301.
- CHON, S. U., COUTTS, J. H. & NELSON, C. J. 2004. Effects of light, growth media and seedling orientation on bioassays of alfalfa autotoxicity. *Agronomy Journal*, 92: 715-720.
- CHOUDHURY, S., PANDA, P., SAHOO, L. & PANDA, S. K. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signalling & Behavior*, 8(4): 681-686.
- CZERNIAWSKA-KUSZA, I. & KUSZA, G. 2011. The potential of the phytotoxkit microbiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 179: 113-121.
- DELAUNAY, A. J. & VERMA, D. P. S. 1993. Proline accumulation and osmoregulation in plants. *Plant Journal*, 4(2): 215-223.

- DEVI, S. R. & PRASAD, M. N. V. 2005. Antioxidant capacity of *Brassica juncea* plants exposed to elevated levels of copper. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52: 205-208.
- FERNANDES, T. C. C., MAZZEO, D. E. C. & MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 252–259.
- FIDALGO, F., AZENHA, M., SILVA, A. F., SOUSA, A., SANTIAGO, A., FERRAZ, P. & TEIXEIRA, J. 2013. Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses. *Food and Energy Security*, 2(1): 70–80.
- GATTI, A. B., PEREZ, S. C. J. G. & LIMA, M. I. S. 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanza* e *O. Kuntze* na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* e *Raphanus sativus* L. *Acta Botânica Brasilica*, 18(3): 459-472.
- GATTI, A. B., TAKAO, L. K., PEREIRA, V. C., FERREIRA, A. G., LIMA, M. I. S. & GUALTIERI, S. C. J. 2014. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. *Brazilian Journal Biology*, 74(3): 64-69.
- GIANNOPOLITIS, C. N. & RIES, S. K. 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59 (2): 309-314.
- GILL, S. S. & TUTEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
- HABER, A. H. & LUIPPOLD, H. J. 1960. Separation of mechanisms initiating cell division and cell expansion in Lettuce seed germination. *Plant Physiology*, 35 (2): 168–173.
- HAVIR, E. A. & MCHALE, N. A. 1987. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiology*, 84: 450-455.
- IANNACONE, Y. & ALVARIÑO, L. F. 2005. Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. *Agricultura Técnica*, 65(2): 198-203.

- KAVI, K., P. B., SANGAM, S., AMRUTHA, R. N., SRI LAXMI, P., NAIDU, K. R., RAO, K. R. S. S., RAO, S., REDDY, K. J., THERIAPPAN, P. & SREENIVASULU, N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88(3): 424-438.
- KIM, Y. H. & KWAK, S. S. 2010. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S. D. (Ed.). *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers. p. 129-150.
- KOPITTKE, P. M., BLAMEY, F. P. C., MCKENNA, B. A., WANG, P. & MENZIES, N. W. 2011. Toxicity of metals to roots of cowpea in relation to their binding strength. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(8): 1827-1833.
- KOVÁČIK, J., KLEJDUS, B., KADUKOV' A, J. & BAČKOR, M. 2009. Physiology of *Matricaria chamomilla* exposed to nickel excess. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 603–609.
- KOVÁČIK, J., GRÚZ, J., KLEJDUS, B., ŠTORK, F., MARCHIOSI, R. & FERRARESE-FILHO, O. 2010. Lignification and related parameters in copper-exposed *Matricaria chamomilla* roots: role of H₂O₂ and NO in this process. *Plant Science*, 179(4): 383–389.
- LIU, W. X., LI, X. D., SHEN, Z. G., WANG, D. C., WAI, O. W. H. & LI, Y. S. 2003. Multivariate statistical study of heavy metal enrichment in sediments of the Pearl River Estuary. *Environmental Pollution*, 121(3): 377-388.
- LIU, D., VADER, G., VROMANS, M. J., LAMPSON, M. A. & LENS, S. M. 2009. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of Aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science*, 323(5919): 1350-1353.
- MARSCHNER, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd ed. New York: Academic Press. 889 p.

- MENG, Q., ZOU, J., ZOU, J., JIANG, W. & LIU, D. 2007. Effect of Cu^{2+} concentration on growth, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 49: 95-101.
- NAKANO, Y. & ASADA, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
- OLTEANU, Z., TRUTA, E., OPRICA, L., ZAMFIRACHE, M. M., ROSU, C. M. & VOCHITA, G. 2013. Copper-induced changes in antioxidative response and soluble protein level in *Triticum aestivum* cv. Betiseedlings. *Romanian Agricultural Research*, 30: 163-170.
- PALÁCIO, S. M., NOGUEIRA, D. A., MANENTI, D. R., MÓDENES, A. N., QUIÑONES, F. R. E. & BORBA, F. H. 2012. Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por foto-fenton artificial utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *Artemia salina*. *Engevista*, 14(2): 127-134.
- PANDARD, P., DEVILLERS, J., CHARISSOU, A. M., POULSEN, V., JOURDAIN, M. J., FÉRARD, J. F., GRAND, C. & BISPO, A. 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of the Total Environment*, 363: 114-125.
- PASTERNAK, T., RUDAS, V., POTTERS, G. & JANSEN, M. A. K. 2005. Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 53: 299–314.
- PENA, L. B., MÉNDEZ, A. A. E., MATAYOSHI, C. L., ZAWOZNICK, M. S. & GALLEGO, S. M. 2015. Early response of wheat seminal roots growing under copper excess. *Plant Physiology and Biochemistry*, 87: 115-123.
- PEREIRA, M. P., PEREIRA, F. J., RODRIGUES, L. C. A., BARBOSA, S. & CASTRO, E. M. 2013. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agro@mbiente*, 7(1): 36-43.

- POTTERS, G., PASTERNAK, T. P., GUISEZ, Y. & JANSEN, M. A. K. 2009. Different stresses, similar morphogenetic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell & Environment*, 32: 158-169.
- RADIČ, S., BABIČ, M., SKOBIČ, D., ROJE, B. & PEVALEC-KOZLINA, B. 2010. Ecotoxicological effects of aluminum and zinco on growth and antioxidants in *Lemna minor* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173(3): 336-342.
- RAJEB, K. B., ABDELLY, C. & SAVOURÉ, A. 2014. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 278-284.
- RAVET, K. & PILON, M. 2013. Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(9): 919-932.
- RIBEIRO, L. O., BARBOSA, S., BALIEIRO, F. P., BEIJO, L. A., SANTOS, B. R., GOUVEA, C. M. C. P. & PAIVA, L. V. 2012. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringes* (Mart.) Coville] em bioensaio com Alface. *Revista Brasileira de Biociências*, 10(2): 220-225.
- RICE, E. L. 1984. *Allelopathy*. 2nd ed. London: Academic Press, 422p.
- RIJSTENBIL, J. W. & POORTVLIET, T. C. W. 1992. Copper and zinc in estuarine water: chemical speciation in relation to bioavailability to the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 1615–1625.
- RODRIGUES, L. C. A., BARBOSA, S., PAZIN, M., MASELLI, B. S., BEIJO, L. A. & KUMMROW, F. 2013. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17(10): 1099–1108.
- SALVATORE, M. D., CARAFA, A. M. & CARRATÙ, G. 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73: 1461–1464.

- SHARMA, P., JHA, A. B., DUBEY, R. S. & PESSARAKLI, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012: 1-26.
- SHI-SHENG, K. 2007. Effects of copper on the photosynthesis and oxidative metabolism of *Amaranthus tricolor* seedlings. *Agricultural Sciences in China*, 6(10): 1182-1192.
- SIMÕES, M. S., MADAIL, R. H., BARBOSA, S. & NOGUEIRA, M. L. 2013. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando Alface. *Biotemas*, 26(3): 29-36.
- SOUGUIR, D., FERJANI, E., LEDOIGT, G. & GOUPIL, P. 2008. Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity. *Protoplasma*, 233: 203-207.
- SRIVASTAVA, S., MISHRA, S., TRIPATHI, R. D., DWIVEDI, S. & GUPTA, D. K. Copper-induced stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.) Royle. *Aquatic Toxicology*, 80: 405-415.
- TORRELLI, W. A. & RICE, L. A. 1986. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. *Plant and Soil*, 93: 241-247.
- TURK, M. A. & TAWAHA, A. M. 2002. Inhibitory Effects of aqueous extracts of black mustard on germination and growth of lentil. *Pakistan Journal Agricultural Sciences*, 1(1): 28-29.
- URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E. & HERKA, K. 1991. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologiae Plantarum*, 13(1): 43-50.
- VERBRUGGEN, N. & HERMANS, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35(4): 753-759.
- VERMA, S. & DUBEY, R. S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164(3): 645-655.

VOIGT, A., HENDERSCHOT, W. H. & SUNAHARA, G. I. 2006. Rhizotoxicity of cadmium and copper in soil extracts. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 692–701.

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

YILDIZ, M., CIGERCI, H. I., KONUK, M., FIDAN, A. F. & TERZI, H. 2009. Determination of genotoxic effects of Cooper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, 75: 934-938.

YRUELA, I. 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36: 409-430.

ARTIGO II: Aspectos fisiológicos e efeito inibitório da proliferação celular em *Lactuca sativa* L. exposta ao peróxido de hidrogênio

AUTORES: Rodrigo Miranda Moraes, Plínio Rodrigues Santos Filho, Marília Carvalho, Marina de Lima Nogueira, Sandro Barbosa.

Artigo redigido conforme as normas da revista Biotemas

**Aspectos fisiológicos e efeito inibitório da proliferação celular em
Lactuca sativa L. exposta ao peróxido de hidrogênio**

Rodrigo Miranda Moraes¹

Sandro Barbosa^{1*}

Plínio Rodrigues Santos Filho²

Marília Carvalho¹

Marina de Lima Nogueira¹

¹Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade / Instituto de Ciências da Natureza / Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, Rua Gabriel Monteiro da Silva, nº 700, Centro, CEP 37130-000, Alfenas-MG, Brasil

²Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade / Instituto de Ciências Biomédicas / Departamento de Bioquímica / Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, Alfenas –MG, Brasil

* Autor para correspondência
sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br

Resumo

Este trabalho teve por objetivo estudar alguns aspectos da fisiologia e citologia de *Lactuca sativa* L. exposta ao H₂O₂. Foram avaliadas as características: percentual de germinação, comprimento de raiz, biomassas fresca e seca, índice mitótico, anormalidades cromossômicas, teor de prolina, atividade antioxidante enzimática e peroxidação lipídica. Para tal, sementes de Alface foram embebidas em solução de H₂O₂ em placas de Petri, nas concentrações 0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mM. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 e 3 repetições para os estudos fisiológicos e citológicos, respectivamente. Para germinação houve redução significativa nas concentrações acima de 5 mM de H₂O₂. O crescimento inicial das plântulas e a divisão das células meristemáticas foram influenciados negativamente e apresentaram comportamento concentração-dependente. Houve maior acúmulo de prolina nas concentrações 7,5 e 10 mM de H₂O₂ diferindo dos demais tratamentos. Houve atividade significativa das enzimas SOD e APX, o que não foi verificado para CAT, GPX e a peroxidação lipídica das membranas. *L. sativa* apresentou eficiente sistema antioxidante, iniciado pela SOD seguido pela APX, além da prolina, que podem ter contribuído para garantir a integridade das membranas celulares.

Palavras-chave: Atividade antioxidante enzimática; Espécies Reativas de Oxigênio; Fitotoxicidade

Alterações fisiológicas e citológicas em Alface exposta ao H₂O₂

Introdução

Diferentes estresses bióticos e abióticos levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em plantas. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e as demais ERO eram vistos unicamente como metabólitos tóxicos para a célula, porém, atualmente lhes são dadas a atribuição de moléculas sinalizadoras, dependendo da concentração. Assim, são benéficas em baixas concentrações, atuando como mensageiros secundários em uma cascata de sinalizações que mediam respostas nas plantas (SHARMA et al., 2012), e prejudiciais quando em excesso, provocando danos às biomoléculas (GECHEV; HILLE, 2005; QUAN et al., 2008).

O H_2O_2 é moderadamente reativo, possui uma longa meia-vida celular (1ms) e tem a capacidade de difundir-se livremente através das membranas (HENZLER; STEUDLE, 2000). Por ser uma das ERO mais estáveis, o H_2O_2 é um componente vital para o desenvolvimento, metabolismo e homeostase das plantas (BIENERT et al., 2006). Contudo, essa ERO em excesso pode inativar enzimas por oxidação e provocar danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (GILL; TUTEJA, 2010).

A elevação na concentração de H_2O_2 é percebida por fatores de transcrição sensíveis a modificações no estado redox da célula, iniciando então as cascatas de reações (SHULAEV et al., 2008). Desta forma, o H_2O_2 está envolvido na condutância estomática, tolerância à deficiência de oxigênio, fortalecimento da parede celular, senescência, fotossíntese, controle do ciclo celular, entre outras (GECHEV et al., 2006; PETROV; BREUSEGEM, 2012).

Para combater o estresse oxidativo, as plantas desenvolveram um complexo metabolismo antioxidante que inclui tanto atividades enzimáticas quanto não enzimáticas. A atividade coordenada desses antioxidantes regula a detoxificação e/ou eliminação das ERO e, conseqüentemente, reduz o dano oxidativo (CHOUDHURY et al., 2013). Assim, é importante notar que a função de sinalizador de estresse ou molécula prejudicial à célula depende de um equilíbrio entre a produção de ERO e a produção de substâncias antioxidantes (GRATÃO et al., 2005; GECHEV et al., 2006).

Com o intuito de conferir maior tolerância das plantas a estresses abióticos, muitos estudos têm sido realizados com a aplicação exógena de H_2O_2 estimulando a germinação, aumentando a biomassa fresca das plântulas, o comprimento das raízes e da parte aérea, além de um aumento dos transcritos de enzimas do sistema antioxidante e diminuindo a peroxidação lipídica (GAO et al., 2010).

Lactuca sativa L. é uma espécie amplamente utilizada como organismo-teste (RIBEIRO et al., 2012; GATI et al., 2014). Isto se deve a sua sensibilidade a agentes

químicos, rápida germinação devido a pouca reserva de energia, crescimento rápido e linear em ampla faixa de variação de pH e baixa sensibilidade aos potenciais osmóticos (ARAÚJO; MONTEIRO, 2005; GOMES et al., 2012). Sua utilização também se justifica pelo seu amplo cultivo no mundo todo e sua representatividade na alimentação humana.

Em testes de fitotoxicidade, comumente avalia-se a inibição do processo germinativo e o comprimento das raízes que ocorre na presença de diferentes concentrações do composto tóxico, tornando este organismo um indicador sensível aos efeitos biológicos de contaminantes (PALÁCIO et al., 2012; REIGOSA et al., 2013).

Diante da atuação do H_2O_2 no aumento da tolerância de espécies vegetais aos mais variados tipos de estresse e considerando-se a inexistência de estudos relacionando a aplicação deste composto em *L. sativa*, objetivou-se avaliar a fitotoxicidade do H_2O_2 sobre a germinação, crescimento inicial, ciclo celular e a atividade antioxidante enzimática utilizando esta espécie como organismo-teste.

Material e Métodos

Material vegetal, tratamentos e análise estatística

Sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids foram utilizadas nos experimentos como organismo-teste. Foi realizado um teste preliminar de fitotoxicidade para definição das concentrações de H_2O_2 . O delineamento foi inteiramente casualizado com seis tratamentos para todas as variáveis testadas e utilizadas 4 repetições com 30 sementes e 3 mL de solução nas variáveis percentual de germinação (G%), comprimento de raiz (CR), biomassas fresca (BF) e seca (BS). Para prolina, atividade antioxidante enzimática, peroxidação lipídica foram utilizadas 4 repetições com 50 sementes e 5 mL de solução por placa. E para os estudos citológicos: índice mitótico (IM) e ocorrência de anormalidades cromossômicas (AC) foram utilizados 3 repetições com 30 sementes, 3 mL de solução, e analisadas 4000 células por tratamento.

As sementes foram distribuídas aleatoriamente em placas de Petri sobre uma dupla camada de papel Whitmann nº 2, umedecidos com diferentes concentrações de H_2O_2 (1; 2,5; 5; 7,5 e 10 mM), sendo água destilada utilizada como controle negativo. As placas foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D., a 20°C e fotoperíodo de 12 horas (SIMÕES et al., 2013). Foram avaliados o pH e o potencial osmótico das soluções, usando

respectivamente, um pHmetro digital (TecnoPON mPA 210) e um osmômetro automático (Advanced Instruments - 3320 Micro-Osmometer).

Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi aferida pelo teste Scott-Knott com 5% de significância. As variáveis que não atenderam às pressuposições de normalidade e/ou homogeneidade dos resíduos, sofreram transformação por meio da raiz quadrada.

Avaliação de fitotoxicidade e citotoxicidade

O G% foi obtido pela contagem das sementes com protrusão da radícula, 24 e 48 horas após a embebição, (CURIEL; MORAES, 2011). O CR foi obtido a partir de dez raízes selecionadas aleatoriamente ao final do sétimo dia de cultivo. Em seguida essas plantas foram pesadas em balança analítica de precisão com 4 casas decimais para determinação da BF e colocadas em estufa com circulação de ar forçada (Nova Ética 400 ND) a 45°C por 48 horas para determinação da BS.

As preparações citológicas foram feitas pelo método de esmagamento 24 horas após a exposição a cada tratamento de acordo com Ribeiro et al. (2012). A determinação do IM e AC consistiu da contagem das células durante o ciclo celular de acordo com a equação proposta por Rodrigues et al. (2013).

Atividade antioxidante enzimática e teor de prolina

Para a extração das enzimas antioxidantes, 0,2 g de massa fresca de plântulas inteiras foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1,5 mL do tampão de extração. Os homogeneizados foram centrifugados a 15.000 rpm, por 10 minutos a 4°C, coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e peroxidase do guaiacol (GPX) (BIEMELT et al., 1998).

A atividade da SOD foi determinada pela capacidade da enzima inibir a redução fotoquímica do nitro blue tetrazolium (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). Os tubos contendo o tampão juntamente com a amostra, e o controle (mesmo meio de incubação sem a amostra), foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos e as leituras realizadas a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a capacidade da enzima reduzir 50% de NBT.

A atividade da APX foi determinada pela diminuição da absorvância do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 290 nm a cada 15 segundos durante 3 minutos, segundo Nakano e Asada (1981). Para tanto, uma alíquota de 100 μL do extrato enzimático foi adicionada a 2000 μL do tampão de incubação. Uma unidade de APX foi definida pela quantidade de enzima que oxida 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de ácido ascórbico.

A atividade da CAT foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, a cada 15 segundos durante 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio conforme descrito por Havir e Michale (1987). A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de CAT foi definida pela quantidade de enzima necessária para decompor 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 .

A atividade da GPX foi determinada através do acompanhamento da mudança de absorvância a 470 nm a cada 10 segundos durante 0,5 minutos, causada pela redução do guaiacol ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) adaptado de Urbanek et al. (1991). Uma unidade de GPX foi definida pela capacidade da enzima oxidar 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de guaiacol.

A determinação do conteúdo de prolina foi realizada quando as plântulas apresentavam 7 dias de cultivo conforme o método descrito por Torello e Rice (1986). Para tanto, amostras de 0,1 g de matéria fresca da plântula inteira foram homogeneizadas com 10 mL de ácido sulfossalicílico 3%, agitadas vigorosamente por 1 hora, filtradas e centrifugadas a 15.000 rpm, por 10 minutos. Após centrifugação, 2 mL do sobrenadante foi coletado e adicionados a 2 mL de ninidrina ácida e 2 mL de ácido acético. Posteriormente, foram aquecidos a 100°C por 1 hora e resfriados em banho de gelo. A intensidade da cor foi medida a 520 nm em espectrofotômetro (Halo SB-10 Dynamica) e as absorvâncias obtidas foram comparadas com a curva padrão de prolina. Os resultados foram expressos em μmol de prolina por grama de matéria fresca.

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme Buege e Aust (1978). Para tanto, 0,1 g de plântulas inteiras foram macerados em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 rpm, por 10 minutos. Alíquotas (0,75 mL) do sobrenadante foram adicionadas a 0,75 mL de TBA. Em seguida, os tubos foram fervidos a 90°C, por 20 minutos. Após a fervura, os tubos foram resfriados rapidamente em banho de gelo e as leituras

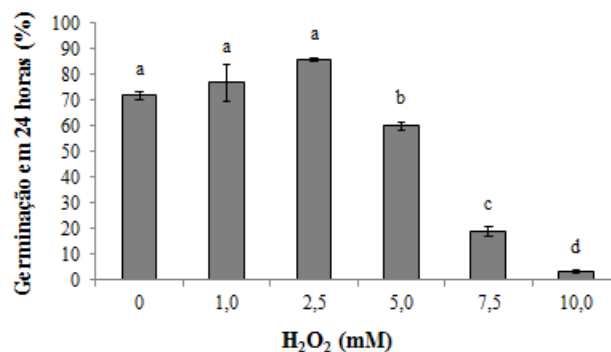
determinadas em espectrofotômetro (Halo SB-10 Dynamica), a 540 nm. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela equação: $[MDA] = (A535 - A600) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento óptico = 1).

Resultados e Discussão

Os valores de pH encontrados nos tratamentos foram em torno de 5,57 a 5,36 já o potencial osmótico foi de -0,09 a -1,30 MPa. *Lactuca sativa* L. tolera valores de pH entre 4 e 10 (BORELLA; PASTORINI, 2010). Gatti et al. (2014) destacam que soluções com potencial osmótico de até -0,2 MPa não geram interferência significativa em germinação e desenvolvimento inicial de Alface.

Com 24 horas, não houve diferença significativa para germinação entre e o controle e os tratamentos com 1 e 2,5 mM de H_2O_2 . Entretanto, os tratamentos com 5, 7,5 e 10 mM de H_2O_2 , diferiram entre si e dos demais tratamentos reduzindo suas médias de maneira concentração-dependente (Figura 1). Com 48 horas, todos os tratamentos apresentaram germinabilidade acima de 80%, não diferindo significativamente entre si, e dispensando assim a utilização de um controle positivo.

FIGURA 1: Percentual de germinação (G%) de *Lactuca sativa* L. em relação às concentrações de H_2O_2 . Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

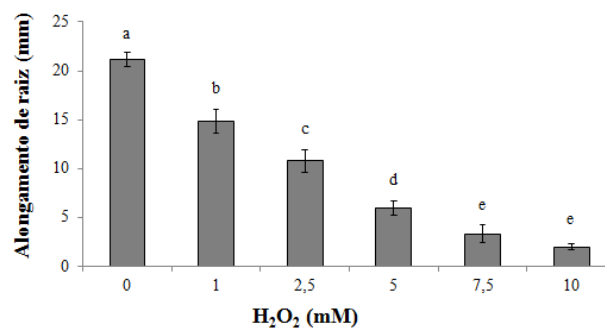


Embora o H_2O_2 tenha despertado especial interesse, devido a sua capacidade de promover a germinação em plantas (ISHIBASHI et al., 2013), no presente estudo, o H_2O_2 não promoveu a germinação. Resultados contrastantes foram observados em sementes de milho e

ervilha, em que o H_2O_2 acelerou a germinação e estimulou o início do crescimento das plântulas (BARBA-ESPIN et al., 2010; GONDIM et al., 2010).

O comprimento de raiz (CR) de Alface apresentou comportamento concentração-dependente (Figura 2). O tratamento controle apresentou as maiores médias de CR com 21,1 mm, diferindo dos demais tratamentos. Já as plântulas expostas aos tratamentos de 1, 2,5 e 5 de H_2O_2 , tiveram o CR reduzido significativamente, diferindo entre si e dos demais tratamentos com médias com 14,8; 10,7 e 5,9 mm, respectivamente. As maiores concentrações de H_2O_2 7,5 e 10 mM, apresentaram as menores médias e diferiram assim dos demais tratamentos com 3,3 e 2 mm, respectivamente.

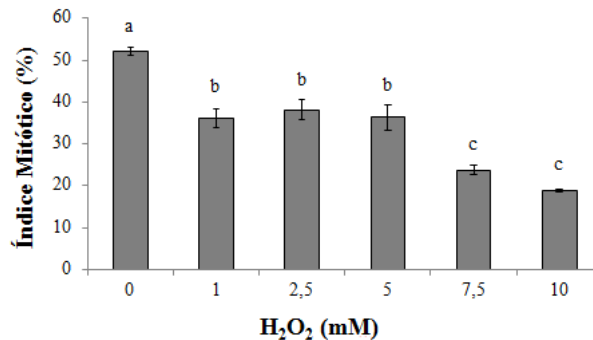
FIGURA 2: Comprimento de raiz (CR) de *Lactuca sativa* L. em relação às concentrações de H_2O_2 . Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.



O CR é um parâmetro amplamente utilizado em bioensaios de fitotoxicidade (RIBEIRO et al., 2013; SIMÕES et al., 2013). Essa redução no comprimento médio das raízes de Alface pode estar relacionada com a diminuição do percentual de células em divisão na região meristemática, uma vez que esta região é responsável pelo crescimento da raiz.

O tratamento com H_2O_2 diminuiu o índice mitótico (IM) de maneira concentração-dependente (Figura 3). O meristema radicular do organismo-teste exposto à água destilada apresentou maior IM com 52,07%. Nos tratamentos com 1, 2,5 e 5 mM de H_2O_2 , o IM foi de 36,1, 38,1 e 36,3% respectivamente, não diferindo entre si e diferindo dos demais tratamentos. Nas maiores concentrações de H_2O_2 7,5 e 10 mM, foi observado o menor o IM com 23,7 e 18,7% respectivamente, diferindo assim dos demais tratamentos.

FIGURA 3: Percentual de células em divisão de *Lactuca sativa* L., em relação às diferentes concentrações de H₂O₂. Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

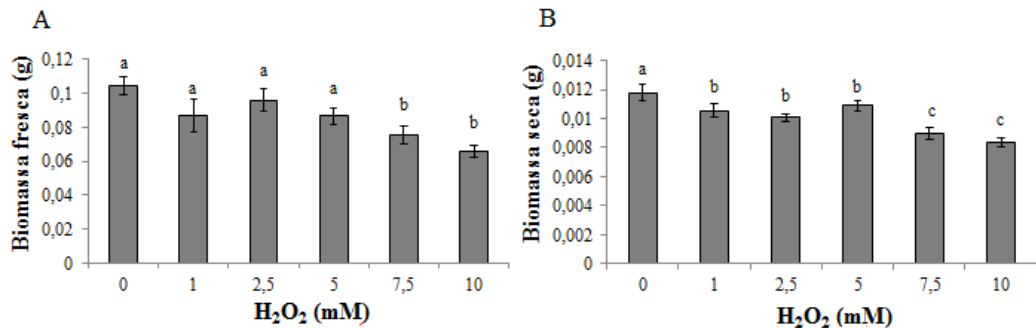


A redução do IM indica efeito tóxico do H₂O₂, resultando na inibição do número de células que entram na prófase e bloqueio da mitose durante a intérfase (RIJSTENBIL; POORTVLIET, 1992). Segundo Fernandes et al. (2007) o aumento ou decréscimo do IM pode ser utilizado como parâmetro de citotoxicidade. Assim, verificou-se que o aumento nos níveis de H₂O₂, promoveu uma ação citotóxica sobre as células meristemáticas das pontas de raízes de Alface que refletiu diretamente na redução do comprimento médio das raízes e na biomassa fresca e seca das plântulas.

Análises citogenéticas com detecção e quantificação de anormalidades cromossômicas (AC), têm sido amplamente empregadas para avaliar o potencial mutagênico de amostras ambientais (SILVA et al., 2003). Cromossomos quebrados, c-metáfases, pontes, retardatários, células binucleadas e células micronucleadas são as alterações cromossômicas frequentemente observadas (MATSUMOTO et al., 2006). No entanto, para este estudo, não houve diferença significativa na ocorrência de anormalidades cromossômicas, indicando que o H₂O₂ não apresenta potencial clastogênico.

Tanto a biomassa fresca (BF), quanto à biomassa seca (BS) das plântulas de Alface expostas ao H₂O₂, apresentaram comportamento concentração-dependente (Figura 4A). Para BF, o controle e os tratamentos com 1, 2,5 e 5 mM de H₂O₂ não diferiram entre si, entretanto diferiram dos demais tratamentos. As menores médias de BF foram observadas nas maiores concentrações 7,5 e 10 mM de H₂O₂, que não diferiram entre si, mas diferiram dos demais tratamentos (Figura 4). Este comportamento pode estar relacionado com a redução do comprimento médio das raízes, que por sua vez, tem correlação com a redução do IM.

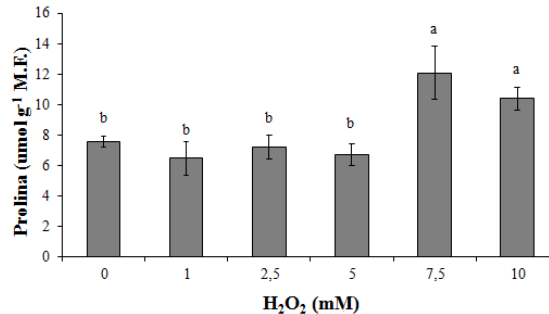
FIGURA 4: (A) Biomassa Fresca (BF) e (B) Biomassa Seca (BS) de *Lactuca sativa* L. em relação às concentrações de H₂O₂. Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.



Para BS, as maiores médias foram observadas no tratamento controle, que diferiu dos demais tratamentos (Figura 4B). Os tratamentos com 1, 2,5 e 5 mM de H₂O₂ não diferiram entre si, no entanto, diferiram dos demais tratamentos. As menores médias de BF foram observadas nas maiores concentrações de H₂O₂ 7,5 e 10 mM. Assim, a BS das plântulas foi mais afetada pelas diferentes concentrações de H₂O₂ do que a BF, mostrando-se mais sensível. Este comportamento pode ser atribuído ao fechamento estomático promovido pela sinalização do H₂O₂, resultando em uma menor fixação de carbono e menor produção de biomassa seca da planta (GONÇALVES et al., 2013). Resultados contrastantes foram encontrados por Gondim et al. (2011) e Li et al. (2011), trabalhando com milho e trigo, respectivamente, onde verificaram que o pré-tratamento com H₂O₂ impediu o declínio na BS dessas plantas sob estresse salino.

Para o teor de prolina, os tratamentos controle, 1, 2,5 e 5 mM de H₂O₂ não diferiram entre si, entretanto diferiram dos demais tratamentos. O maior teor de prolina foi observado nos tratamentos com maiores concentrações 7,5 e 10 mM de H₂O₂ (Figura 5). Isto corrobora o fato de que a presença do estresse induz a síntese deste aminoácido e inibe a sua degradação, sendo que a concentração de prolina varia entre as espécies vegetais e depende do nível do estresse ao qual foram expostas. Isto também está correlacionado com a ação protetora da prolina, ou um papel regulador na homeostase celular em células vegetais submetidas a estresses, funcionando como um mecanismo de ajuste osmótico (DELAUNEY; VERMA, 1993).

FIGURA 5: Teor de prolina de *Lactuca sativa* L. exposta à diferentes concentrações de H₂O₂. Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

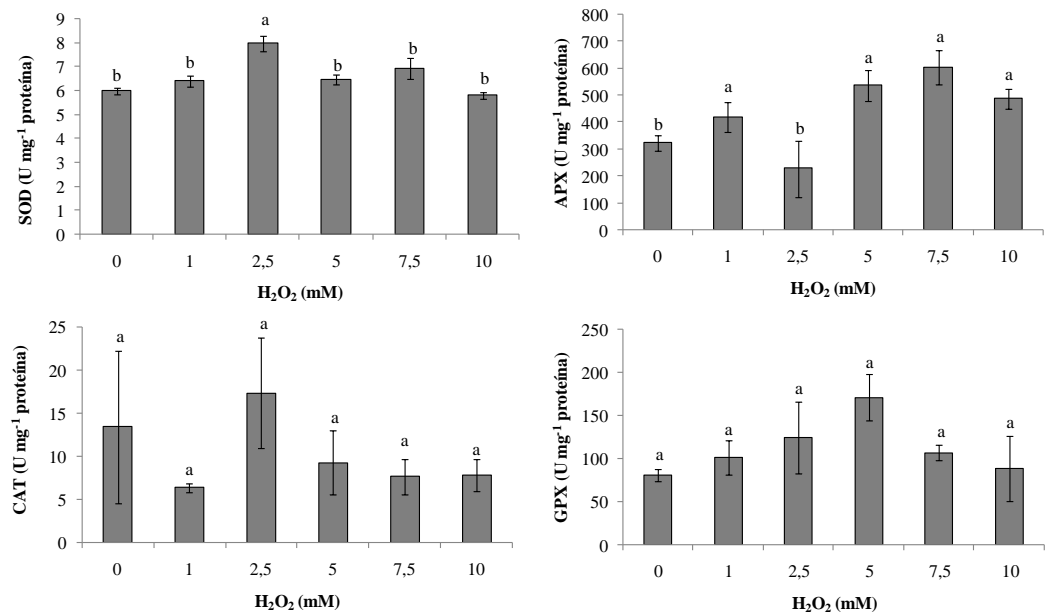


Este aumento no teor de prolina nas maiores concentrações pode estar relacionado com sua função osmorreguladora, e uma tentativa de proteger a plântula do estresse hídrico. Isto se justifica através do comportamento concentração-dependente da BF de *Lactuca sativa* L. exposta ao H₂O₂, que foi menos sensível que a BS (Figura 4).

Este aminoácido também é capaz de remover ERO (SHARMA; DIETZ, 2006), inibindo a peroxidação lipídica das membranas celulares (RAJEB et al., 2014).

Houve atividade antioxidante das enzimas SOD e APX, enquanto que a CAT e GPX não apresentaram atividade significativa (Figura 6). A variação na atividade das enzimas antioxidantes faz parte das respostas das plantas ao estresse biótico e abiótico, estando envolvidas nos processos que permitem aumentar a sobrevivência durante o crescimento inicial, frente às mudanças ambientais (DELIAS, 2013).

FIGURA 6: Atividade da superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), ascorbato peroxidase (APX) (C) e guaiacol peroxidase (GPX) (D) em plantas de *Lactuca sativa* L. submetidas à diferentes concentrações de H_2O_2 . Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.



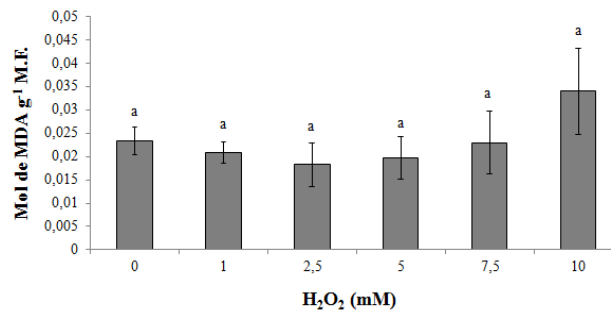
Entre as várias enzimas envolvidas na eliminação das ERO, a SOD pode ser considerada uma enzima chave, sendo, geralmente, a primeira linha de defesa ao estresse oxidativo (AMADOR et al., 2012). A CAT, embora tenha uma alta especificidade pelo H_2O_2 , sua afinidade é menor que a da APX (MENG et al., 2007; SHARMA et al., 2012), sendo menos eficiente em remover o H_2O_2 . A APX apresenta alta afinidade e atua quando o H_2O_2 está presente em baixas concentrações, já a CAT, por outro lado, tem comportamento inverso (GILL; TUTEJA, 2010).

Embora o acúmulo de H_2O_2 causar a peroxidação de membranas celulares, prejudicando a sua função e integridade, e provocando danos frequentemente irreversíveis para o funcionamento da célula (DEUNER et al., 2011) e os níveis de malondialdeído sejam utilizados como indicador de danos à membrana celular (MITTLER, 2002; SHARMA et al., 2012; ALVES et al., 2013), no presente estudo, não foi observada peroxidação lipídica significativa entre os tratamentos (Figura 7).

Resultados semelhantes foram encontrados em *Cucumis sativus* cv Lvfeng, em que a pulverização com H_2O_2 contribuiu para o aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante, diminuindo a peroxidação lipídica e protegendo a ultraestrutura dos cloroplastos (GAO et al., 2010).

Mittler (2002) sugeriu que altos níveis de H_2O_2 podem causar danos às membranas, pois esta ERO pode acelerar a reação de Haber-Weis, resultando na formação do radical hidroxila e em peroxidação lipídica.

FIGURA 7: Peroxidação lipídica em *Lactuca sativa* L. exposta à diferentes concentrações de H_2O_2 . Barra: erro padrão.



Finalmente, para G% houve redução significativa nas concentrações acima de 5 mM de H_2O_2 . O crescimento inicial das plântulas e a divisão das células meristemáticas foram influenciados negativamente e apresentaram comportamento concentração-dependente.

Houve maior acúmulo de prolina nas concentrações 7,5 e 10 mM de H_2O_2 diferindo dos demais tratamentos. A CAT, GPX e a peroxidação lipídica das membranas não apresentaram atividade significativa. *Lactuca sativa* apresentou eficiente sistema antioxidante, iniciado pela SOD seguido pela APX, além da prolina, que podem estar contribuindo para garantir a integridade das membranas celulares.

Referências

ALVES, J. D.; ZANANDREA, I.; DEUNER, S.; GOULART, P. F. P.; DE SOUZA, K. R. D.; SANTOS, M. O. Antioxidative responses and morpho-anatomical adaptations to waterlogging in *Sesbania virgate*. **Trees**, Germany, v. 27, n. 3, p. 717-728, 2013.

AMADOR, M. L.; SANCHO, S.; BIELSA, B.; GOMES-APARISI, J.; RUBIO-CUBETAS, M. J. Physiological and biochemical parameters controlling waterlogging stress tolerance in *Prunus* before and after drainage. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 144, p. 357-368, 2012.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 286-290, 2005.

BARBA-ESPIN, G.; DIAZ-VIVANCOS, P.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; ALBACETE, A.; FAIZE, L.; FAIZE, M.; PÉREZ-ALFOCEA, F.; HERNÁNDEZ, J. A. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. **Plant Cell and Environment**, Malden, v. 33, n. 6, p. 981-994, 2010.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Washington, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.

BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1758, n. 8, p. 994-1003, 2006.

BORELLA, J.; PASOTORINI, L. H. Efeito Alelopático de Umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1129-1135, 2010.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Methods Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.

CHOUDHURY, S.; PANDA, P.; SAHOO, L.; PANDA, S. K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, p. 681, 2013.

CURIEL, A. C.; MORAES, C. P. Germinação de *Ormosia arborea* (Vell.) Harms submetida a diferentes períodos de exposição e concentração de GA₃ pós escarificação mecânica. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 7, n. 12, p. 1-6, 2011.

DELAUNAY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline accumulation and osmoregulation in plants. **Plant Journal**, Malden, v. 4, n. 2, p. 215-223, 1993.

DELIAS, D. S. **Características biométricas, trocas gasosas e atividade do sistema antioxidante de plantas de Eucalipto durante o crescimento inicial**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2013.

DEUNER, S.; ALVES, J. D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A. A.; GOULART, P. F. P.; SILVEIRA, N. M.; HENRIQUE, P. C.; MESQUITA, A. C. Stomatal behavior and components of the antioxidative system in coffee plants under water stress. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 77-85, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 88, p. 252–259, 2007.

GAO, Y. GUO, Y. K.; LIN, S. H.; FANG, Y. Y.; BAI, J. G. Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 126, p. 20-26, 2010.

GATTI, A.B., TAKAO, L.K., PEREIRA, V.C., FERREIRA, A.G., LIMA, M.I.S. & GUALTIERI, S.C.J. 2014. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. **Brazilian Journal Biology**, v. 74, n. 3, p. 64-69.

GECHEV, T. S.; VAN BREUSEGEM, F.; STONE, J. M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, Malden, v. 28, p. 1091-1101, 2006.

GECHEV, T. S.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 168, p. 17-20, 2005.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

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

GOMES, L. S.; SILVA, F. A.; BARBOSA, S.; KUMMROW, F. Ecotoxicity of Sludges Generated by Textile Industries: A review. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v. 7, p. 89-96, 2012.

GONÇALVES, J. F. C.; MELO, E. G. F.; FERREIRA, M. J.; SILVA, C. E. M.; GOMES, I. B. Crescimento, partição de biomassa e fotossíntese em plantas jovens de *Genipa spruceana* submetidas ao alagamento. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 2, p. 193-200, 2013.

GONDIM, F. A.; GOMES-FILHO, E.; MARQUES, E. C.; PRISCO, J. T. Efeitos do H₂O₂ no crescimento e acúmulo de solutos em plantas de milho sob estresse salino. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 371-381, 2011.

GONDIM, F. A.; GOMES FILHO, E.; LACERDA, C. F.; PRISCO, J. T.; AZEVEDO NETO, A. D.; MARQUES, E. C. Pretreatment with H₂O₂ in maize seeds: Effects on germination and seedling acclimation to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, São Paulo, v. 22, p. 103-112, 2010.

GRATÃO, P. L. ; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Australia, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

HAVIR, E. A. & MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**. v. 84, p. 450-455, 1987.

HENZLER, T.; STEUDEL, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 353, p. 2053-2066, 2000.

ISHIBASHI, Y.; KODA, Y.; ZHENG, S. H.; YUASA, T.; IWAYA-INOUE, M. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species. **Annals of Botany**, Oxford, v. 111, n. 1, p. 95-102, 2013.

LI, C.; JIANG, D.; WOLLENWEBER, B.; LI, Y.; DAI, T.; CAO, W. Waterlogging pretreatment during vegetative growth improves tolerance to waterlogging after anthesis in wheat. **Plant Science**, Limerick, v. 180, n. 5, p. 672-678, 2011.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MENG, Q.; ZOU, J.; ZOU, J.; JIANG, W.; LIU, D. Effect of Cu²⁺ concentration on growth, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in garlic (*Allium sativum* L.). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Cracow, v. 49, p. 95-101, 2007.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

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

PALÁCIO, S. M.; NOGUEIRA, D. A.; MANENTI, D. R.; MÓDENES, A. N.; QUIÑONES, F. R. E.; BORBA, F. H. Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por foto-fenton artificial utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *Artemia salina*. **Engevista**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 2, p. 127-134, 2012.

PETROV, V. D.; BREUSEGEM, F. V. Hydrogen peroxide: a central hub for information flow in plant cells. **AoB Plants**, Oxford, v. 2012, p. 1-13, 2012.

QUAN, L. J.; ZHANG, B.; SHI, W. W.; LI, H. Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, Malden, v. 50, p. 2-18, 2008.

RAJEB, K. B.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 80, p. 278-284, 2014.

REIGOSA, M.; GOMES, A. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botânica Brasilica**, Feira de Santana, v. 27, p. 629-646, 2013.

RIBEIRO, L. O.; BARBOSA, S.; BALIEIRO, F. P.; BEIJO, L. A.; SANTOS, B. R.; GOUVEA, C. M. C. P.; PAIVA, L. V. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringes* (Mart.) Coville] em bioensaio com Alface. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 220-225, 2012.

RIJSTENBIL, J. W.; POORTVLIET, T. C. W. Copper and zinc in estuarine water: chemical speciation in relation to bioavailability to the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Malden, v. 11, p. 1615–1625, 1992.

RODRIGUES, L. C. A.; BARBOSA, S.; PAZIN, M.; MASELLI, B. S.; BEIJO, L. A.; KUMMROW, F. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 10, p. 1099–1108, 2013.

SHARMA, S. S., DIETZ, K. J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 4, 711-726, 2006.

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**, New York, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiology Plantarum**, Malden, v. 132, p. 199-208, 2008.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422 p.

SIMÕES, M. S.; MADAIL, R. H.; BARBOSA, S.; NOGUEIRA, M. L. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando Alface. **Biotemas**, Florianópolis, v. 26, n. 3, p. 29-36, 2013.

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

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Germany, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

ARTIGO III: Efeito protetor do óxido nítrico sobre a fitotoxicidade do cobre em *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE).

AUTORES: Rodrigo Miranda Moraes, Plinio Rodrigues Santos Filho, Marília Carvalho, Marina de Lima Nogueira, Sandro Barbosa.

Artigo redigido conforme as normas da revista Bioscience Journal

Efeito protetor do óxido nítrico sobre a fitotoxicidade do cobre em *Lactuca sativa* L. (Asteraceae).

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito protetor do óxido nítrico (NO) sobre a germinação, crescimento inicial, ciclo celular e o conteúdo de prolina de *Lactuca sativa* L. exposta ao cobre (CuSO₄). O efeito protetor do NO foi verificado pela utilização de nitroprussiato de sódio (SNP) como doador de NO. Para tanto, sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids foram expostas a diferentes concentrações do agente toxicante CuSO₄ (250 e 500 µM) do agente protetor NO (100, 250 e 500 µM) isoladamente e da combinação dos dois, sendo água destilada utilizada como controle negativo. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Não houve diferença significativa no percentual de germinação das sementes com 48 horas em nenhum dos tratamentos. Para o comprimento de raiz, o controle não diferiu significativamente do tratamento com 100 µM de SNP, entretanto os tratamentos com 250 e 500 µM de SNP, diferiram entre si e dos demais tratamentos e reduziram o comprimento radicular de maneira concentração-dependente. Os tratamentos com CuSO₄ foram fitotóxicos influenciando o crescimento das raízes, possivelmente devido à diminuição do índice mitótico (IM). Já a combinação do SNP com o cobre impediu o efeito fitotóxico desse metal nas maiores concentrações. A exposição ao cobre reduziu o IM de maneira concentração-dependente. O organismo-teste exposto à água destilada apresentou IM de 26,24% enquanto nos tratamentos com cobre, o IM foi de 1,36% e 1,18% para as concentrações de 250 e 500 µM, respectivamente. Para biomassa fresca houve diferença significativa entre os tratamentos, entretanto, para biomassa seca não houve diferença. Os tratamentos com 250 e 500 µM de cobre reduziram o acúmulo de biomassa nas plântulas. Já o SNP não apresentou efeito sobre o acúmulo de biomassa isoladamente, mas foi eficiente em atenuar os efeitos tóxicos do cobre. Não houve deficiência no acúmulo de biomassa quando o SNP nas concentrações de 250 e 500 µM foi combinado com 250 µM de cobre. Já para a maior concentração de cobre (500 µM) houve efeito protetor de toxicidade apenas quando o SNP foi usado na concentração de 500 µM. Com relação ao teor de prolina, houve aumento na concentração desse aminoácido nos tratamentos com 250 e 500 µM de CuSO₄. Concluímos que o cobre alterou a divisão celular influenciando diretamente na redução do comprimento de raiz e no incremento da biomassa fresca das plântulas de *Lactuca sativa*. No entanto, não influenciou na germinação e na biomassa seca total. Já a aplicação exógena de NO (na forma de SNP) foi capaz de reduzir os efeitos deletérios do cobre restaurando o crescimento das raízes pela recuperação da divisão celular, refletindo diretamente no incremento de biomassa.

Palavras chave: Citotoxicidade; Metais-traço; Espécie Reativa de Nitrogênio; Metabolismo.

INTRODUÇÃO

O cobre (Cu), em baixas concentrações, pode ser considerado micronutriente essencial para as plantas, no entanto, é fitotóxico em concentrações elevadas (HATTAB et al., 2009; LI et al., 2009), podendo provocar estresse oxidativo devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) altamente tóxicas (APEL & HIRT, 2004; FOYER & NOCTOR, 2005; ARASIMOWICZ & FLORISZAK-WIECZOREK, 2007; GILL & TUTEJA, 2010; FOYER & SHIGEOKA, 2011).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula postulada como composto que age contra vários tipos de estresses, incluindo estresse oxidativo induzido por metais pesados, principalmente através da modulação das enzimas do metabolismo antioxidante, ou pela eliminação direta de ERO (BELIGNI & LAMATTINA, 2001; HUANG et al., 2002; KOPYRA & GWO'Z'DZ', 2003; ROMERO-PUERTAS et al., 2004; ZHAO et al., 2004; LASPINA et al., 2005). Este gás é altamente difusível e transpõe rapidamente a membrana celular (STEFANO et al., 2006; CRAWFORD, 2006). Assim, por possuir uma meia vida celular curta (aproximadamente 3 segundos) na presença de O₂ e apresentar alta reatividade, a maioria das pesquisas com NO em organismos vivos envolve a aplicação de doadores de NO (TOSSI et al., 2009). O doador de NO mais utilizado é o nitroprussiato de sódio (SNP), que é fotossensível e sua degradação ocorre por reação com oxigênio e variações de temperatura (TOSSI et al., 2009).

O NO foi descrito primeiramente como um composto tóxico, mas, atualmente é reconhecido como importante sinalizador na fisiologia celular de animais e plantas (GARCÍA-MATA & LAMATTINA, 2002; PAGNUSSAT et al., 2002). Em muitas plantas, o NO está intimamente relacionado com a fisiologia do crescimento e desenvolvimento, defesa celular contra patógenos (DURNER et al., 1998; STEFANO et al., 2006; ZAGO et al., 2006), e em resposta a sinais ambientais que afetam a fotomorfogênese, a expansão foliar, o crescimento da raiz, indução da apoptose (NEILL et al., 2003) ou senescência, entre outros (EDERLI et al., 2009).

Tanto NO quanto ERO são componentes de um sistema de defesa altamente integrado que envolve a ativação do fluxo de íons, mudança no padrão de fosforilação de proteínas, no pH extracelular, no potencial de membrana, na oxidação de proteínas da parede celular e alterações nos níveis de cálcio (Ca²⁺) que desencadeiam a expressão local de genes de resistência (STEFANO et al., 2006). Isso indica que NO e ERO exercem um papel chave na regulação da resposta das plantas a contaminantes ambientais (ZAGO et al., 2006). É

importante salientar que a interação entre ERO e NO pode ser citotóxica dependendo da concentração (INNOCENTI et al., 2007).

Neste contexto, o NO age como molécula sinalizadora, uma vez que pode ativar uma sequência de eventos metabólicos acionando respostas de defesa celular (ARASIMOWICZ & FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007). No entanto, pode gerar ERN altamente tóxicas, que compreendem o próprio NO e outras moléculas como peroxinitrito (ONOO⁻), S-nitrotióis (RSNOs) e a S-nitrosoglutationa (GSNO). Estas ERN também funcionam como sinalizadores em resposta a estresse, podendo regular muitas funções biológicas pela reação com moléculas celulares, incluindo proteínas, vitamina E, e ácidos nucleicos (TOSSI et al., 2011). Dessa maneira, o NO não é apenas uma molécula de sinalização de estresse, mas também pode agir como um sinal intrínseco no crescimento e desenvolvimento da planta (ARASIMOWICZ & FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007). Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito protetor do NO sobre a germinação, crescimento inicial, ciclo celular e conteúdo de prolina em Alface exposta ao cobre.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids foram utilizadas como organismo-teste nos experimentos. As variáveis avaliadas foram o percentual de germinação (G%), comprimento de raiz (CR), biomassas fresca (BF) e seca (BS), índice mitótico (IM) e o teor de prolina. Para tanto, sementes foram distribuídas aleatoriamente em placas de Petri forradas com dupla camada de papel germintest umedecidos com os tratamentos. Sulfato de cobre CuSO₄ foi utilizado como agente toxicante e o efeito protetor do NO foi verificado pela combinação de CuSO₄ (250 e 500 µM) com nitroprussiato de sódio (SNP) como doador de NO (100, 250 e 500 µM), sendo água destilada o controle negativo. Também foi verificada a toxicidade do CuSO₄ e do SNP isoladamente e combinados. As placas foram mantidas em câmaras de germinação tipo B.O.D. a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Tanto o pH, quanto o potencial osmótico das soluções, foram avaliados usando, respectivamente, pHmetro digital (Tecnopon mPA 210) e osmômetro automático (Advanced Instruments - 3320 Micro-Osmometer).

O G% foi obtido pela contagem das cipselas com protrusão da radícula 24 e 48 horas após a embebição, (CURIEL & MORAES, 2011). O CR foi obtido pela medida de dez raízes selecionadas aleatoriamente ao final do sétimo dia de cultivo. Em seguida essas plantas foram pesadas em balança analítica de precisão (Marte, Modelo AY 220), para determinação da BF e

colocadas em estufa com circulação de ar forçada (Nova Ética 400 ND) a 45°C até atingir peso constante para determinação da biomassa seca.

Para determinação do IM, pontas de raízes de *Lactuca sativa* foram obtidas 24 horas após a exposição a cada tratamento. As raízes foram fixadas em solução de Carnoy, hidrolisadas em HCl 5M à 25°C e coradas com reativo de Schiff. As preparações citogenéticas foram feitas de acordo com Pereira et al. (2013).

Para determinação do conteúdo de prolina, foi utilizado o método descrito por Torello & Rice (1986), quando as plântulas apresentavam 7 dias de cultivo. Para tanto, amostras de 0,1 g de plântulas inteiras foram homogeneizadas em 10 mL de ácido sulfossalicílico 3% e mantidas sob agitação vigorosa por 1 hora. Em seguida foram filtradas e centrifugadas a 15.000 rpm, por 10 minutos. Após centrifugação, 2 mL do sobrenadante foram coletados e adicionados a uma solução contendo 2 mL de ninidrina ácida e 2 mL de ácido acético. Posteriormente, foram aquecidos a 100° C por 1 hora e resfriadas em banho de gelo. A absorbância foi medida a 520 nm. As absorbâncias obtidas foram comparadas à curva padrão de prolina. Os resultados foram expressos em μmol de prolina por grama de matéria fresca.

O delineamento foi inteiramente casualizado com 12 tratamentos e quatro repetições por tratamento sendo utilizadas 30 cipselas e 3 mL de solução nas variáveis G%, CR, IM, BF e BS. Para quantificar o IM, foram analisadas 6000 células por tratamento (SIMÕES et al., 2013). Para avaliar o teor de prolina foram utilizadas 4 repetições com 50 sementes e 5 mL de solução por placa. As variáveis foram baseadas nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009).

Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias foi aferida pelo teste Scott-Knott com 5% de significância. As variáveis que não atenderam às pressuposições de normalidade e/ou homogeneidade dos resíduos, sofreram transformação por meio da raiz quadrada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de pH encontrados nos tratamentos foram em torno de 5,05 a 5,87 já o potencial osmótico foi de -0,001 a -0,002 MPa. Segundo Borella & Pastorini (2010), a Alface tolera valores de pH entre 4 e 10. Gatti et al. (2014) destacam que soluções com potencial osmótico de até -0,2 MPa não geram interferência significativa em germinação e desenvolvimento inicial de Alface.

Não houve diferença significativa no G% das sementes em nenhum dos tratamentos. Após 48 horas todos os tratamentos apresentaram germinação acima de 80% (Figura 1 A). Para o comprimento de raiz, o controle não diferiu significativamente do tratamento com 100 μM de SNP, entretanto os tratamentos com 250 e 500 μM de SNP diferiram entre si e dos demais tratamentos, e provocaram diminuição da raiz de maneira concentração-dependente (Figura 1 B). Os tratamentos com CuSO_4 foram fortemente fitotóxicos impedindo o crescimento das raízes, provavelmente devido a diminuição no índice mitótico. Já a combinação do SNP com o cobre impediu o efeito fitotóxico desse metal nas maiores concentrações. O óxido nítrico é um radical envolvido no crescimento da raiz como demonstraram Pagnussat et al., (2002) e Gouvêa et al., (1997). Entretanto, nas condições controle e em baixas concentrações de SNP não houve estímulo de crescimento das raízes, pelo contrário, as concentrações de 250 e 500 μM foram fitotóxicas. As ações do NO nas plantas dependem da homeostase desse radical, de forma que tanto a falta quanto o excesso podem ser prejudiciais. Doses crescentes de SNP a 250 e 500 μM possivelmente foram excessivas tornando-se tóxicas. Já em combinação com cobre, o NO agiu atenuando os efeitos fitotóxicos sobre o comprimento das raízes (Figura 1 B). Petó et al., (2011), verificaram menor comprimento de raiz em *Arabidopsis* tanto em mutantes com menor produção endógena de NO, quanto naqueles com maior produção desse radical. Esses mesmos autores relatam que na planta selvagem a exposição ao cobre causou danos morfológicos à raiz e parte da resposta da planta envolveu aumento na produção de NO.

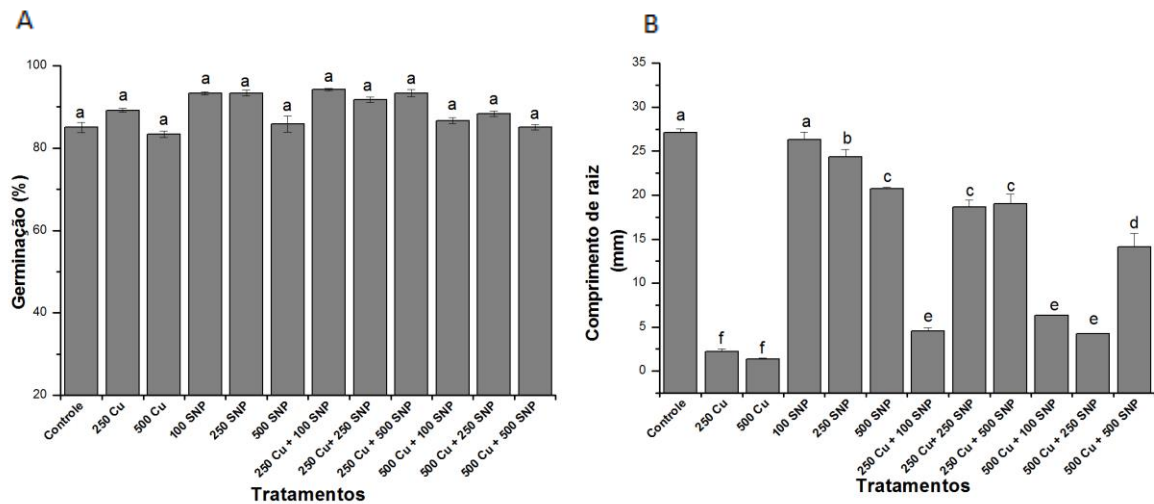


Figura 1. (A) Percentual de germinação (G%) e (B) Comprimento de raiz (AR) de *Lactuca sativa* L. em relação aos tratamentos com CuSO_4 (μM) e nitroprussiato de sódio (SNP, μM). Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Como esperado, a exposição ao cobre diminuiu o índice mitótico (IM) de maneira concentração- dependente. O organismo-teste exposto à água destilada apresentou IM de 26,24% enquanto nos tratamentos envolvendo o cobre, o IM foi de 1,36 e 1,18% para as concentrações de 250 e 500 μM respectivamente (Figura 2).

A redução do IM indica que esse metal interferiu no desenvolvimento normal da mitose, causando bloqueio do ciclo celular na intérfase e/ou impedindo a progressão das células que entraram na divisão celular (RIJSTENBIL & POORTVLIET, 1992). O aumento ou decréscimo do índice mitótico pode, assim, ser utilizado como parâmetro de citotoxicidade para o cobre (FERNANDES et al., 2007).

A redução do número de células em divisão é um efeito comum dos metais. Estudos realizados com *Allium cepa* L. mostraram que o cobre induz a inibição do crescimento radicular, indicando um retardo no crescimento de forma concentração-dependente, sendo o valor do EC_{50} de aproximadamente 1,5 mg / L e redução do IM de cerca de 64% em relação ao controle. Além disso, foram observadas a presença de pontes, cromossomos pegajosos, fragmentos, c-anáfase e multipolaridade em células anáfase-telófase (YILDIZ et al., 2009). Adamakis et al., (2014) verificaram interferência na divisão celular em raízes de *Arabidopsis* expostas a tungstênio e esse efeito foi atribuído alterações no transporte polar de auxina. Da mesma forma, o NO está relacionado ao transporte de auxina de maneira que níveis elevados desse radical prejudicam o crescimento primário da raiz (FERNÁNDEZ-MARCOS et al., 2011), porém em níveis adequados esse radical desempenha papel relevante no desenvolvimento do meristema apical. Nesse trabalho o NO atenuou o efeito citotóxico do cobre, porém, isoladamente nas maiores concentrações, esse radical mostrou-se citotóxico.

Esses dados estão de acordo com o exposto acima considerando o papel do NO, e revelam que a resposta da planta a condições de estresse está relacionada à homeostase do óxido nítrico.

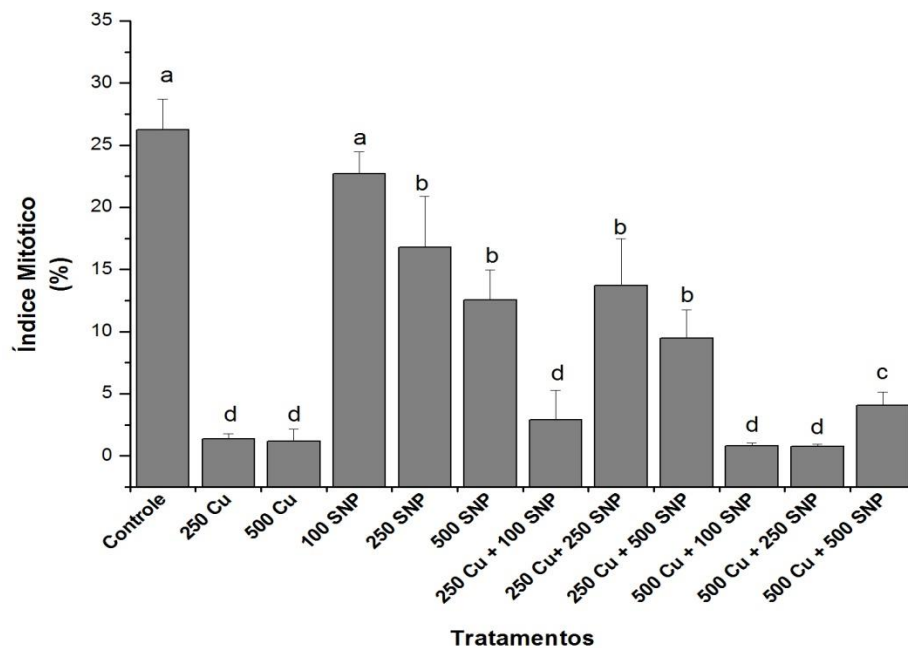


Figura 2. Percentual de células em divisão de *Lactuca sativa* L., em relação aos tratamentos com CuSO_4 (μM) e nitroprussiato de sódio (SNP, μM). Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Para biomassa fresca houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 3 A). Entretanto, para biomassa seca não houve diferença (Figura 3 B). Os tratamentos com 250 e 500 μM de cobre reduziram o acúmulo de biomassa fresca nas plântulas. Já o SNP não apresentou efeito sobre o acúmulo de biomassa isoladamente, mas foi eficiente em atenuar os efeitos fitotóxicos do cobre. Não houve deficiência no incremento de biomassa quando o SNP nas concentrações de 250 e 500 μM foi combinado com 250 μM de cobre. Já para a maior concentração de cobre (500 μM) somente houve efeito protetor de toxicidade quando o SNP foi usado na concentração de 500 μM . Esses resultados corroboram os obtidos por He et al. (2014) que verificaram efeito protetor do NO (na forma de SNP) sobre o acúmulo de BF tanto na parte aérea quanto nas raízes de plântulas de arroz exposta ao cádmio.

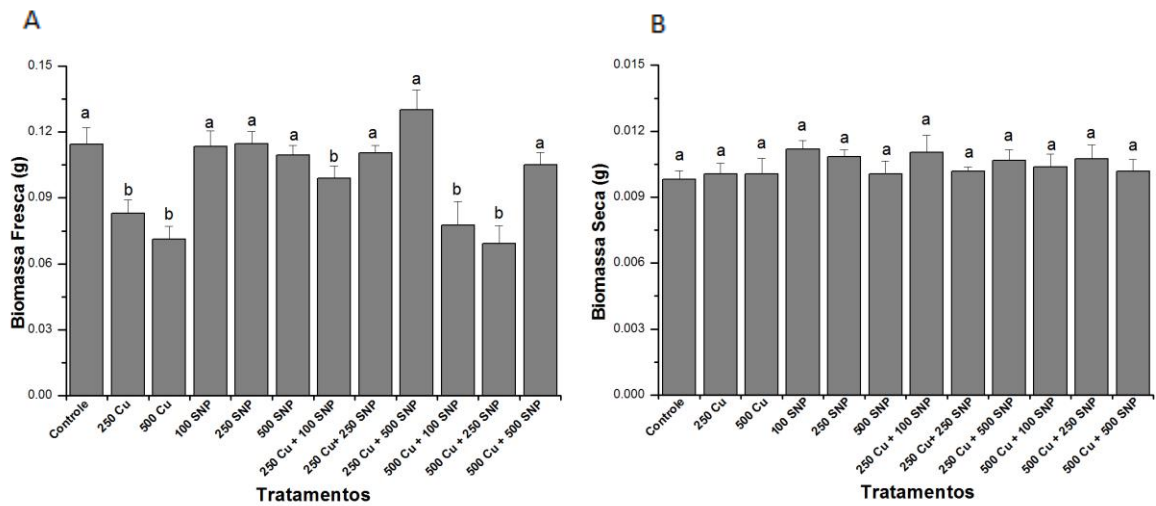


Figura 3: (A) Biomassa Fresca (BF) e seca (BS) em *Lactuca sativa* L., em relação aos tratamentos com CuSO_4 (μM) e nitroprussiato de sódio (SNP, μM). Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Com relação ao teor de prolina, houve aumento na concentração desse aminoácido nos tratamentos com 250 e 500 μM de cobre (Figura 4).

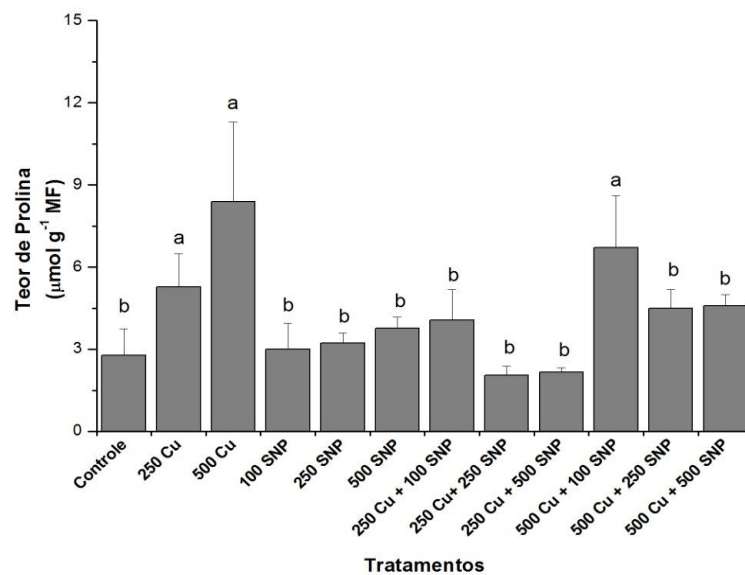


Figura 4. Teor de prolina de *Lactuca sativa* L. exposta tratamentos com CuSO_4 (μM) e nitroprussiato de sódio (SNP, μM). Barra: erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Prolina, em condição de estresse, exerce ação antioxidante reagindo com espécies reativas de oxigênio e protegendo enzimas de processos de detoxificação. Além disso, a prolina contribui para a recuperação da célula após o estresse por fornecer elétrons para a

cadeia respiratória e por atuar como fonte de nitrogênio e carbono (WANG, et al., 2007; SZABADOS & SAVOURE, 2010). Portanto, pode-se relacionar esse acúmulo à resposta da planta ao estresse causado pelo metal. Já na presença do SNP, não houve acúmulo de prolina em resposta ao cobre, sugerindo novamente um efeito protetor do NO em relação ao estresse causado pelo metal.

4 CONCLUSÕES

O cobre alterou a divisão celular e isso influenciou diretamente na redução do comprimento de raiz e no incremento da biomassa fresca das plântulas de *Lactuca sativa*. No entanto, não influenciou na germinação e na biomassa seca total.

A aplicação exógena de NO (na forma de SNP) foi capaz de reduzir os efeitos deletérios do cobre restaurando o crescimento das raízes pela recuperação da divisão celular e refletindo diretamente no incremento de biomassa.

REFERÊNCIAS

- ADAMAKIS, I-D.S.; PANTERIS, E.; ELEFTHERIOU, E. P. Tungsten disrupts root growth in *Arabidopsis thaliana* by PIN targeting. **Journal of Plant Physiology**, v. 171(13), p. 1174-1187, 2014.
- APEL, K. & HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARASIMOWICZ, M. & FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, v. 172, p. 876-887, 2007.
- BELIGNI, M. V. & LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 267-278, 2001.
- BORELLA, J.; PASOTORINI, L. H. Efeito Alelopático de Umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 34(5), p. 1129-1135, 2010.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Departamento Nacional de Produção Vegetal, 365 p. 2009.
- CRAWFORD, N. M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57(3), p. 471-478, 2006.
- CURIEL, A. C. & MORAES, C. P. Germinação de *Ormosia arborea* (Vell.) Harms submetida a diferentes períodos de exposição e concentração de GA₃ pós escarificação mecânica. **Scientia Plena**, v. 7(12), p. 1-6, 2011.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D. F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95(17), p. 10328-33, 1998.

EDERLI, L.; REALE, L.; MADEO, L.; FERRANTI, F.; GEHRING, C.; FORNACIARI, M.; ROMANO, B.; PASQUALINI, S. NO release by oxide donors in vitro and in planta. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 42-48, 2009.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FERNÁNDEZ-MARCOS, M.; SANZ, L.; LEWIS, D. R.; MUDAY, G. K.; LORENZO, O. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 108, p. 18506–18511, 2011.

FOYER, C. H. & NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**. v. 17(7), p. 1866–1875, 2005.

FOYER, C. H. & SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 93-100, 2011.

GARCIA-MATA, C. & LAMATTINA, L. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. **Plant Physiology**, v. 128, p. 790-792, 2002.

GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochiae speranzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* e *Raphanus sativus* L. **Acta Botânica Brasilica**, v. 18(3), p. 459-472, 2004.

GILL, 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.

GOUVEA, C. M. C. P.; SOUZA, J. F.; MAGALHAES, A. C. N.; MARTINS, I. S.; NO-releasing substances that induce growth elongation in maize rootsegments, **Plant Growth Regul.**, v. 21 183–187, 1997.

HATTAB, S.; DRIDI, B.; CHOUBA, L.; KHEDER, M. B.; BOUSETTA, H. Photosynthesis and growth responses of pea *Pisumsativum* L. under heavy metals stress. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 1552–1556, 2009.

HE, J.; REN, Y.; CHEN, X.; CHEN, H. Protective roles of nitric oxide on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under cadmium stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 108, p. 114–119, 2014.

HUANG, X.; RAD, U.; DURNER, J. Nitric oxide induces transcriptional activation of nitric oxide-tolerant alternative oxidase in Arabidopsis suspension cells. **Planta**, v. 215, p. 914-923, 2002.

INNOCENTI, G.; VEGETOB, E.; DALL-ACQUAA, S.; CIANAB, P.; GIORGETTIA, M.; AGRADIB, E.; SOZZIB, A.; FICOC, G.; TOMEC, F. In vitro estrogenic activity of *Achillea mille folium* L. **Phytomedicine**, v. 14, p. 147–152, 2007.

KOPYRA, M. & GWO'Z'DZ', E. A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 41, p. 1011-1017, 2003.

LASPINA, N. V.; GROPPA, M. D.; TOMARO, M. L.; BENAVIDES, M. P. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Science**, v. 169, p. 323-330, 2005.

LI, Y. M.; CHANEY, R. L.; ANGLE, J. S.; BAKER, A. J. M. Phytoremediation of heavy metal contaminated soils. In: Wise, D. L. (Ed.). **Bioremediation of contaminated soils**, 2009.

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

PAGNUSSAT, G. C.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. Nitric Oxide Is Required For Root Organogenesis. **Plant Physiology**, v. 129, p. 954-6, 2002.

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

PETÓ, A.; LEHOTAI, N.; LOZANO-JUSTE, J., et al. Involvement of nitric oxide and auxin in signal transduction of copper-induced morphological responses in A. seedlings. **Annals of Botany**, v. 108, p. 449–457, 2011.

RIJSTENBIL, J. W. & POORTVLIET, T. C. W. Copper and zinc in estuarine water: chemical speciation in relation to bioavailability to the marine planktonic diatom *Ditylumbrightwellii*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, p. 1615–1625, 1992.

ROMERO-PUERTAS, M. C.; PERAZZOLLI, M.; ZAGO, E. D.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signaling functions in plant-pathogen interactions. **Cell Microbiology**, v. 6, p. 795–803, 2004.

SIMÕES, M. S.; MADAIL, R. H.; BARBOSA, S.; NOGUEIRA, M. L.; Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando Alface. **Biotemas**, v. 26(3), p. 29-36, 2013.

STEFANO, M.; VANDELLE, E.; POLVERARI, A.; FERRARINI, A.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide-mediated signaling functions during the plant hypersensitive response. **Plant Cell Monographs**, v. 5, p. 207-222, 2006.

SZABADOS, L. & SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends Plant Science**, v. 15, p. 89-97, 2010.

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

TOSSI, V.; CASSIA, R.; LAMATTINA, L. Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1336-1441, 2009.

TOSSI, V.; AMENTA, M.; LAMATTINA, L.; CASSIA, R. Nitric oxide enhance plant ultraviolet-B protection up-regulation gene expression of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. **Plant, Cell & Environmental**, v. 34(6), p. 909-921, 2011.

WANG, Z. Q. YUAN, Y. Z. OU, J. Q. LIN, Q. H. ZHANG, C. F. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity, **J. Plant Physiology**, v. 164, p. 695-701, 2007.

YILDIZ, M.; CIGERCI, H. I.; KONUK, M.; FIDAN, A. F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of Cooper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, p. 934-938, 2009.

ZAGO, E.; MORSA, S.; DAT, J. F.; ALARD, P.; FERRARINI, A.; INZÉ, D.; DELLEDONNE, M.; VAN BREUSEGEM, F. Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. **Plant Physiology**, v. 141, p. 404-411, 2006.

ZHAO, L., ZHANG, F.; GUO, J.; YANG, Y; LI. B.; ZHAG, L. **Plant Physiology**, v. 134, p. 849-857, 2004.