

PATRICIA GIAMPAOLI

Efeito de cobre e zinco no desenvolvimento *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith

SÃO PAULO

2010

PATRICIA GIAMPAOLI

EFEITO DE COBRE E ZINCO NO DESENVOLVIMENTO  
*in vitro* DE *Aechmea blanchetiana* (BAKER) L.B. SMITH

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. ARMANDO REIS TAVARES

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Giampaoli, Patricia

G432e Efeito de cobre e zinco no desenvolvimento *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith / Patricia Giampaoli -- São Paulo, 2010  
109 p. il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010

Bibliografia

1. Bromeliaceae. 2. Metais pesados. 3. Cultivo *in vitro*. I. Título

CDU: 582.564

Dedico esse trabalho aos meus pais Eduardo e  
Mariza e à minha irmã Priscila



## **Agradecimentos**

Ao Instituto de Botânica, pela oportunidade, condições e infra-estrutura necessária para a realização do meu experimento.

À equipe da Seção de Pós-Graduação, pelo auxílio técnico, paciência com minhas dúvidas e amabilidade dispensada.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida por parte do meu segundo ano de mestrado

Ao meu orientador, Dr. Armando Reis Tavares, pela confiança, bom humor, paciência e disposição que dedicou a mim ao longo desses anos. Por me acalmar e me conduzir para as oportunidades que a vida me fornecia. Por acreditar em mim!

À Dra. Marisa Domingos, por me socorrer nas questões práticas e teóricas da ecologia. Por sempre me oferecer oportunidades incríveis!

Ao Dr. Shoey Kanashiro, pela simpatia e amabilidade com as quais saciava minhas dúvidas e curiosidades e por sempre oferecer ajuda.

À Dra. Giuseppina Pace Lima pela amabilidade com que me recebeu e pela oportunidade de aprender ainda mais.

Aos estagiários, alunos, pesquisadores, professores e funcionários da Seção de Ecologia do Instituto de Botânica.

Às “Panteras” Amarelas Celsa de Souza, Maria Auxiliadora Pinto Costa da Silva, Marli Rodrigues Battalha e Valdenice Soares Silva Amorim, pela ajuda durante minhas análises, sempre me auxiliando a “me encontrar” dentro do laboratório.

À Marcelle, Ricardo, Francisco, Andressa, Jéssica, Ana, Robson, Daiane, Fernanda, Cristiane e Sandra por fazerem com que eu me sentisse parte do grupo.

À Ana Paula, por permitir que eu fosse sua “sombra” durante meu treinamento, por se preocupar e sempre responder meus e-mails, telefonemas, cartas, pombos-correio...

À Fernanda Tresmonti, por me ensinar as técnicas histoquímicas deste trabalho e como descrevê-las corretamente.

À Ms. Mirian Rinaldi e Dra. Patrícia Bulbovas, pelo auxílio nas análises, pelos e-mails esclarecedores, por estarem sempre dispostas a responder minhas questões com um sorriso no rosto e pelo tempo dispensado ao meu aprimoramento como pesquisadora.

À Dra. Carla Zuliani pelas dicas, pelo bom humor, apoio e camaradagem.

À Waldete da Seção de Sementes do Instituto de Botânica, pelo auxílio no início do desenvolvimento do trabalho.

Aos pesquisadores, estagiários e funcionários da Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica, por sempre terem uma palavra amiga para me dizer.

À Daniela Soares dos Santos, agora Mestre, por compartilhar suas experiências e sempre ter um tempo para ouvir minhas preocupações.

Ao Jorge Luis, pelas caronas, risadas e ajudas dispensadas ao longo desses dois anos alucinantes. Por, junto com a Sarah, me ajudar a fazer “suco de planta” sempre que eu precisei.

Ao Dr. Edison Paulo Chu, por me ensinar a ter paciência, por sempre estar disposto a parar o que estivesse fazendo para responder minhas dúvidas, pelas dicas e simpatia.

À Dra. Maria Ângela M. de Carvalho, por dispensar seu tempo com algumas das minhas dúvidas e ser sempre tão gentil.

À Dona Luciana pela hospitalidade e carinho com que me recebeu.

Aos meus amigos, Cleyton, Eduardo, Ester, Jeniffer, Monaly, Noemih e Taís, por serem minha “válvula de escape”, por me incentivarem a sorrir, pelas idas e vindas do coral, por me fazerem gargalhar até chorar.

Às minhas amigas de infância, Ana, Bia, Livia e Nauê, por me obrigarem a sair de casa, por estarem sempre presentes desde o início da formação do meu caráter e por me mostrarem que sempre farão parte da minha vida.

Aos meus pais e minha irmã, por suportarem meu mau humor, prepararem os lanches da noite, ceder mais tempo no computador... Por mostrarem meus erros, me abraçarem quando eu precisei e fornecer pequenas amostras da sua sabedoria para aprimorar meu desenvolvimento.

# Índice

|                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Resumo.....                                                                                                                                                                 | 7   |
| Abstract .....                                                                                                                                                              | 9   |
| Capítulo 1 .....                                                                                                                                                            | 11  |
| 1. Introdução Geral.....                                                                                                                                                    | 11  |
| 1.1. Poluição.....                                                                                                                                                          | 12  |
| 1.2. Metais Pesados .....                                                                                                                                                   | 13  |
| 1.3. Defesas antioxidantes .....                                                                                                                                            | 15  |
| 1.4. Plantas em ambientes contaminados .....                                                                                                                                | 18  |
| 1.5. Cultivo <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                          | 22  |
| 2. Objetivos .....                                                                                                                                                          | 24  |
| 2.1. Objetivo Geral: .....                                                                                                                                                  | 24  |
| 2.2. Objetivos Específicos:.....                                                                                                                                            | 24  |
| 3. Referências .....                                                                                                                                                        | 25  |
| Capítulo 2 .....                                                                                                                                                            | 33  |
| Respostas biométricas e bioquímicas de plantas de <i>Aechmea blanchetiana</i> submetidas a diferentes concentrações contaminantes de cobre em cultivo <i>in vitro</i> ..... | 33  |
| 1. Introdução.....                                                                                                                                                          | 34  |
| 2. Material e Métodos.....                                                                                                                                                  | 37  |
| 3. Resultados e Discussão .....                                                                                                                                             | 44  |
| 4. Conclusões .....                                                                                                                                                         | 59  |
| 5. Referências .....                                                                                                                                                        | 60  |
| Capítulo 3 .....                                                                                                                                                            | 68  |
| Respostas biométricas e bioquímicas de plantas de <i>Aechmea blanchetiana</i> submetidas a diferentes concentrações contaminantes de zinco em cultivo <i>in vitro</i> ..... | 68  |
| 1. Introdução.....                                                                                                                                                          | 69  |
| 2. Material e Métodos.....                                                                                                                                                  | 72  |
| 3. Resultados e Discussão .....                                                                                                                                             | 76  |
| 4. Conclusões .....                                                                                                                                                         | 90  |
| 5. Referências .....                                                                                                                                                        | 91  |
| Capítulo 4 .....                                                                                                                                                            | 99  |
| Discussão Geral .....                                                                                                                                                       | 99  |
| Discussão Geral .....                                                                                                                                                       | 100 |
| Referências Bibliográficas .....                                                                                                                                            | 105 |
| Capítulo 5 .....                                                                                                                                                            | 108 |
| Conclusões Finais.....                                                                                                                                                      | 108 |

## Resumo

O rápido aumento populacional mundial e a urbanização geram problemas ambientais como a poluição atmosférica, impermeabilização do solo e impacto sobre a qualidade da água. Metais pesados são elementos presentes no material particulado disperso no ar, solos e águas residuárias, podendo ser tóxicos quando em altas concentrações e reagem com macromoléculas e ligantes presentes nas membranas moleculares, ocorrendo a bioacumulação. Os metais pesados podem causar alterações no crescimento e metabolismo das plantas e na formação de espécies ativas do oxigênio (EAOs) ocasionando estresse oxidativo. As bromélias vêm sendo estudadas como acumuladora de metais, entretanto pouco se conhece sobre os efeitos dos metais pesados no metabolismo dessas plantas. O estudo teve como objetivo avaliar o crescimento e desenvolvimento de *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn), pela análise das variáveis biométricas de crescimento, teores de macro e micronutrientes, poliaminas e ácido ascórbico (AA), atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD), e acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) utilizando a diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. As plantas foram obtidas pela germinação de sementes *in vitro* e aos 210 dias transferidas para os tratamentos 0,0; 0,145; 1,45 e 14,5  $\mu M$  Cu e 0,0; 2,75; 27,5 e 275  $\mu M$  Zn no meio MS (Murashige & Skoog 1962), modificado com metade das concentrações de macronutrientes. Não foram observadas cloroses ou necroses nas plantas em todos os tratamentos. O acúmulo de cobre e zinco ocorreu somente nas concentrações de 14,5  $\mu M$  de Cu e 275  $\mu M$  de Zn, não havendo alterações nos teores de macro e micronutrientes. Os teores da poliamina espermina aumentaram com a elevação da concentração de Zn e diminuíram com a elevação da concentração de Cu. Houve acúmulo de  $H_2O_2$ , por meio da coloração por DAB, nas plantas cultivadas nos tratamentos 1,45 e 14,5  $\mu M$  de Cu e 27,5 e 275  $\mu M$  de Zn. Os resultados indicam que o Cu e Zn alteraram a atividade de parte do ciclo ascorbato-

glutathiona e da produção de  $H_2O_2$ , podendo estar relacionada com a ação sinalizadora do sistema de defesa do estresse oxidativo. O estudo mostrou que a espécie *Aechmea blanchetiana* apresentou tolerância às concentrações de cobre e zinco utilizadas no meio MS e que a técnica de cultivo *in vitro* pode ser utilizada como ferramenta para o estudo de alterações metabólicas de plantas em condições de estresse por metais pesados.

## Abstract

The increasing of world population and urbanization creates environmental problems such as air pollution, soil sealing and impact on water quality. Heavy metals are elements present in particulate matter, soils and wastewater. It may be toxic when present in high concentrations and react with macromolecules and ligands in molecular membranes, promoting bioaccumulation. Heavy metals may cause changes in plant growth and metabolism, and forms of active oxygen species (ROS) causing oxidative stress. Bromeliads have been studied as accumulator of metals, however little is known about the effects of heavy metals in their metabolism. The study aimed to evaluate the growth and development of *Aechmea blanchetiana* cultured *in vitro* with different concentrations of copper (Cu) and zinc (Zn), by the analysis of the biometric parameters of growth, contents of macro and micronutrients, polyamines and ascorbic acid (AA), activity of the enzymes ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD), and the accumulation of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) using diaminobenzidine (DAB) as chromogen. The plants were obtained by germination *in vitro* and transferred after 210 days to the treatments 0.0, 0.145, 1.45 and 14.5  $\mu M$  Cu and 0.0, 2.75, 27.5 and 275  $\mu M$  Zn in the MS medium (Murashige & Skoog 1962) modified with half of the macronutrients. There was no chlorosis or necrosis in plants on all treatments. The accumulation of copper and zinc occurred only at concentrations of 14.5  $\mu M$  Cu and 275  $\mu M$  Zn, and there were no significant changes in the levels of macro and micronutrients. The levels of spermine rose with increasing concentration of Zn and decreased with increasing concentration of Cu. There was accumulation of  $H_2O_2$ , visible by DAB staining, plants grown in treatments 1.45 and 14.5  $\mu M$  Cu and 27.5 and 275  $\mu M$  Zn. The results indicate that copper and zinc altered the ascorbate-glutathione cycle activity and induction of  $H_2O_2$ , possibly due to the signaling function of the defense system against oxidative stress. The species *Aechmea blanchetiana* was tolerant to the concentrations of

copper and zinc used in this study, and the technique of *in vitro* culture can be used as a useful tool for the study of metabolic changes in plants under stress by heavy metals.

# **Capítulo 1**

## ***1. Introdução Geral***



## 1.1. Poluição

O rápido aumento populacional mundial (3,0 bilhões em 1960 para 6,5 bilhões em 2005 (UN 2007)) e a urbanização geram problemas ambientais como a poluição atmosférica e sonora, impermeabilização do solo e impacto sobre a qualidade da água (Tucci 2003).

Poluição pode ser definida como qualquer interferência danosa nos processos de transmissão de energia em um ecossistema (CETESB 2009) ou contaminação do ambiente por resíduos (poluentes) e outros produtos indesejados, oriundos da atividade humana (Townsend *et al.* 2006).

Os poluentes podem se apresentar nas formas líquida, gasosa ou sólida e são substâncias que tornam o ar, o solo ou a água nocivos ou ofensivos à saúde, sendo inconvenientes ao bem estar público e causando danos aos materiais, à fauna e à flora. Destacam-se os materiais particulados e os aerodispersóides (Gana Soto *et al.* 1985; CETESB 2009). Os materiais particulados são constituídos de materiais sólidos ou líquidos, tais como poeiras, fumos metálicos, névoas e neblinas e se mantêm suspensos no ar devido ao pequeno tamanho. Podem ser emitidos por fontes naturais como vulcões e queimadas, ou antrópicas, como a queima de combustíveis fósseis por veículos automotores ou indústrias (Raven *et al.* 2001; Larcher 2000; CETESB 2009).

A contaminação dos sistemas aquáticos é resultado da precipitação da poluição aérea, lavagem das superfícies urbanas contaminadas com diferentes componentes orgânicos e metais, resíduos sólidos erodidos pelo aumento da vazão, lixo urbano depositado ou transportado para a drenagem e esgoto não coletado (Tucci 2003). A análise da influência da densidade populacional sobre rios urbanos feita por Bollmann & Marques (2006), mostraram que a partir de uma condição natural não urbanizada, mesmo pequenas densidades populacionais são capazes de alterar significativamente a qualidade da água.

O uso intenso e desorganizado dos recursos naturais, para atender a crescente demanda de trabalhadores e habitantes produz resíduos (poluição) de modo acelerado e em grande variedade (Miotto 2007). Na década de 90 as atividades de lavra no Brasil, em minas próximas aos afluentes da bacia do Ribeirão Grande (região do Vale da Ribeira, PR), foram paralisadas e as minas abandonadas, sem que tenham sido executados quaisquer trabalhos de recuperação ambiental ou obras que visassem minimizar o impacto ambiental causado pela lixiviação dos rejeitos de beneficiamento e lavra. Estudos indicam que os córregos Ribeirão Perau e Barrinha são os principais fornecedores de metais pesados para o Ribeirão Grande e conseqüentemente para o mais importante rio da região, o Ribeira de Iguape (Corsi & Landim 2003).

## **1.2. Metais Pesados**

A denominação metais pesados é utilizada para uma larga escala de elementos importantes tanto industrial como biologicamente (Alloway 1995) que apresentem massa específica maior que  $5 \text{ g cm}^{-3}$  (Shaw 1990; Azevedo & Lea 2005). São elementos que reagem com macromoléculas e ligantes presentes nas membranas moleculares, o que lhes confere a propriedade de bioacumulação. Desses, cerca de vinte são considerados tóxicos, incluindo cádmio, mercúrio, chumbo, arsênio, cobalto, níquel, entre outros (Tavares 1992).

Nos ecossistemas terrestres os metais pesados estão naturalmente presentes no solo, na atmosfera e na biosfera, onde as principais concentrações de metais provêm, predominantemente, de desgastes rochosos e deposição úmida e seca das copas de árvores, emissões atmosféricas durante erupções vulcânicas, queima de florestas, transporte de poeira continental e degradação da biomassa de vegetais e animais, assim como de seus dejetos (Shaw 1990). Em solos não contaminados são encontradas concentrações de metais que variam de alguns microgramas a miligramas por quilograma de solo, inferiores às consideradas tóxicas para organismos vivos (Gratão *et al.* 2005).

O processo de mineração pode gerar dispersão excessiva de metais no ambiente (Silva *et al.* 2001, Soares *et al.* 1997). No processo de extração os minérios são moídos e os resíduos contendo metais pesados são expostos ao ambiente, podendo ser lixiviados para rios e lagos (Townsend *et al.* 2006). A contribuição da industrialização e urbanização na deposição de metais pesados no ecossistema têm sido evidente e perigosamente alta, promovendo nas últimas duas décadas o aumento de 40% da concentração de ferro nos solos (Shaw 1990). As águas residuais urbanas podem apresentar quantidades consideráveis de metais pesados, outros materiais em suspensão e, em determinadas épocas do ano, cloro (Moraes & Jordão 2002). A contaminação por mercúrio causada por efluentes urbanos está presente, em sua maior parte, nas áreas estuarinas e costeiras da região sul do Brasil, onde estão concentrados os pólos industriais do país (Marins *et al.* 2004).

Os metais pesados presentes no material particulado atmosférico ou em efluentes industriais podem ser acumulados nas camadas orgânicas do solo (Lopes 2001). A Resolução CONAMA 03, de 28/06/90, estabelece, como nível de alerta para os padrões de qualidade do ar  $375 \mu\text{g m}^{-3}$  de partículas totais em suspensão diárias. O Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo, elaborado em 2006 pela CETESB, revelou que a fonte mais significativa de poluição do ar era os veículos automotores, participando com 97% das emissões de monóxido de carbono (CO) e 40% de material particulado (MP) (CETESB 2009).

O solo tem a capacidade de depuração e imobilização de grande parte das impurezas depositadas (Alloway 1995), entretanto essa capacidade é limitada e a qualidade do solo pode ser alterada pelo efeito cumulativo da deposição de poluentes atmosféricos, aplicação de defensivos agrícolas e fertilizantes e descarte de resíduos sólidos industriais e urbanos e de materiais tóxicos ou radioativos (CETESB 2009).

A solubilidade dos metais está diretamente relacionada com o pH do solo; no caso do chumbo (Pb), cádmio (Cd) e zinco (Zn), por exemplo, ela é baixa em condições alcalinas e aumenta com a diminuição do pH (Chuan *et al.* 1996). Muitos dos metais considerados metais

pesados são tóxicos quando presentes em altas concentrações, como o cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e molibdênio (Mo); entretanto são fundamentais para a sobrevivência dos organismos vivos quando em pequenas concentrações (Alloway 1995).

Para amenizar a deficiência de metais traços em solos, com destaque para a deficiência de zinco, seguido pela de cobre e manganês (essenciais para o desenvolvimento da agricultura) é comum o uso de corretivos e fertilizantes agrícolas (Alloway 1995). Fertilizantes fosfatados, insumos agrícolas e corretivos contêm metais pesados provenientes da rocha que os originou ou dos componentes utilizados na sua industrialização (Campos *et al.* 2005), sendo uma fonte de contaminação quando utilizados em excesso.

A absorção de metais tóxicos pelas raízes de plantas é potencialmente perigosa para a saúde humana, e seu acúmulo em plantações é a principal via de entrada dos mesmos na cadeia alimentar (Sandalio *et al.* 2009).

### **1.3. Defesas antioxidantes**

Os metais pesados, assim como outros fatores ambientais, podem causar efeitos adversos sobre as plantas, decorrentes de estresse oxidativo provocado pela intensificação da formação de espécies ativas do oxigênio (EAOs). As EAOs atingem moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, com consequentes distúrbios estruturais, metabólicos e fisiológicos em células, podendo levá-las à morte (Hallwell & Gutteridge 1989; Bray *et al.* 2000).

As espécies ativas de oxigênio são átomos ou moléculas altamente reativas, encontradas em todos os organismos biológicos aeróbicos, produzidas naturalmente nas plantas, principalmente na cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto (fotossíntese) e mitocôndria (respiração celular) e na fotorrespiração (Ferreira & Matsubata 1997; Dat *et al.* 2000) (Figura 1). Os principais intermediários reativos formados nos processos são os radicais

superóxidos ( $O_2^{\bullet -}$ ), primeiras espécies a serem formadas, radicais hidroxilas ( $OH^{\bullet}$ ), altamente reativos e de meia vida curta, e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sendo apontado como possível sinalizador de defesa, podendo atravessar membranas e ser acumulado no interior das células (Ferreira & Matsubata 1997; Pinto *et al.* 2003; Apel & Hirt 2004; Soares & Machado 2007).

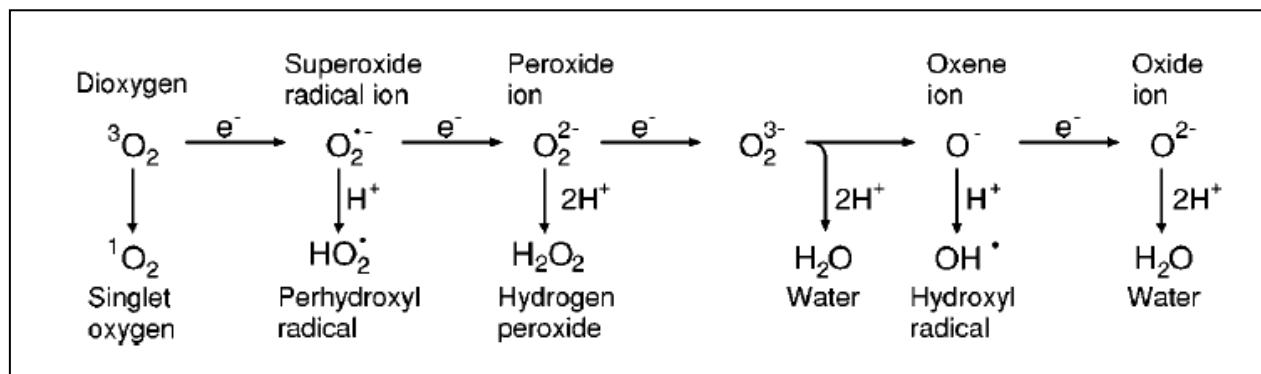


Figura 1: Formação de espécies ativas de oxigênio durante a redução do oxigênio molecular (Apel & Hitt 2004).

Para se prevenir de injúrias, as plantas capturam e eliminam moléculas reativas pelo uso de um sistema de defesa antioxidante presente no apoplasto e em vários compartimentos subcelulares (Hallwell & Gutteridge 1989; Bray *et al.* 2000). A eficiência desse sistema antioxidante é, portanto, uma medida de tolerância das plantas ao estresse oxidativo induzido por poluentes.

O sistema de defesa inclui antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Entre as defesas enzimáticas estão as peroxidases (superóxido dismutase e ascorbato peroxidase) e catalases, que removem o peróxido de hidrogênio das células, as primeiras reduzindo e as segundas catalisando, sendo que nessa última reação, o oxigênio produzido é estável ( $O_2$ ) (Hallwell & Gutteridge 1989). As principais defesas não-enzimáticas e solúveis em água são: ácido ascórbico (AA), tióis (predominando a glutathione),  $\alpha$ -tocopherol, carotenóide,

poliaminas e flavonóides, também considerados por promoverem alguma proteção contra injúrias causadas pelos EAOs (Bray *et al.* 2000) (Figura 2).

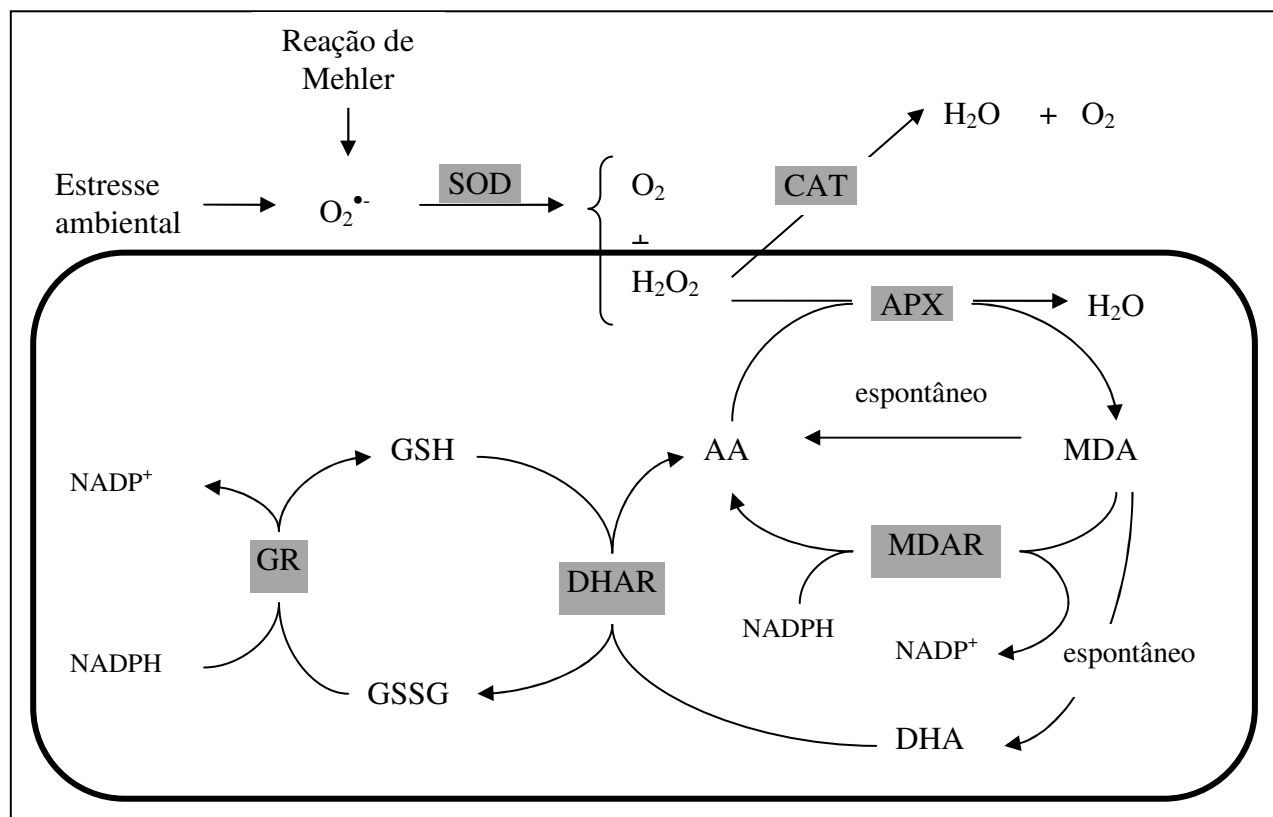


Figura 2. Esquema da atividade do sistema antioxidante em plantas. Em destaque está o ciclo ascorbato glutaciona. SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; APX = ascorbato peroxidase; AA = ácido ascórbico; MDAR = monodehidroascorbato redutase; MDA = monodehidroascorbato; DHA = dehidroascorbato; DHAR = dehidroascorbato redutase GSH = glutaciona reduzida; GSSG = glutaciona oxidada; GR = glutaciona redutase. Adaptado de Soares & Machado (2007).

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima classificada em três grupos, de acordo com o metal ligado à sua molécula. As plantas, normalmente, apresentam as formas Cu/Zn-SOD no citosol, Cu/Zn e/ou Fe-SOD no cloroplasto e Mn-SOD na mitocôndria. (Alscher *et al.* 2002; Resende *et al.* 2003; Apel & Hirt 2004). Estão localizadas em diferentes compartimentos da célula e agem como a primeira linha de defesa contra a EAOs, catalisando a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio. O  $H_2O_2$  é formado na

dismutação do radical superóxido e, se produzido em pequenas quantidades, pode ser um sinalizador para a ativação do sistema antioxidante das plantas (Gratão *et al.* 2005).

A adição de  $H_2O_2$  em tecidos foliares ou sua indução endógena promove o fechamento dos estômatos e, conseqüentemente, diminui a taxa transpiratória, podendo agir como um sinal indutor para a expressão de genes referentes à ativação da catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase e glutathione peroxidase (Soares & Machado 2007, Deuner *et al.* 2008).

O  $H_2O_2$ , em altas concentrações, pode ser prejudicial aos tecidos, atravessando as membranas celulares e promovendo a peroxidação lipídica (Resende *et al.* 2003). O  $H_2O_2$  formado é neutralizado pelas catalases ou pelo ciclo ascorbato/glutathione, sendo este último, o principal sistema de remoção das EAOs nos cloroplastos (Soares & Machado 2007).

A ascorbato peroxidase é encontrada em plantas superiores, clorófitas e algas vermelhas. Apresenta alta especificidade pelo ascorbato (ou ácido ascórbico) como substrato redutor, catalisando a reação de neutralização do peróxido de hidrogênio em água (Carvezan 2008). O ácido ascórbico atua como co-fator de enzimas e como agente redutor, desintoxicando vários radicais orgânicos, atuando contra  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  e removendo oxigênio ativo (Hallwell & Gutteridge 1989).

#### **1.4. Plantas em ambientes contaminados**

Os sistemas biológicos, sejam organismos, populações ou comunidades, adaptaram-se, ao longo de sua evolução, a um complexo de fatores ambientais, e se apresentam em equilíbrio dinâmico e estabilidade (Lima 2001). A presença dos metais pesados e de outros poluentes pode afetar esse equilíbrio e a reação dos organismos em relação à qualidade do ambiente pode ser utilizada como indicador, seja no nível macroscópico com necroses e cloroses, em geral nas folhas, ou por alterações metabólicas e fisiológicas e acúmulo de

poluentes nos tecidos (Manning & Feder 1980; Flores 1987; Dässler & Börtiz 1988; Saiki *et al.* 1997; Lima 2001).

A princípio qualquer ser vivo pode ser utilizado como indicador de poluição ambiental (biomonitor), porém o termo tem sido utilizado para organismos mais sensíveis, sendo estes divididos em três categorias: organismos apontadores - que indicam o impacto da poluição através de mudanças no tamanho de sua população; organismos testes - altamente padronizados e utilizados em bioensaios de toxicologia e organismos monitores - que mostram qualitativa e/ou quantitativamente o impacto da poluição (Klumpp 2001).

O uso de plantas como biomonitoras é vantajoso por indicar a presença de poluentes e, em alguns casos estimar os níveis dos mesmos, bem como por monitorar os riscos dos poluentes aos seres vivos (Esposito 2008). Segundo Ellenberg (1991) o biomonitoramento possibilita a delimitação de áreas atingidas pela contaminação, a classificação dos vários níveis de poluição na área estudada e a avaliação dos riscos impostos às espécies e à vegetação local.

Muitos vegetais já foram identificados como monitores de poluição. *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) tem sido utilizada como monitora de poluição atmosférica e edáfica na região da Serra do Mar, próximo ao pólo industrial de Cubatão (Domingos *et al.* 1998; Domingos *et al.* 2000; Mazzoni-Viveiros & Truffen 2004). Mota-Filho *et al.* (2007) observaram que o líquen *Cladonia verticillaris* Radd apresentou forte redução de sua vitalidade ao ser submetido às emissões provenientes da queima de combustíveis e pereceu ao entrar em contato com as emissões associadas aos particulados de chumbo. Legeard *et al.* (2008) estudaram os efeitos da poluição atmosférica por chumbo nos arredores de minas de chumbo na Inglaterra, utilizando *Pinus sylvestris* L. como bioindicador. Variedades sensíveis de tabaco (*Nicotina tabacum* “Bel W3”) são utilizadas na Europa e no Brasil como indicadores de contaminação atmosférica por ozônio (Klumpp *et al.* 2006; Pedroso 2006; Sant’Anna 2007; Esposito 2008).



Plantas que se desenvolvem em ambientes contaminados por metais são consideradas tolerantes, e, em alguns casos, capazes de acumular e retirar do solo altas quantidades desses contaminantes (Gratão *et al.* 2005). Podem atuar como bioacumuladoras de poluentes sem necessariamente apresentar sintomas visíveis e a análise dos seus tecidos permite estimar as concentrações ambientais dos poluentes, como por exemplo, deposição de metais pesados (Mulgrew & Williams 2000). As plantas podem absorver metais pesados pelas raízes ou parte aérea, acumulando-os de maneira seletiva em seus órgãos (Cheng 2003). Segundo Cape (2009) o acúmulo de poluentes atmosféricos pelas plantas ocorre usualmente pela captação passiva desses poluentes pelos estômatos ou indiretamente pelo sistema radicular nos solos.

A utilização de plantas específicas, com capacidade acumuladora (fitorremediação), visa a amenização ou despoluição de áreas contaminadas (Coutinho & Barboza 2007). Com esse intuito, muitas plantas têm sido empregadas na descontaminação de solos e águas poluídas por metais pesados e têm apresentado respostas no tratamento mineral de efluentes industriais (Cheng 2003). Bako *et al.* (2005) observaram que as espécies *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight & Arn., *Securinega virosa* (Roxb. ex Willd) Baill., *Ficus platyphylla* Delile e *Isobertinia doka* Craib & Stapf, típicas da savana, podem se desenvolver em ambientes contaminados pelos metais Sb (antimônio), Cr (cromo), Ni (níquel), As (arsênio), Pb (chumbo) e Cu (cobre) e apresentam a característica de serem hiperacumuladoras de Sb.

Nas primeiras décadas do século XX foram iniciados estudos com bromélias e líquens para a avaliação do impacto da poluição ambiental, quanto à qualidade bioindicadora (Saiki *et al.* 1997). As espécies de Bromeliaceae refletem suas deficiências e excessos nutricionais principalmente nas folhas, sendo as parte da planta mais indicada como amostra para determinação de teores de nutrientes (Paula *et al.* 1998).

A família Bromeliaceae, é composta por 57 gêneros, 3086 espécies e milhares de híbridos, distribuídos em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Costa 1996; Luther 2006). São espécies nativas das Américas, em especial da Mata

Atlântica, com exceção da *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed que ocorre no continente africano (Leme & Marigo 1993). Podem ser encontradas em todos os climas e seus representantes podem apresentar tanto a forma epífita, com raízes que favorecem sua fixação à planta hospedeira, quanto a forma terrestre, com raízes funcionais que permitem a fixação e a retirada de água e nutrientes do solo (Carvalho & Mercier 2005). As espécies de Bromeliaceae os excessos nutricionais principalmente nas folhas, sendo a parte da planta mais adequada na determinação de teores de nutrientes (Paula *et al.*, 1998) e principal local de acúmulo de macronutrientes, micronutrientes e íons diversos (Benzing 2000).

A família apresenta crescente risco de extinção devido à destruição de seus habitats, ocasionada pelo crescimento econômico (Leme & Marigo 1993; Mercier & Kerbauy 1997). Em consequência, muitos estudos são voltados à preservação dessas espécies, incluindo a criação de protocolos de cultivo *in vitro*, que permitem a produção de grande quantidade de mudas com alta qualidade a partir de uma planta matriz (Willadino *et al.* 2001).

A espécie *Tillandsia usneoides* (L.) L. é utilizada em pesquisas de biomonitoramento, pois reflete as características atmosféricas ao retirar os nutrientes e a água de que necessita utilizando os tricomas e estômatos da parte aérea, e por apresentar capacidade acumuladora para o mercúrio (Malm *et al.* 1998; Figueiredo *et al.* 2001; Pignata *et al.* 2002). A espécie *Tillandsia capillaris* Ruiz & Pav. apresenta capacidade acumuladora para Fe, Mn, Cu, Co, Ni e Pb (Wannaz & Pignata 2006).

Elias *et al.* (2006), avaliando 11 espécies de bromélias, incluindo uma do gênero *Tillandsia*, concluíram que as espécies *Aechmea coelestis* (K. Koch) E. Morren, *Nidularium* cf. *inocentii* (Schult. f.) L.B. Smith, *Nidularium krisgreeniae* Leme e *Vriesea carinata* Wawra são capazes de acumular altas concentrações de bromo (Br), a espécie *Billbergia amoema* (Lodd.) Lindl. possui maior capacidade de acúmulo de potássio (K) quando comparada a espécies arbóreas e a espécie *Canistropsis billbergioides* (Schult. f.) Leme acumula vários

metais, sendo considerada espécie promissora no biomonitoramento de elementos químicos na Mata Atlântica.

### 1.5. Cultivo *in vitro*

A técnica de cultivo *in vitro* é o processo que envolve o isolamento e a inoculação em meio nutritivo de células, tecidos ou órgãos, visando obter a multiplicação assexuada com o completo desenvolvimento de órgãos (Giacometti 1990).

A técnica oferece vantagens à produção convencional de plantas, possibilitando a produção de plantas de qualidade e em grande escala a partir de pequeno número de explantes retirados de uma planta matriz, permitindo a manutenção de condições assépticas e controladas (Willadino *et al.* 2001), aumentando a porcentagem de sobrevivência e acelerando o tempo de germinação das sementes (Pickens *et al.* 2006). A utilização da técnica de cultivo *in vitro* tem sido amplamente empregada para garantir a produção de plantas utilizadas em agronomia, horticultura e reflorestamento (Estrada-Luna *et al.* 2001).

A técnica pode ser utilizada em bromélias ornamentais utilizando-se gemas apicais e auxiliares, folhas removidas de plantas adultas e sementes, sendo esta última importante para a conservação de germoplasmas e manutenção da variabilidade genética (Mercier & Kerbaux 1997).

Estudos realizados *in vitro* com o gênero *Aechmea* foram realizados por Mercier & Kerbaux (1997), estudos de nutrição, germinação de pólen e multiplicação *in vitro* de *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker por Vinterhalter & Vinterhalter (1994), Vervaeke *et al.* (2002) e Cueva (2006), e estudos de nutrição mineral *in vitro* com *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith por Kanashiro *et al.* (2007).

A bromélia *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, Figura 3, é uma espécie comum em restingas; herbácea, perene, rizomatosa, robusta, de 60 a 90 cm de altura, heliófila, com folhagens de coloração amarelada dispostas na forma de roseta, formando tanques, que

pode invadir a mata, onde vive como epífita (Leme & Marigo 1993; Lorenzi & Souza 1998; Lorenzi & Mello-Filho 2001). A espécie, por ser amplamente utilizada em paisagismo, apresenta-se adaptada a todas as regiões do Brasil e vêm sendo extraída de seu ambiente natural em grande profusão para atender a demanda do mercado de plantas ornamentais (Lorenzi & Souza 1998); sua propagação *in vitro* é conhecida, possuindo protocolo eficiente (Galvanese *et al.* 2007), é responsiva a diferentes concentrações de sais em cultivo *in vitro* (Kanashiro 2005) e tolerante ao processo de aclimatização (Tavares *et al.* 2008).

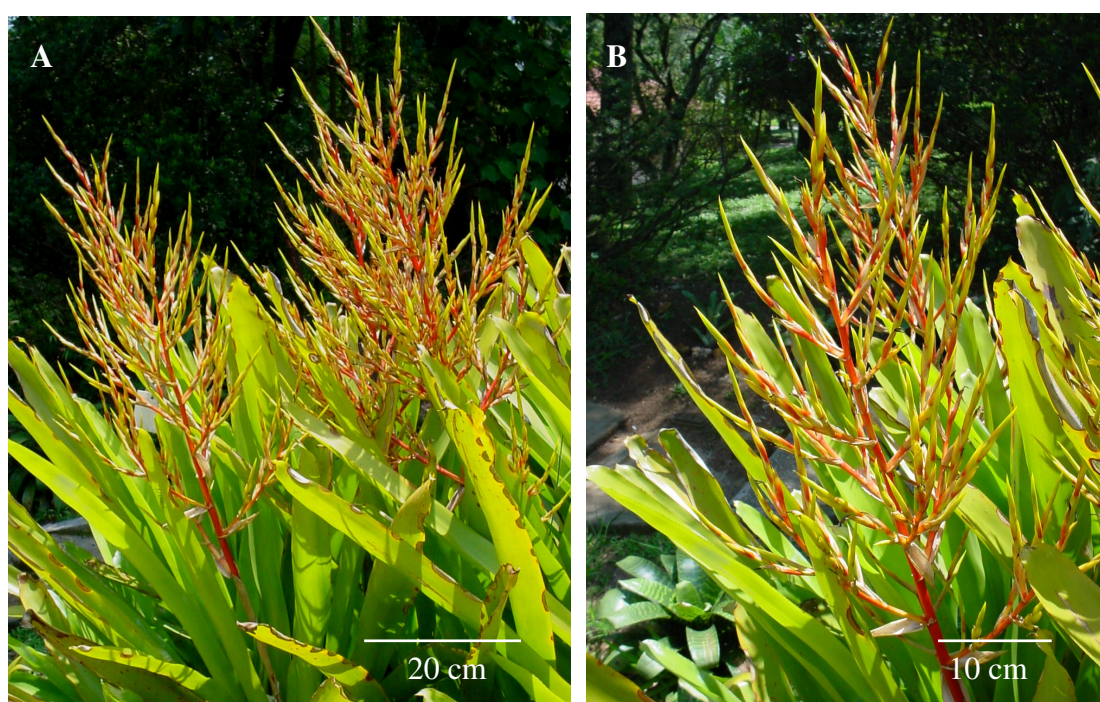


Figura 3. Plantas adultas de *Aechmea blanchetiana* (A) e detalhe de sua inflorescência (B) cultivadas na Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica, SP.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral:**

Determinar o nível de tolerância da *Aechmea blanchetiana* a concentrações contaminantes dos metais cobre (Cu) e zinco (Zn)

### **2.2. Objetivos Específicos:**

- Estudar os mecanismos físicos e bioquímicos de tolerância da espécie aos metais
- Avaliar a capacidade acumuladora de metais da espécie
- Determinar se a técnica de cultivo *in vitro* pode ser utilizada como instrumento de investigação no estudo da sensibilidade e/ou tolerância de plantas a contaminantes ambientais.

### **3. Referências**

- Alloway, B.J.** 1995. Heavy metals in soil. 2 ed. Blackie Academic & Professional, New York.
- Alscher, R.G., Erturk, N. & Heath, L.S.** 2002. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Apel, K. & Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Biology* 55: 373-399.
- Azevedo, R.A. & Lea, P.J.** 2005. Toxic metals in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 1-1.
- Bako, S.P., Funtua, I.I. & Ijachi, M.** 2005. Heavy metal content of some savanna plant species in relation to air pollution. *Water, Air and Soil Pollution* 161: 125 - 136.
- Benzing, D.H.** 2000. *omeliaceae: Profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press. parte II, pp 52-77.
- Bollmann, H.A. & Marques, D.M.L.M.** 2006. Influência da densidade populacional nas relações entre matéria orgânica carbonácea, nitrogênio e fósforo em rios urbanos situados em áreas com baixa cobertura sanitária. *Engenharia Sanitária Ambiental* 11: 343-352.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. *In: B.B. Buchanan, W. Gruissen & R.L. Jones (eds.). Biochemistry & Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists Press, New York, pp. 1158-1203.
- Campos, M.L., Silva F.N., Furtini Neto A.E., Guilherme L.R.G., Marques J.J. & Antunes A.S.** 2005. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 361-367.
- Cape, J.N.** 2009. Plants as Accumulators of Atmospheric Emissions. *In: A.H. Legge (Ed). Developments in Environmental Science*. Elsevier Ltd, Inglaterra. Cap 3. p.61-98.

- Carvalho, A.C.P.P. & Mercier, H.** 2005. Bromeliaceae. *In*: D. Terezo, A.C.P.P. Carvalho & T.C.S.F. Barroso (eds.). Flores Tropicais. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, pp. 59-83.
- Carvezan, A.** 2008. Caracterização funcional dos gêneros de ascorbato peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CETESB.** 2009. Glossário Ecológico Ambiental. Companhia de Tecnologia de Saneamento Básico, São Paulo.
- Cheng, S.** 2003. Heavy metals in plants and phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research-International* 10: 335-40.
- Chuan, M.C., Shu, G.Y. & Liu, J.C.** 1996. Solubility of heavy metals in a contaminated soil: effects of redox potencial and pH. *Water, Air and Soil Pollution* 90: 543-556.
- Corsi, A.C. & Landim, P.M.B.** 2003. Chumbo, zinco e cobre em sedimentos de corrente nos Ribeirões Grande, Perau e Canoas, e córrego Barrinha no município de Adrianópolis (Vale do Ribeira, PR). *Geociências* 22: 49-61.
- Costa, A.** 1996. Estudo em Bromélias. UNIRIO, Rio de Janeiro.
- Coutinho, H.D. & Barbosa, A.R.** 2007. Fitorremediação: considerações gerais e características de utilização. *Silva Lusitana* 15: 103-117.
- Cueva, A., Espinosa, C. & Jordan, M.** 2006. Efficient *in vitro* multiplication of *Aechmea* 'Little Harv' and *Tillandsia cyanea* Linden ex K. Koch. *Propagation of Ornamental Plant* 6: 165-169.
- Dässler, H.G. & Börtitz, S.** 1988. Air pollution and its influence on vegetation. Dr W. Jung Publishers, Dordrecht.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inze, D. & Van Breusegem, F.** 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science* 57: 779-795.

- Deuner, S., Alves, J.D., Fries, D.D., Zanandrea, I., Lima, A.A., Henrique, PC. & Goulart, P.F.P.** 2008. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. *Revista Ceres* 55: 135-140.
- Domingos, M., Klumpp, A. & Klumpp, G.** 1998. Air pollutants impact on the Atlantic Forest in the Cubatão region, São Paulo, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230-236.
- Domingos, M., Lopes, M.I.M.S. & Struffaldi-Devuono, Y.** 2000. Nutrient cycling disturbance in Atlantic Forest sites affected by air pollution coming from the industrial complex of Cubatão, Southeast Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 77-85.
- Elias, C., De Nadai Fernandes, E.A., França, E.J. & Bacchi, M.A.** 2006. Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica. *Biota Neotropica* 6: 1-9.
- Ellenberg, H.** 1991. Bioindicators and biological monitoring. *In*: H. Ellenberg, U. Arndt, R. Bretthauer & B. Ruthsatz (eds.). *Biological monitoring-Signals from the environment*. Vieweg, Braunschweig, pp. 13-127.
- Esposito, M.P.** 2008. Estudo da relação entre necroses foliares indicadoras de ozônio atmosférico e defesas antioxidativas em folhas de *Nicotiana tabacum* "Bel W3". Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Estrada-Luna, A.A., Davies, J.R.F.T. & Egilla, J.N.** 2001. Physiological changes and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 17-24.
- Ferreira, A.L.A. & Matsubata, L.S.** 1997. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43: 61-68.
- Figueiredo, A.M.F., Saiki, M., Ticianelli, R.B., Domingos, M., Alves, E.S. & Markert, B.** 2001. Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by neutron activation analysis for environmental biomonitoring. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 249: 391-395.



- Flores, E.V.** 1987. O uso de plantas como bioindicadoras de poluição no ambiente urbano-industrial: experiências em Porto Alegre, RS, Brasil. *Tubinger Geographische Studien* 96: 79-86.
- Galvanese, M.S., Tavares, A.R., Aguiar, F.F.A., Kanashiro, S., Chu, E.P., Stancato, G.C. & Harder, I.C.F.** 2007. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. *Revista Ceres* 54: 63-67.
- Gana Soto, J.M.O., Saad, I.F.S.D. & Fantazzini, M.L.** 1985. *Riscos Químicos*. 2ª Ed. Fundacentro, SP. 100pp.
- Giacometti, D.C.** 1990. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. *In*: A.C. Torres & L.S. Caldas (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecido de plantas*. ABCTP/EMBRAPA, Brasília, pp. 19-28.
- Gratão, P.L., Prasad, M.N.V., Cardoso, P.F., Lea, P.J. & Azevedo, R.A.** 2005. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 7: 53-64.
- Hallwell, B. & Gutteridge, J.M.C.** 1989. *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Kanashiro, S.** 2005. Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Kanashiro, S., Ribeiro, R.C.S., Gonçalves, A.N., Dias, C.T.S. & Jocys, T.** 2007. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. *Hoehnea* 34: 59-66.
- Klumpp, A.** 2001. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. *In*: N.B. Maia, H.L. Martos & W. Barrella (Eds.). *Indicadores ambientais: conceitos e aplicações*. EDUC/COMPED/INEP, São Paulo, pp.77-94.

- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ribas, H., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P. & Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* 40: 7437-7448.
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. RiMa Artes e Textos, São Carlos.
- Legéard, J.G.A., Howell, J.A., Rothwell, J.J. & Drew, I.B.** 2008. The utility of *Pinus sylvestris* L. in dendrochemical investigations: pollution impact of lead mining and smelting in Darley Dale, Derbyshire, UK. *Environmental Pollution* 153: 284-294.
- Leme, E.M.C. & Marigo, L.C.** 1993. *Bromélias na Natureza*. Marigo Comunicação Visual, Rio de Janeiro.
- Lima, J.S.** 2001. Processos biológicos e o biomonitoramento: aspectos bioquímicos e morfológicos. *In*: N.B. Maia, H.L. Martos & W. Barrella, *Indicadores ambientais: conceitos e aplicações*. EDUC/COMPED/INEP, São Paulo, pp. 94-115.
- Lopes, M.I.M.S.** 2001. Fluxo de água, balanço químico e alterações no solo da Floresta Atlântica atingida pela poluição aérea de Cubatão, SP, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Lorenzi, H. & Mello-Filho, L.E.** 2001. *As plantas tropicais de R. Burle Max*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa.
- Lorenzi, H. & Souza, H.M.** 1998. *Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Plantarum, Nova Odessa.
- Luther, H.D.** 2006. *An Alphabetical List of Bromeliad Binomials*. The Bromeliad Society International, Sarasota.

- Malm, O., Fonseca, M.F., Miguel, P.H., Bastos, W.R. & Pinto, F.N.** 1998. Use of epiphyte plants as biomonitors to map atmospheric mercury in a gold trade center city, Amazon, Brazil. *The Science of the Total Environment* 213: 57-64.
- Manning, W.J. & Feder, W.A.** 1980. Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Publishers, London.
- Marins R.V., Paula Filho F.J. & Maia S.R.R.** 2004. Distribuição de mercúrio total como indicador de poluição urbana e industrial na costa brasileira. *Química Nova* 27: 763-770.
- Mazzoni-Viveiros, S.C. & Trufem, S.F.B.** 2004. Efeitos da poluição aérea e edáfica no sistema radicular de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) em área de Mata Atlântica: associações micorrízicas e morfologia. *Revista Brasileira de Botânica* 27: 337-348.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads. *In*: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry-Serie High-Tech and Micropropagation*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 43-57.
- Miotto, L.B.** 2007. Meio Ambiente: intervenção e equilíbrio. *Metrocamp Pesquisa* 1: 1-17.
- Moraes, D.S.L. & Jordão, B.Q.** 2002. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Revista de Saúde Pública* 36: 370-374.
- Mota-Filho, F.O., Pereira, E.C., Lima, E.S., Silva, N.H. & Figueiredo, R.C.B.** 2007. Influência de poluentes atmosféricos em belo jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (Líquen) como biomonitor. *Química Nova* 30: 1072-1076.
- Mulgrew, A. & Williams, P.** 2000. Biomonitoring of air quality using plants. MARC, Berlin.
- Paula, M.B., Mesquita, H.A. & Nogueira, F.D.** 1998. Nutrição e adubação do abacaxizeiro. *Informe Agropecuário* 19: 33-39.
- Pedroso, A.N.V.** 2006. Avaliação estrutural de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' sob diferentes níveis de contaminação atmosférica. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.

- Pickens, A.K., Wolf, J., Affolter, J.M. & Wetzstein, H.Y.** 2006. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 42: 348-353.
- Pignata, M.L., Gudiño, G.L., Wannaz, E.D., Pla, R.R., González, C.M., Carreras, H.A. & Orellana, L.** 2002. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. Environmental Pollution 120: 59-68.
- Pinto, E., Sigaud-Kuther, T.C.S., Leitão, M.A.S., Ohamoto, O.K., Morse, D. & Colepicolo, P.** 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. Journal of Phycology 39: 1008-1018.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E.** 2001. Biologia Vegetal. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Resende, M.L.V., Salgado, S.M.L. & Chaves, Z.M.** 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. Fitopatologia Brasileira 28: 123-130.
- Saiki, M., Chaparro, C.G., Vasconcelos, M.B.A. & Marcelli, M.P.** 1997. Determination of trace elements in lichens by instrumental neutron activation analysis. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 217: 111-115.
- Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M., del Río, L.A. & Romero-Puertas, M.C.** 2009. Reactive Oxygen Species and Signaling in Cadmium Toxicity. In: L.A. del Río & A. Puppo (Ed). 2009. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. p. 175-190.
- Sant'Anna, S.M.R.** 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Shaw, A.J.** 1990. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. 1 ed. CRC Press, Florida.

- Silva, A.C., Vidal, M. & Pereira, M.G.** 2001. Impactos ambientais causados pela mineração e beneficiamento de caulim. *Revista Escola de Minas* 54: 64-72.
- Soares, A.M.S. & Machado, O.L.T.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas* 1: 9-19.
- Soares, E.R., Mello, J.W.V., Costa, L.M. & Corrêa, M.L.T.** 1997. Drenagem ácida em materiais provenientes da mineração de carvão, de Candiota-RS. *Geonomos* 5: 67-72.
- Tavares, A.R., Giampaoli, P., Kanashiro, S., Aguiar, F.F.A. & Chu, E.P.** 2008. Efeito da adubação foliar com  $\text{KNO}_3$  na aclimatização de bromélia cultivada *in vitro*. *Horticultura Brasileira* 26: 175-179.
- Tavares, T.M.** 1992. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. *Química Nova* 15: 147-154.
- Townsend, C.R., Begon, M. & Harper, J.L.** 2006. Fundamentos em Ecologia. 2 ed. Artmed Ltda, Porto Alegre.
- Tucci, C.E.M.** 2003. Drenagem Urbana. *Ciência & Cultura* 55: 36-37.
- UN.** 2007. World Population Prospects: The 2006 Revision. United Nations, New York.
- Vervaeke, I., Parton, E., Deroose, R. & De Proft, M.P.** 2002. Controlling prefertilization barriers by *in vitro* pollination and fertilization of Bromeliaceae. *Acta Horticulturae* 572: 21-28.
- Vinterhalter, B. & Vinterhalter, D.** 1994. True-to-the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker. *Scientia Horticulturae* 57: 253-263.
- Wannaz, E.D. & Pignata, M.L.** 2006. Calibration of four species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry* 53: 185-209.
- Willadino, L., Pereira, J.S. & Câmara, T.R.** 2001. Ajuste de protocolo para micropropagação de variedades selecionadas de acerola. *In: Resumos do 17º Congresso Brasileiro de Fruticultura de Belém, Pelotas.* Disponível em: [http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais\\_xvii\\_cbf/propagacao/326.htm](http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/propagacao/326.htm).

## **Capítulo 2**

**Respostas biométricas e bioquímicas de plantas de *Aechmea blanchetiana* submetidas a diferentes concentrações contaminantes de cobre em cultivo *in vitro***

## 1. Introdução

O cobre (Cu) é elemento essencial às plantas, estando associado com enzimas envolvidas em reações de redox, nos mecanismos de transferência de elétrons e transformação de energia (Taiz & Zeiger 2002). O metal situa-se em 26º lugar em abundância na litosfera, encontrando-se adsorvido em partículas do solo e, portanto, é um dos metais traço menos disponíveis para absorção radicular (Martínez 1991). As concentrações normais de cobre (Cu) no ambiente são baixas (20-30 mg kg<sup>-1</sup> em solos não contaminados e menos de 2 µg kg<sup>-1</sup> em águas naturais). Em solos e águas contaminadas, contudo, já foram registrados respectivamente 2000 mg kg<sup>-1</sup> e 500-2000 µg kg<sup>-1</sup> (Fernandes & Henriques 1991), sendo que foram encontradas quantidades significativas de cobre em extratos aquosos da região metropolitana de São Paulo (Bourote *et al.* 2006). A Resolução Conama 357/2005 sugere como limite máximo a concentração de 0,000009 g L<sup>-1</sup> de Cu para águas doces Classe I, destinadas ao consumo e à recreação. Por apresentar massa específica superior a 5 g cm<sup>-3</sup> o cobre é considerado metal pesado que, ao contrário de poluentes orgânicos, não pode ser quimicamente degradado ou biodegradado por microorganismos (Mazen 2004).

Íons de cobre são dispersos por fontes naturais, como o intemperismo de rochas e as emissões vulcânicas, ou antropogênicas, como emissão de fumaças de veículos automotores, uso de fungicidas, mineração e atividades metalúrgicas (Nogueira 2006). O desgaste de pastilhas de freios e pneus, por exemplo, é responsável pelo aporte anual de 932 toneladas de cobre nos lençõs freáticos da Alemanha (Hillenbrand *et al.* 2005).

Uma fração de miligrama do cobre é tão indispensável para o desenvolvimento de plantas quanto, por exemplo, centenas de miligramas de potássio (K) (Arnon & Stout 1939). A fixação eficiente de nitrogênio em nódulos vegetais é dependente da presença de níveis adequados de cobre (Bond & Hewiet 1967). O íon de cobre atua como co-fator em muitas enzimas como o Cu/Zn superóxido dismutase (SOD), citocromos e algumas oxidases (Yruela

2005), participa da defesa contra patógenos, estando diretamente envolvido na lignificação das paredes celulares (Shingles *et al.* 2004), se liga ao ácido tartárico e atua como co-fator do receptor de etileno nas plantas (Taiz & Zeiger 2002).

As plantas apresentam em média 6,0 mg Cu Kg<sup>-1</sup> de massa seca de parte aérea (Epstein & Bloom 2006; Fernandes 2006) e sua deficiência pode causar a produção de folhas verde escuras, com possíveis pontos necróticos nas pontas de folhas jovens e, posteriormente, estendendo-se ao longo das margens. Plantas com extrema deficiência de cobre apresentam abscisão prematura de folhas (Taiz & Zeiger 2002). Em bromélias foram observados teores entre 6,0-25,0 mg Kg<sup>-1</sup> de massa seca de cobre (Jones *et al.* 1991; Benzing 2000; Kanashiro 2005).

Os efeitos deletérios do cobre em plantas atingem os tecidos quando presente em níveis maiores que o ótimo, induzindo uma variedade de efeitos bioquímicos e distúrbios metabólicos, como diminuição de crescimento e possíveis anomalias de desenvolvimento (Fernandes & Henriques 1991; Mazen 2004), redução de biomassa e sintomas cloróticos (Yruela 2005) e influencia na absorção de outros metais (Fernandes 2006). Marsola *et al.* (2005) observaram que o cobre apresenta efeito antagônico na absorção de manganês em plantas de *Phaseolus vulgaris* L. Segundo Hallwell & Gutteridge (1989) e Bray *et al.* (2000), distúrbios estruturais, metabólicos e fisiológicos em células vegetais, conseqüentes da toxidez por metais pesados em plantas, podem ser decorrentes do estresse oxidativo provocado pelo aumento da produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs), as quais reagem com moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucléicos.

O cobre faz parte da composição da enzima Cu/Zn SOD, componente do sistema antioxidante das plantas, relacionada com a dismutação de radicais superóxidos (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) em moléculas menos reativas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contudo, as EAOs O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem gerar radicais potencialmente perigosos de hidroxilas (OH), por meio da reação de Haber-Weiss, na presença de íons metálicos como o Cu (Apel & Hirt 2004).



Plantas que sobrevivem em ambientes contaminados por metais sem alterar seu desenvolvimento, podem agir como indicadoras bioacumulativas, acumulando poluentes atmosféricos do ambiente sem necessariamente apresentar respostas visíveis, mas, pela análise de seus tecidos, é possível estimar as concentrações ambientais dos poluentes (Mulgrew & Williams 2000).

O acúmulo e a distribuição de metais pesados nas plantas dependem da espécie, da disponibilidade do elemento, capacidade redox do elemento, pH do substrato e capacidade de troca catiônica do meio, oxigênio dissolvido, temperatura e secreção das raízes (Cheng 2003). A disponibilidade de cobre é maior em solos com pH ácido (5,0-5,5) e, embora a raiz seja a parte da planta mais indicada para monitorar a contaminação do solo por cobre, já que normalmente apresenta maior acúmulo do elemento, o cobre pode ser absorvido pelas folhas com alta eficiência (Taiz & Zeiger 2002; Marsola *et al.* 2005). Os níveis críticos de toxidez e a sintomatologia da fitotoxidez de cobre em bromélias ainda são desconhecidos.

Bromélias do gênero *Tillandsia* são consideradas biomonitoras por acúmulo de metais, inclusive para cobre, sendo utilizadas em trabalhos na área metropolitana de São Paulo (Nogueira 2006) e Argentina (Wannaz & Pignata 2006; Bermudez *et al.* 2009). Recentemente novas espécies de bromélias têm sido estudadas como biomonitores de acúmulo de metais, incluindo os gêneros *Vriesea*, *Aechmea*, *Billbergia* e *Canistropis* (Elias *et al.* 2006).

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material biológico

Os estudos foram realizados nos laboratórios das Seções de Plantas Ornamentais e Ecologia do Instituto de Botânica, São Paulo, SP e no Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP.

As plantas utilizadas foram obtidas por meio da germinação de sementes de *Aechmea blanchetiana* adultas pertencentes à coleção de bromélias da Seção de Plantas Ornamentais, coletadas em 18 de Dezembro de 2007. A extração das sementes foi realizada a partir de frutos maduros (Figura 1A), com retirada do tegumento (Figura 1B) e posterior lavagem em água deionizada visando à retirada da mucilagem (Figura 1C).

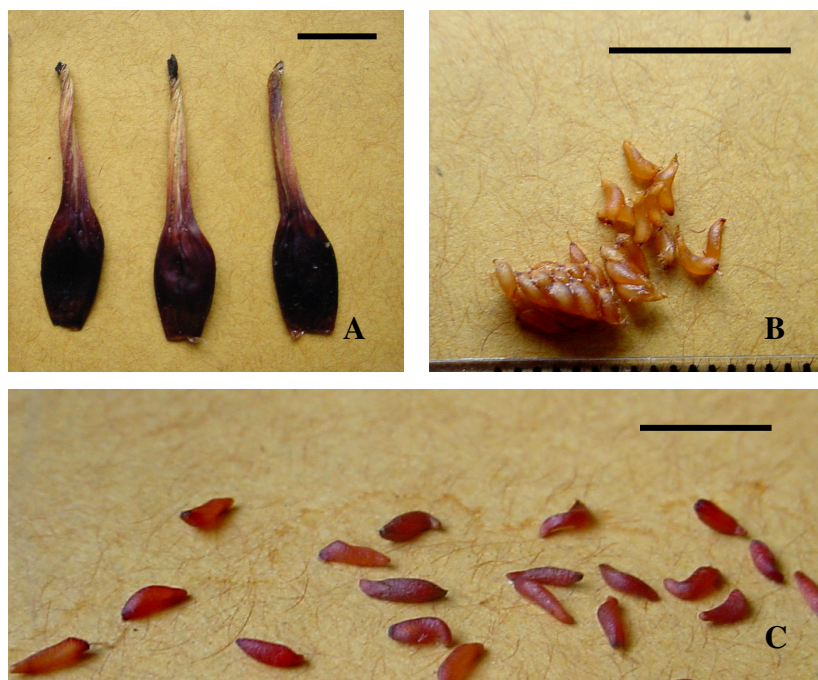


Figura 1. Frutos (A), sementes com mucilagem (B) e sementes após lavagem em água deionizada (C) de *A. blanchetiana* (— = 1,0 cm).

As sementes foram submetidas à desinfestação, em câmara de fluxo laminar, com hipoclorito de sódio (solução comercial 1,5%) na concentração de 100% v v<sup>-1</sup>, por 30

minutos, sob agitação constante, seguida de três lavagens com água deionizada estéril. As sementes foram inoculadas em frascos com 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog 1962) modificado (metade da concentração de macronutrientes) acrescido de 30,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico (Sigma) e pH ajustado para 5,8 ± 0,2.

As culturas foram transferidas para sala de crescimento e mantidas à temperatura de 25 °C ± 3, fotoperíodo de 16 horas de claro e irradiância de 32 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

## 2.2. Métodos analíticos

Plantas de *A. blanchetiana* com 210 dias de cultivo (tempo zero) oriundas das sementes germinadas *in vitro*, apresentando de 7 (± 1) folhas, 6,0 (± 0,98) cm de comprimento foliar, 0,1217 (±0,0520) g de massa de matéria fresca foliar, 0,0072 (± 0,0033) g de massa de matéria seca foliar, 1,58 (±0,36) mm de diâmetro caulinar, 4 (± 1) raízes, 2,24 (±0,87) cm de comprimento da maior raiz, 0,0227 (±0,0098) g de massa de matéria fresca radicular e 0,0026 (±0,0013) g de massa de matéria seca radicular, foram transferidas, em câmara de fluxo laminar, para frascos de vidro transparentes com capacidade de 150 mL contendo 50 mL das soluções dos tratamentos.

Os tratamentos consistiram do meio MS modificado (metade da concentração de macronutrientes) acrescido de 30 g de sacarose, pH ajustado para 5,2 (± 0,2), esterilizados por 20 minutos em autoclave a 121 °C e 1 atm e com diferentes concentrações de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Tabela 1), utilizando como referência o limite máximo de cobre recomendado pela resolução Conama 357/2005 para água doce - Classe I. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento (Figura 2) a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas de claro e 32 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiância (PAR).

Tabela 1. Concentrações das soluções de cobre utilizadas nos meios de cultivo *in vitro* de plantas de *A. blanchetiana*.

| Tratamento<br>Cu ( $\mu\text{M}$ ) | Concentração de<br>Cu ( $\text{g L}^{-1}$ ) | Concentração de<br>$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ( $\text{g L}^{-1}$ ) |
|------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,0                                | 0,0                                         | 0,0                                                                                |
| 0,145*                             | 0,0000092                                   | 0,00003635                                                                         |
| 1,45                               | 0,000092                                    | 0,0003635                                                                          |
| 14,5                               | 0,00092                                     | 0,003635                                                                           |

\* limite máximo aceito pela resolução Conama 357/2005 para água doce - Classe I.

Os frascos foram agitados manualmente, três vezes por semana, e a renovação do meio foi feita 45 dias após o início do experimento. Após 130 dias de exposição aos tratamentos, as plantas foram avaliadas quanto aos parâmetros biométricos e bioquímicos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 repetições (frascos) por tratamento, cada frasco contendo 6 plantas, sendo, desta forma, utilizadas 120 plantas por tratamento, totalizando 480 plantas no experimento.

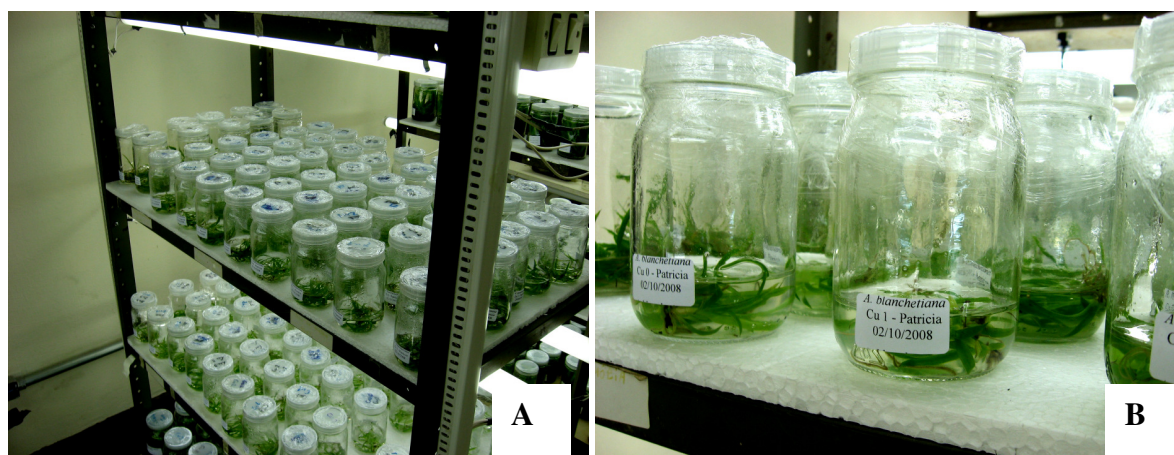


Figura 2. Câmara de crescimento da Seção de Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica (A). Plantas de *Aechmea blanchetiana* inoculadas nos tratamentos em meio MS líquido (B).

### 2.3. Avaliações Biométricas

Foram avaliadas as variáveis: número de folhas, altura das plantas (medida entre a base do caule e a extremidade superior da maior folha), número de raízes (> 1,0 cm), comprimento da maior raiz, diâmetro do caule e massas de matéria fresca e seca da parte aérea e raízes.

### 2.4. Análises bioquímicas e químicas

Para a confecção das análises de antioxidantes nos tecidos foliares das plantas de *A. blanchetiana*, foram previamente testados os métodos utilizados para a análise em folhas de *Nicotiniana tabacum* Bel (W3) e *Ipomoea nil* Scarlet O'Hara, com o intuito de adaptar um protocolo de análises para a espécie em estudo.

#### 2.4.1. Análises bioquímicas

*Ácido ascórbico (AA)* - Os teores de AA foram determinados utilizando-se o método de Keller & Schwager (1977), no dia em que as plantas foram retiradas dos tratamentos (130 dias). O método consistiu da trituração de cinco amostras de 0,5 g de massa fresca foliar em 12 mL de solução a  $2,01 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (0,75 g) de Na-EDTA (etileno diamina tetracético dissódico) e  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (0,5 g) de ácido oxálico, sendo, o extrato centrifugado a 18.000 rpm por 30 minutos na temperatura de 2 °C. A absorbância foi medida em comprimento de onda  $\lambda = 520 \text{ nm}$ , da alíquota do sobrenadante acrescida da solução de 2,6 diclorofenol-indolfenol sal de sódio dihidratado (reagente cromófago). Após a primeira leitura, foi adicionado 0,05 mL de ácido ascórbico 1%, tornando a amostra turbida. A concentração do ácido ascórbico foi calculada a partir da diferença entre as absorbâncias e expressa em  $\text{mg g}^{-1}$  de massa de matéria seca. As leituras foram realizadas em duplicata.

*Ascorbato peroxidase (APX)* - a atividade da APX foi avaliada em cinco amostras de matéria fresca da folha, por tratamento. O método consistiu na trituração de 0,5 g do tecido vegetal em uma solução de 5,0 mL de tampão de fosfato de potássio (100 mM, pH = 7,0) e

0,5 g de PVPP (polivinilpolipirrolidona) e posterior centrifugação a 10.000 rpm por 20 minutos a 2 °C. A atividade enzimática foi determinada após a adição de 700 µL do sobrenadante à solução tampão fosfato (80 mM, pH = 7,0) e EDTA (1 mM), preparada no dia da leitura, e posterior acréscimo de peróxido de hidrogênio (1 mM) e ácido ascórbico (5 mM), conforme descrito por Ramachandra-Reddy *et al.* (2004). As leituras foram realizadas em duplicata por espectrofotometria, em comprimento de onda  $\lambda = 290$  nm e os resultados expressos em  $\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de massa de matéria seca.

*Superóxido dismutase (SOD)* - A atividade de SOD foi determinada em cinco amostras de 0,5 g de massa de matéria fresca das folhas trituradas em solução de 5,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH = 7,0) e 0,5 g de PVPP. Os extratos resultantes foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 min a 2 °C. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente, em comprimento de onda  $\lambda = 560$  nm, utilizando 50 µL de sobrenadante adicionado a tubos de ensaios contendo 500 µL de EDTA, 500 µL de metionina, 950 µL de tampão fosfato de potássio, 500 µL de NBT e 200 µL de riboflavina (vitamina B2). Metade dos tubos de ensaio foi mantida no escuro e o restante sob luz por 15 minutos, em temperatura média de 25 °C. Para cada amostra foi feito o controle de escuro (500 µL de EDTA, 500 µL de metionina, 1000 µL de tampão fosfato, 500 µL NBT e 200 µL riboflavina e mantido no escuro) e o controle de claro (500 µL de EDTA, 500 µL de metionina, 1000 µL de tampão fosfato, 500 µL NBT e 200 µL riboflavina, mantido sob luz direta por 15 minutos) (Osswald *et al.* 1992). As leituras foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em  $\text{unid s}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de massa de matéria seca.

*Poliaminas* – Às amostras (triplicatas das 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> folhas de 6 plantas/frasco) de 0,4 g foram adicionados 1 mL da solução de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) gelado 5% (v v<sup>-1</sup>) por 60 minutos e centrifugadas à 10.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. À 200 µL do sobrenadante foram adicionados 400 µL de cloreto de dansila e 200 µL de carbonato de sódio (CaCO<sub>3</sub>) saturado, mantidos no escuro e a temperatura ambiente, por 16 horas. A seguir foram

adicionados 100 µL de prolina, permanecendo no escuro, à temperatura ambiente, por mais 30 minutos. Alíquotas de 40 µL foram aplicadas em placa de cromatografia de camada delgada (Gel 60G – Merck, 20 x 20 cm) e submetidas à separação em cubas contendo a solução clorofórmio:triethylamina (10:1). Os padrões de putrescina, espermidina e espermina foram submetidos ao mesmo processo. As poliaminas foram quantificadas, por espectroscopia de emissão de fluorescência (excitação em 350 nm e medida de emissão em 495 nm), no Video Documentation System, utilizando o programa Software Image Master, 2.0 (Flores & Galton (1982), modificado por Lima *et al.* (2006)). Os teores de poliaminas livres foram expressos em µg g<sup>-1</sup> de matéria seca.

#### **2.4.2. Análises da concentração de elementos minerais**

As análises dos elementos minerais foram realizadas em plantas inteiras (parte aérea + sistema radicular), secas em estufa de ar forçado a 70 °C, maceradas com pistilo e pulverizadas em moinho de bola de ágata. Os teores de macro (g kg<sup>-1</sup>) e micronutrientes (mg kg<sup>-1</sup>) foram determinados em triplicata (~12 plantas cada) por tratamento, segundo metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997), no Laboratório de Nutrição de Plantas, Departamento de Recursos Naturais/Ciência do Solo, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP.

#### **2.4.3. Análise do acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas**

A detecção do acúmulo de peróxido de hidrogênio nos tecidos foliares foi realizada segundo o método de Iriti *et al.* (2003), com modificações. Fragmentos de 1,0 cm<sup>2</sup> foram retirados da terceira folha expandida de quatro plantas (repetições) de cada tratamento e imersos em solução HCl com 0,1% de 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma), tendo o pH sido ajustado com NaOH para 5,6. Os fragmentos permaneceram na solução abrigados da luz a

temperatura ambiente, por 24 horas; posteriormente, foram transferidos para solução de etanol 96% fervente para a clarificação, visando a remoção total de clorofila.

Os fragmentos clarificados foram utilizados na confecção de lâminas semipermanentes e analisados em microscopia óptica com captação fotográfica (marca Olympus). O controle negativo (branco) foi constituído da solução de DAB suplementada com 10 mM de ácido ascórbico. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi visualiado pela presença de coloração marrom-avermelhada nos tecidos com acúmulo da molécula.

#### **2.4.4. Análise estatística**

As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade utilizando o Software Estatístico SISVAR (Ferreira 2000).



### 3. Resultados e Discussão

Neste estudo as maiores concentrações de cobre utilizadas correspondem a 10x e 100x superiores aos limites aceitos pelo Conama para águas Classe I. As concentrações foram baseadas em experimentos anteriores (pilotos), onde foram determinadas as concentrações letais de cobre para a espécie ( $> 1000 \mu\text{M}$  de Cu). Com o intuito de avaliar a fisiologia e bioquímica do sistema de defesa, e a tolerância de plantas de *A. blanchetiana*, o experimento foi realizado dentro da faixa tóxica, mas não letal à espécie em condições de cultivo *in vitro*.

#### 3.1. Análises Biométricas

Na Figura 3 estão relacionadas as médias obtidas para as variáveis biométricas da parte aérea de *A. blanchetiana*. Não houve diferenças significativas, entre os tratamentos, para todos as variáveis avaliadas relativas a parte aérea das plantas, indicando que a deficiência e as concentrações consideradas contaminantes (CONAMA 2005) de cobre, não alteraram o crescimento da parte aérea na espécie.

As maiores concentrações de cobre ( $1,45$  e  $14,5 \mu\text{M}$  de Cu) apresentaram efeito deletério para as variáveis: comprimento radicular e massa de matéria fresca das raízes (Figura 4). Entre os tratamentos utilizados, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no número e massa de matéria seca de raízes, apesar de existir a tendência de diminuição da quantidade de matéria seca das raízes com o aumento da concentração de cobre.

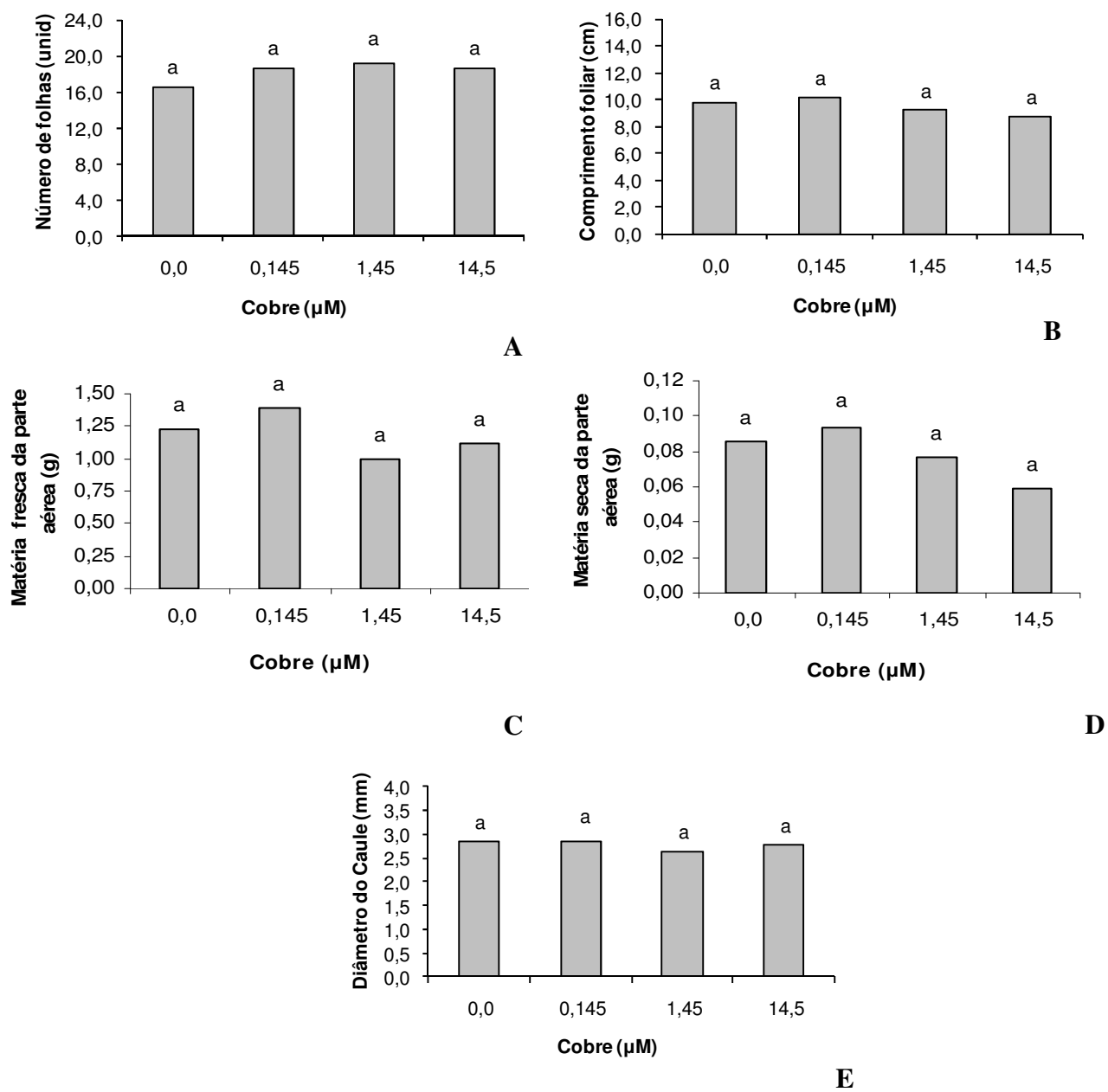


Figura 3. Médias do número de folhas (A), comprimento foliar (B), massa de matéria fresca (C) e seca (D) da parte aérea e diâmetro do caule (E) de plantas de *A. blanchetiana* cultivadas em diferentes concentrações de cobre. Letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

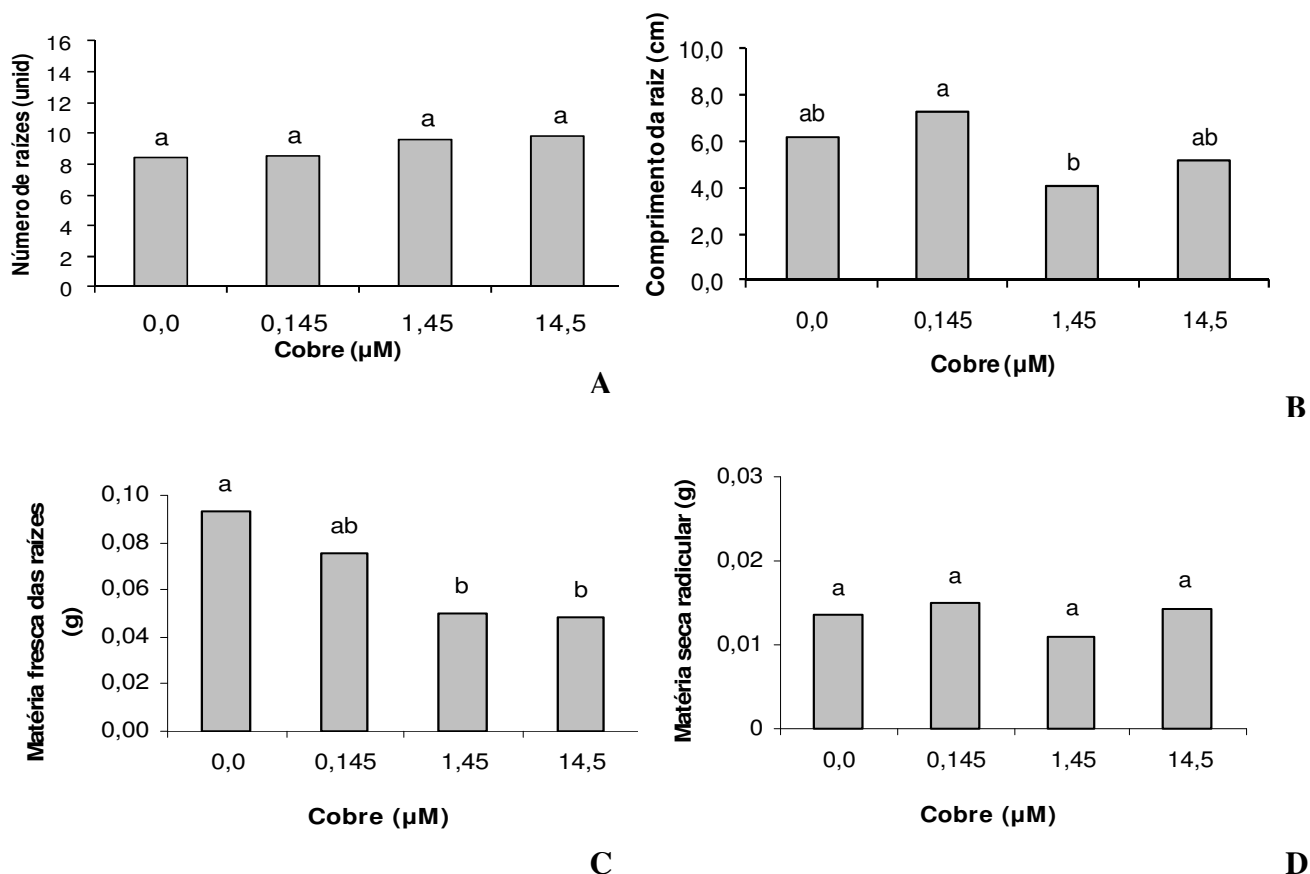


Figura 4. Médias do número de raízes (A), comprimento da raiz (B), massa de matéria fresca (C) e seca (D) das raízes de plantas de *A. blanchetiana* cultivadas em diferentes concentrações de cobre. Letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O excesso de cobre pode inibir o crescimento das plantas, causando clorose de folhas e aumentando o vazamento das membranas celulares da raiz (Shen *et al.* 1998; Murphy *et al.* 1999), induzindo à perda de vigor, escurecimento e paralisia no crescimento de raízes (Fernandes 2006). Plantas de trigo cultivadas em solos contaminados com cobre apresentaram redução de 58,5% do conteúdo de massa de matéria seca da parte aérea e 55,8% da massa de matéria seca das raízes (Athar & Ahmad 2002). Nas maiores concentrações de cobre, as plantas de *A. blanchetiana* não apresentaram diferenças significativas para a massa de matéria seca radicular e massa de matéria seca foliar, com tendência de diminuição com o aumento das concentrações do cobre. A membrana plasmática é a primeira estrutura a ser afetada pela toxidez por metais pesados, gerando o rompimento de sua estrutura e o vazamento do

conteúdo celular especialmente quando exposta ao cobre (Hall 2002). A menor produção de massa de matéria fresca radicular observada em plantas de *A. blanchetiana* cultivadas nos tratamentos 1,45 e 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu pode ser devido à danos na membrana gerado pela presença de cobre. Segundo Cuypers *et al.* (2002), a concentração de 15  $\mu\text{M}$  de Cu é fitotóxica para raízes de plantas de feijão, mas não letal quando expostas a curtos períodos (~11 dias).

Plantas de *A. blanchetiana* apresentaram menor comprimento radicular quando cultivadas em meios com concentrações acima da aceita pelo Conama (1,45 e 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu), semelhante aos resultados observados nas espécies *Eucalyptus maculata* Hook e *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, que apresentaram inibição do crescimento da raiz em meios contaminados com cobre (Soares *et al.* 2000). A ação mais evidente do metal nas raízes de *A. blanchetiana*, quando comparadas à parte aérea, pode estar relacionada à absorção de cobre principalmente na forma de  $\text{Cu}^{2+}$  por processo ativo, apresentando baixa mobilidade nas plantas (Fernandes 2006).

Os resultados evidenciam que, mesmo em concentrações consideradas inadequadas para o ambiente (1,45 e 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu), a espécie apresenta capacidade de manter o crescimento, mostrando incremento de 2-3 vezes das variáveis de crescimento em relação ao tempo zero e alto índice de sobrevivência. É provável que a espécie esteja imobilizando ou compartimentando o excesso de cobre, principalmente quando consideramos o tempo de exposição ao cobre. Plantas de milho podem tolerar e acumular altas concentrações de cobre sem apresentar mudanças morfológicas visíveis (Benimeli *et al.* 2009). As bromélias *Tillandsia capillaris*, *Tillandsia permutata* e *Tillandsia retorta* apresentaram os primeiros danos fisiológicos 6 meses após exposição, tendo apresentado capacidade aculadora para vários metais (Wannaz & Pignata 2006).

### 3.4. Teores de macronutrientes e micronutrientes

Os valores de macronutrientes minerais (N, P, K, Ca, Mg e S) nos tecidos de *A. blanchetiana* não diferiram entre os tratamentos (Figura 5), apresentando teores semelhantes ao observado por Kanashiro (2005). Não foi observada diferença estatística para os teores de micronutrientes (B, Fe, Mn e Zn) entre os tratamentos utilizados nas plantas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, com exceção dos teores de cobre (Figura 6). Os valores observados para os teores de cobre diferiram estatisticamente, apresentando os maiores valores no tratamento 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu (Figura 7).

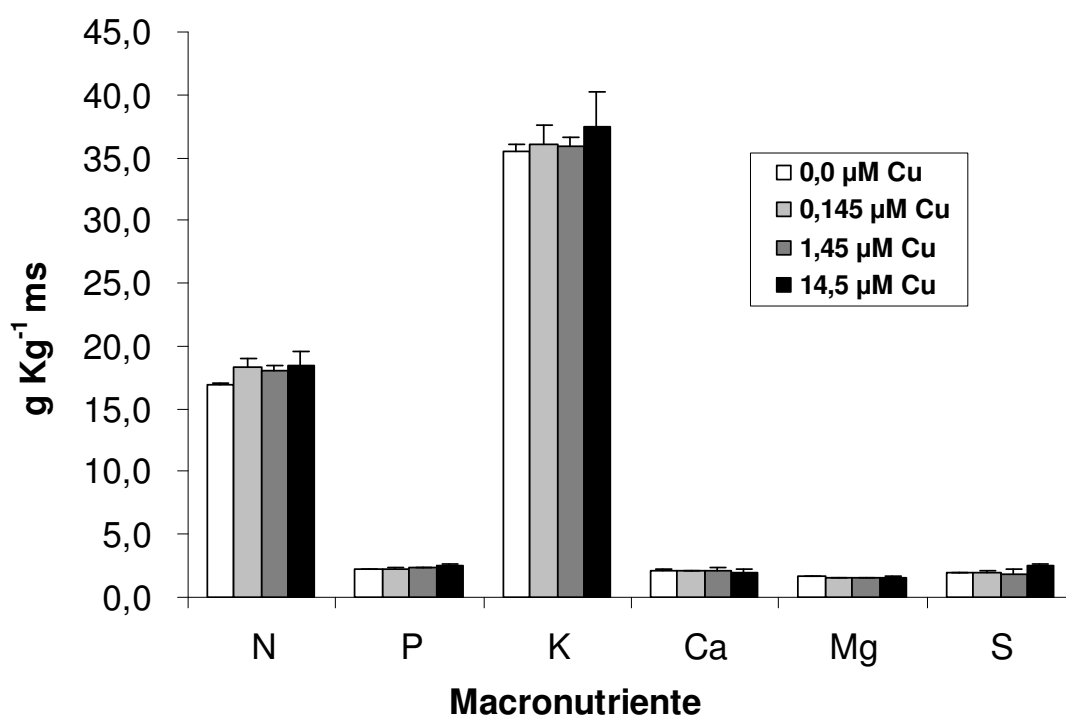


Figura 5. Teores dos macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) de plantas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes concentrações de cobre. (T- erro padrão).

Não foram observadas alterações significativas nos teores de micronutrientes nas plantas de *A. blanchetiana*, entretanto o manganês (Mn) e o zinco (Zn) apresentaram tendência de diminuição com o aumento das concentrações de cobre, com os menores teores

em plantas cultivadas em 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu. O cobre, quando em altas concentrações, apresenta a propriedade de inibir a absorção de outros elementos e competir pelos sítios de ligação de outros metais (Yruela 2005, Epstein & Bloom 2006, Fernandes 2006). O cobre apresenta inibição competitiva em relação ao zinco, diminuindo a absorção desse metal pela planta (Malavolta *et al.* 1997). Beckett & Davis (1978) observaram a redução da absorção de zinco em plantas de cevada cultivadas na presença de cobre em solução nutritiva; entretanto, Luo & Rimmer (1995) observaram o efeito oposto com a mesma espécie cultivada em solo contaminado, sugerindo que os efeitos sobre a interação dos metais variam de acordo com as concentrações e condições de contaminação.

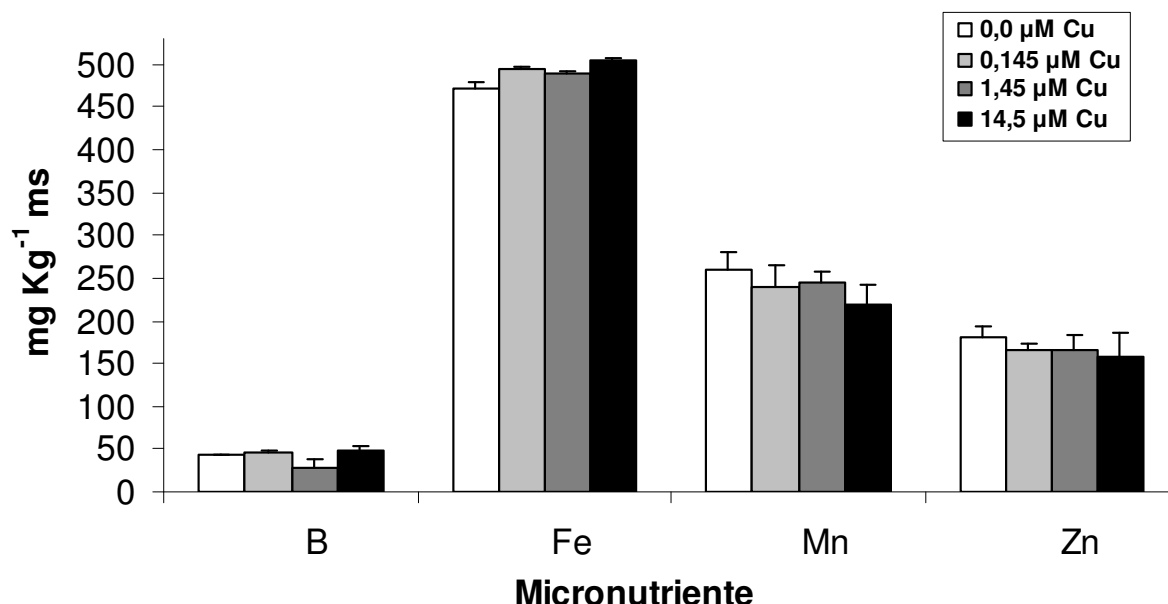


Figura 6. Teores dos micronutrientes boro (B), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) de plantas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* nas diferentes concentrações de cobre. (T - erro padrão).

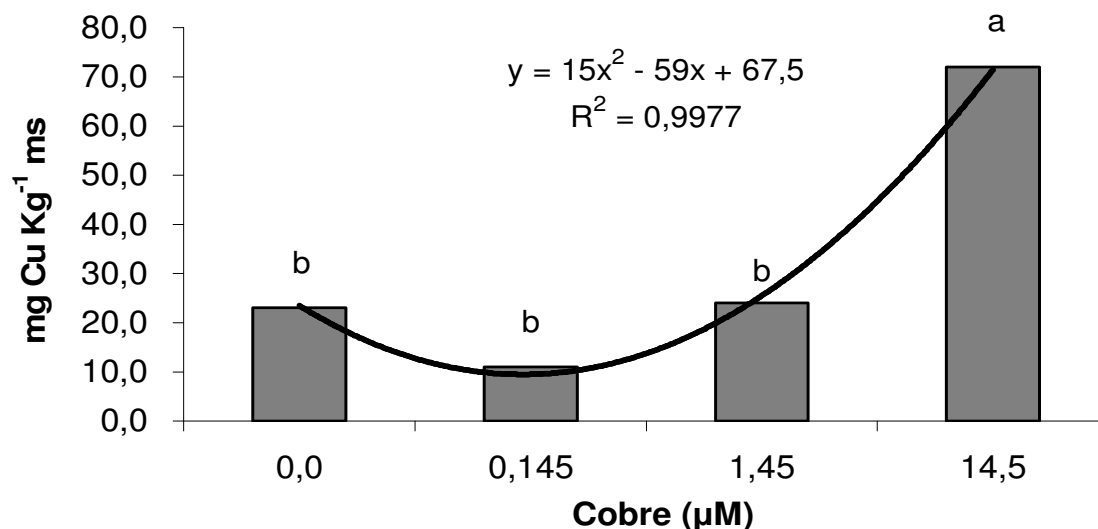


Figura 7. Teores de cobre ( $\text{mg Kg}^{-1}$  ms) em plantas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* submetidas as concentrações 0, 0,145, 1,45 e 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu. (Letras diferentes diferem estatisticamente,  $p < 0,05$ )

A concentração de 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, apresentando teores superiores a 70  $\text{mg de Cu Kg}^{-1}$  de massa de matéria seca (Figura 7) e indicando o acúmulo do metal pela espécie. A concentração de cobre nos tecidos vegetais é baixa, entre 2 e 20  $\text{mg Kg}^{-1}$  de massa de matéria seca, e, embora alguns estudos indiquem a translocação das folhas senescentes para as mais novas, acredita-se que o cobre não apresente alta mobilidade na planta (Epstein & Bloom 2006, Dechen & Nachtigall 2006). Plantas de milho apresentam capacidade de acúmulo de cobre quando a concentração do metal é aumentada, principalmente nas raízes e brotos (Benimeli *et al.* 2009). No feijão, o cobre, independentemente da concentração, é armazenado principalmente nas raízes e sua translocação para a parte aérea ocorre com a aplicação de zinco ao meio (Cuypers *et al.* 2002).

Nas concentrações 0, 0,145 e 1,45  $\mu\text{M}$  de Cu os teores de cobre nas plantas de *A. blanchetiana* não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, mas permaneceram na faixa considerada normal para as plantas, com média de 20  $\text{mg de Cu Kg}^{-1}$

de massa de matéria seca das plantas (raízes, folhas e caule). Kanashiro (2005) obteve resultados menores ao quantificar os nutrientes das folhas, com teores médios de 10,6 mg de Cu Kg<sup>-1</sup> de massa de matéria seca das folhas em plantas *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*. Plantas de *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker apresentam teores foliares entre 6-25 mg de Cu Kg<sup>-1</sup> de massa de matéria seca (Mills & Jones 1996, Jones *et al.* 1991), enquanto na bromélia *Ananas comosus* (L.) Merr. foram observados teores entre 10 e 20 mg de Cu Kg<sup>-1</sup> massa de matéria seca (Malavolta 1981, Mills & Jones 1996, Jones *et al.* 1991). Sanches (2009), avaliando os teores endógenos de metais de plantas de *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker fertirrigadas com soluções contendo diferentes concentrações de metais observou que o teor de cobre se manteve constante nas folhas ao longo do desenvolvimento da planta, no caule houve um aumento de 10% nos teores endógenos e nas raízes ocorreu uma redução de 10% nos teores de cobre. O autor concluiu que a espécie acumula 50% do total de cobre nas folhas, 28% nos caules e 22% nas raízes; sendo o caule o principal órgão de dreno de cobre, apresentando a maior proporção entre teores de cobre endógenos e massa seca.

### 3.2. Acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos foliares

O aumento das concentrações de cobre está associado ao acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), havendo maior intensidade da coloração pela técnica de DAB na face abaxial da epiderme e no mesofilo de *A. blanchetiana* nos tratamentos 1,45 e 14,5 µM de Cu (Figura 8). Não foi observado acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na face adaxial das plantas cultivadas em todos os tratamentos (Figura 8B). Plantas cultivadas no meio MS com 0,0 e 0,145 µM de Cu não apresentaram acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos avaliados assemelhando-se ao branco (Figura 8A, 8C e 8D). A ausência de acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas plantas tratadas com 0,145 µM de Cu deve-se provavelmente à proximidade da concentração de cobre do tratamento com a do meio nutritivo MS (0,100 µM de Cu), o que não caracteriza situação de estresse.



Plantas cultivadas no meio MS com 1,45  $\mu\text{M}$  de Cu apresentaram acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas paredes celulares e no aparelho estomático (ostíolos e células guardas) (Figura 8E). No tratamento 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi observado na parede celular,ostíolos, células guardas e nas células do mesofilo (Figura 8F).

A ausência de acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na face adaxial de folhas de *A. blanchetiana* pode estar relacionada com a ausência de escamas ou estômatos nessa face da folha. Segundo Appezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro (2003), as bromélias absorvem água e nutrientes principalmente pelas escamas, sendo essas estruturas o primeiro contato com o metal do meio ambiente.

Plantas de *Betula pendula* Roth expostas ao ozônio apresentam acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  principalmente nas células do parênquima paliçádico e o acúmulo contínuo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocorreu em locais onde posteriormente apareceram danos visíveis (Pellinen *et al.* 1999). Langebartels *et al.* (2002) constataram que o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em cultivares de tabaco e tomate ocorre no espaço extracelular, ao redor das células paliçádicas, que correspondem aos sítios onde ocorre morte celular; estes dados podem indicar que, nas plantas de *A. blanchetiana*, as áreas de acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,45 e 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu) podem apresentar danos futuros.

As enzimas antioxidantes e metabólitos desempenham papel fundamental na manutenção dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  elevados o suficiente para garantir a transdução de sinal para ativar os genes de defesa (Levine *et al.* 1994), mas não altos para induzir danos oxidativos (Ranieri *et al.* 2003). Hung *et al.* (2005) sugerem que as moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  interagem com receptores na superfície das plantas de feijão iniciando um sinal para o desenvolvimento de tolerância e que sua ação no mesofilo pode ser facilitada pelo seu acesso através dos estômatos. O cobre pode desencadear a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por ação direta na reação de Haber-Weiss (Apel & Hirt 2004) e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem papel regulatório no desenvolvimento de resistência a estresses ambientais e patógenos (Rao *et al.* 1997), contudo, ainda não está claro como os sinais derivados do  $\text{H}_2\text{O}_2$  são percebidos e propagados (Soares & Machado 2007).

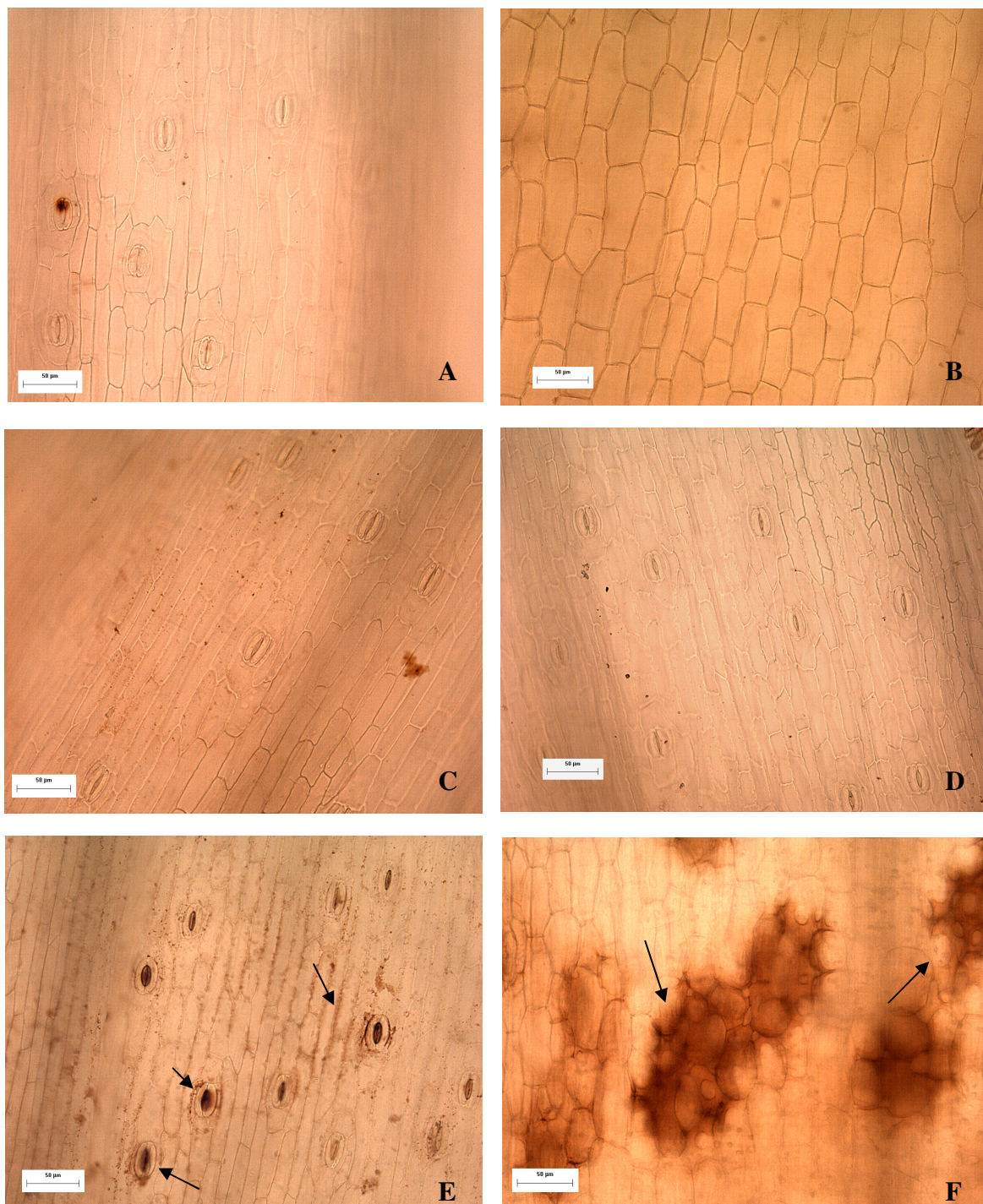


Figura 8. Técnica de coloração por DAB utilizada em folhas de *A. blanchetiana* submetidas a diferentes concentrações de cobre. A: branco; B: face adaxial da folha; C: face abaxial da epiderme foliar (0,0  $\mu\text{M}$  de Cu); D: face abaxial da epiderme foliar (0,145  $\mu\text{M}$  de Cu); E: ostíolos e paredes celulares com acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na face abaxial da epiderme foliar (1,45  $\mu\text{M}$  de Cu); F: mesofilo das folhas (14,5  $\mu\text{M}$  de Cu).

A presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no apoplasto e nas células do mesofilo de plantas de *A. blanchetiana*, associada à ausência de danos visíveis ao final do experimento, indicam que o

tempo de exposição foi insuficiente para gerar danos nos tecidos. Wannaz & Pignata (2006) ao exporem a bromélia *Tillandsia tricholepis* Baker a vários locais próximos à emissão de material particulado, observaram danos macroscópicos apenas 6 meses de exposição.

### 3.3. Análises Bioquímicas

#### *Antioxidantes*

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da APX de plantas de *A. blanchetiana* em todos os tratamentos (Figura 9A), enquanto que a atividade da SOD e os teores de AA apresentaram alterações em função dos diferentes tratamentos. A maior atividade de SOD foi observada no tratamento 0,145  $\mu\text{M}$  de Cu (Figura 9B), sendo este tratamento equivalente a concentração utilizada no meio nutritivo MS. Os tratamentos 0,0, 1,45 e 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu induziram menor atividade da superóxido dismutase (SOD) nas plantas. Os resultados observados para os teores de ácido ascórbico (AA) diferiram estatisticamente, embora tenha variado pouco entre os tratamentos, sendo o maior valor observado em plantas cultivadas no tratamento 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu (Figura 9C).

A atividade da enzima APX não foi alterada com o aumento das concentrações de cobre no meio, podendo ser associada à presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos tecidos foliares de plantas cultivadas nas maiores concentrações, uma vez que a enzima APX atua na neutralização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ranieri *et al.* 2003). As várias isoenzimas de APX identificadas em plantas superiores e presentes em diferentes compartimentos subcelulares, apresentam elevada afinidade com moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Qin *et al.* 2008), entretanto, em plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. o aumento dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi independente de alterações nas atividades de catalase e ascorbato peroxidase, estando relacionado com o aumento da atividade da isoforma da enzima Cu/Zn-SOD (Rao *et al.* 1997).

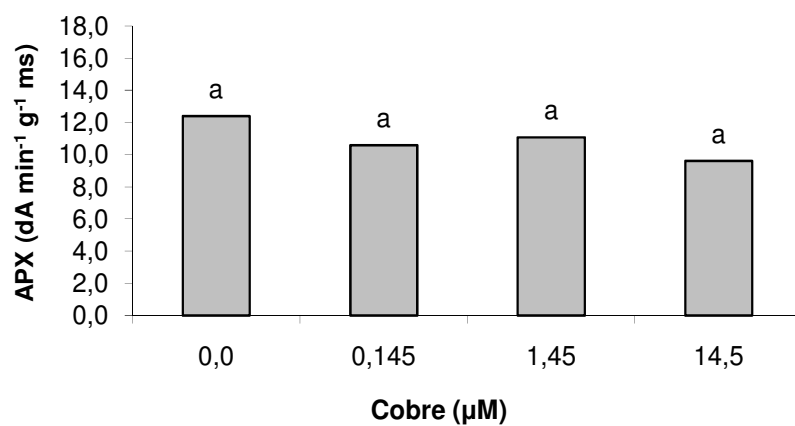
A atividade da SOD em plantas de *A. blanchetiana* não apresentou relação direta com o aumento da concentração do cobre, entretanto os valores são altos quando comparados à

atividade observada para espécies tolerantes, utilizadas como indicadoras de poluição como, por exemplo, a *Psidium guajava* L. cv. Paluma (Dias *et al.* 2007). Segundo Bray *et al.* (2000), plantas tolerantes a altas concentrações de metais tendem a mostrar níveis basais mais altos dos antioxidantes.

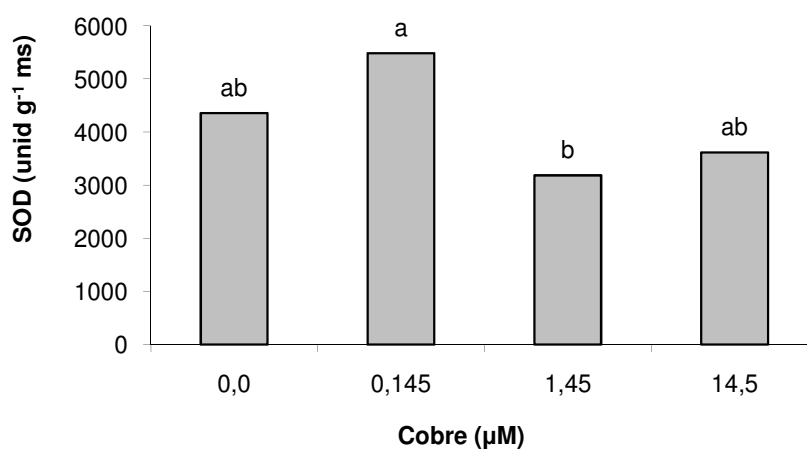
Plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Maksymiec & Krupa 2006) e *Hydrilla verticillata* L. (Panda & Khan 2004) cultivadas em altas concentrações de cobre apresentaram elevada atividade da SOD nos tecidos vegetais; entretanto, exposições de longa duração ao cobre comprometem a ação da SOD sobre as EAOs, provavelmente devido ao excesso do metal induzir a formação de EAOs, que podem alterar a função da enzima (Chamseddine *et al.* 2009). A menor atividade da SOD nas plantas tratadas com 1,45 e 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu pode estar relacionada com o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos tecidos, observados com a técnica de coloração por DAB, nessas concentrações.

Bulbovas (2005) observou diferentes respostas antioxidantes em plantas de *Caesalpinia echinata* Lam. expostas ao  $\text{O}_3$  e concluiu que estas diferenças foram em função de variações sazonais nos fatores do ambiente. As plantas de *A. blanchetiana* permaneceram em ambiente controlado, com temperatura e umidade constantes, indicando que as concentrações de cobre não foram suficientes para gerar variação significativa nos teores de AA e na atividade da APX.

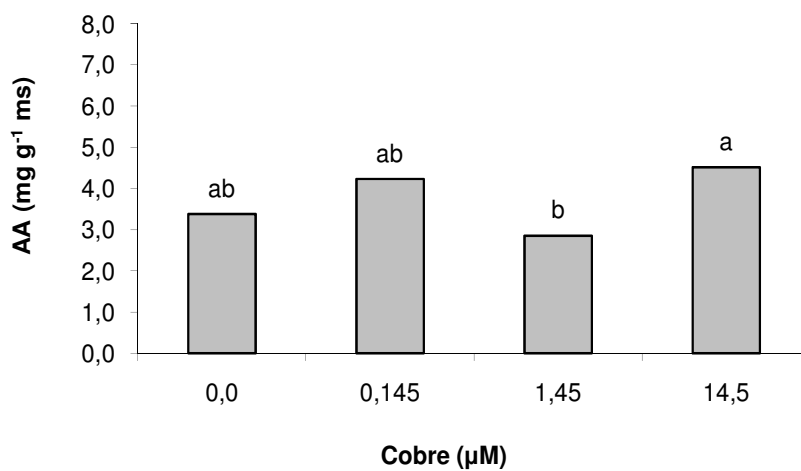
Plantas de *Mentha pulegium* L. submetidas ao estresse por cobre aumentaram significativamente a atividade de todas as enzimas oxidantes, sendo considerada evidência da intensificação da produção de EAOs pela reação de Haber-Weiss, o que levou ao aumento máximo dos níveis de oxidação lipídica (LPO) (Panda & Khan 2004). Para as plantas de *A. blanchetiana* a pouca alteração do sistema antioxidante pode indicar o uso de mecanismos alternativos de tolerância ao metal, pela espécie. Segundo Epstein & Bloom (2006), por ser potencialmente tóxico, o cobre em excesso se liga a fitoquelatinas, peptídios contendo enxofre e derivados da glutatona que o complexam quimicamente.



**A**



**B**



**C**

Figura 9. Atividade da ascorbato peroxidase, APX (A), superóxido dismutase, SOD (B) e teores de ácido ascórbico, AA (C) em plantas de *A. blanchetiana* cultivadas em diferentes concentrações de cobre. Letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### *Teores de Poliaminas*

Os resultados dos teores de putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) nas plantas de *A. blanchetiana* mostram que os valores de Spm foram superiores às demais poliaminas em todos os tratamentos. Não foi observado diferenças estatísticas significativa nas médias dos valores das poliaminas entre os tratamentos, contudo os teores de Spd diminuíram com o aumento da concentração de cobre, enquanto os teores de Put e Spm permaneceram estáveis entre os tratamentos, com a exceção dos teores de Spm nas plantas cultivadas em 14,5  $\mu\text{M}$  de Cu (Figura 10).

A biossíntese de poliaminas pode servir como resposta da planta ao estresse, seja pelo seu acúmulo ou pela diminuição ou mesmo uma leve alteração de seus teores endógenos, demonstrando que o metabolismo de poliaminas é alterado de diferentes maneiras pelo estresse (Liu *et al.* 2007). Os teores de Put podem ser modulados pela atividade fotossintética (Groppa *et al.* 2003), alteração de nutrientes como cálcio e potássio em *Tillandsia* (Wannaz & Pignata 2006) ou serem catabolizados, produzindo  $\text{H}_2\text{O}_2$  para sinalização e ativação do sistema antioxidante (Groppa & Benavides 2008). A Spd e a Spm contribuem para o aumento da tolerância das plantas a diferentes estresses (Lefreve *et al.* 2001), tendo sido atribuído um papel protetor a essas poliaminas, regulando a estabilidade e permeabilidade das membranas celulares ao interagir com moléculas carregadas negativamente e modular as cargas superficiais da membrana (Roy *et al.* 2005).

Em plantas de choupo (*Populus alba* L.) altas concentrações tóxicas de cobre não foram capazes de induzir a síntese de poliaminas rapidamente, acumulando poliaminas livres e conjugadas apenas com a exposição prolongada ao estresse e indicando que a toxicidade do cobre pode retardar a ativação da biossíntese de poliaminas (Franchin *et al.* 2007). Portanto, a diminuição dos teores de Spm nas plantas de *A. blanchetiana* cultivadas nas maiores concentrações de cobre, pode ser associada ao acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bem como, a um possível retardo na biossíntese de poliaminas.

Balestrasse *et al.* (2005) relataram que a variação de Spd e Spm em plantas de soja diferiu de acordo com os tecidos e as concentrações de cádmio e cobre utilizadas, não havendo relação entre a variação das Pas e a assimilação de nitrogênio nas plantas sob estresse. Em folhas de girassol, o conteúdo de Spd foi reduzido por ambos os metais (principalmente  $\text{Cu}^{2+}$ ), enquanto em folhas de trigo o  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  induziram a diminuição da concentração de Spm e não houve variação de Put. Estes resultados corroboram o fato de que o metabolismo de poliaminas não só é afetado pelo tipo de íon metálico ou estresse induzido, mas também depende das espécies de plantas estudadas (Groppa *et al.* 2003).

O efeito antioxidante das poliaminas ocorre devido a ligação entre seus ânions e cátions, envolvendo um radical com função de limpeza, e a capacidade para inibir tanto a peroxidação lipídica quanto as reações oxidativas catalisadas por metais. Alternativamente, o catabolismo das poliaminas produz  $\text{H}_2\text{O}_2$ , resultados que pode ser associado à presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos tecidos foliares das plantas de *A. blanchetiana* cultivadas nas concentrações acima da aceita pelo Conama (2005). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode agir como molécula de sinalização, que pode entrar na cadeia de transdução de sinal de estresse promovendo uma ativação de uma resposta de defesa antioxidante, ou, quando em grandes quantidades, pode atuar como um agente pro-oxidante (Bors *et al.* 1989, Groppa & Benavides 2008), ativando de sistemas de tolerância como o ciclo do ácido jasmônico (Soares & Machado 2007) ou o aumento de teores de HSPs (heat shock proteins), associadas à variâncias causadas pela presença de metais pesados (Hall 2002, Kulikova *et al.* 2009)

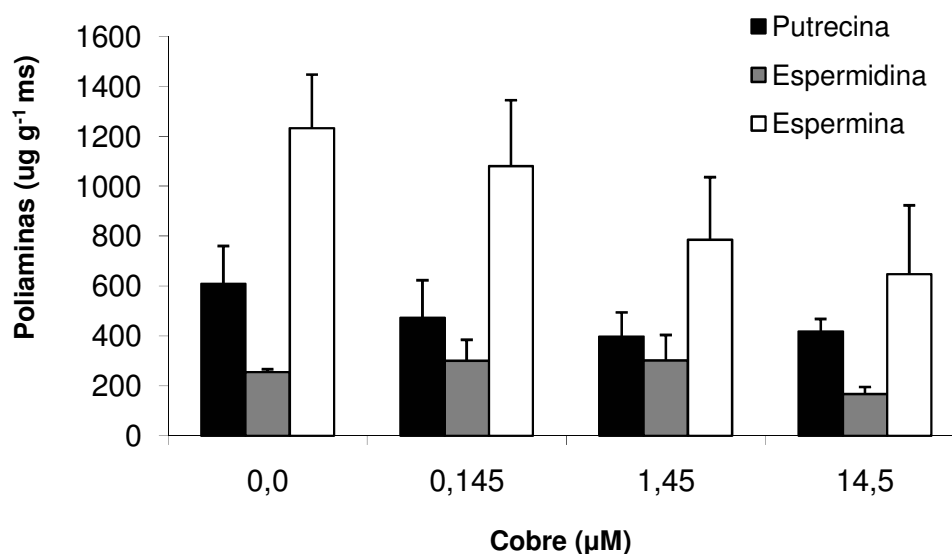


Figura 10. Teores foliares de putrecina, espermidina e espermina de plantas de *A. blanchetiana* cultivadas em diferentes concentrações de cobre. (T – erro padrão).

#### 4. Conclusões

A espécie *Aechmea blanchetiana* foi tolerante as concentrações de cobre utilizadas, não apresentando danos visíveis nas folhas, sendo que o tratamento 14,5 µM Cu apresentou efeito deletério sobre a massa de matéria fresca das raízes. O aumento na concentração de cobre não causou desequilíbrio nutricional nas plantas, ocorrendo acúmulo do elemento cobre apenas no tratamento 14,5 µM Cu, indicando a possível capacidade acumuladora da espécie.

A técnica de DAB evidenciou a presença do acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos foliares, com maior intensidade nas concentrações mais altas de cobre, indicando relação direta entre o aumento do cobre e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É possível que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esteja agindo como sinalizadora de oxidação antes do surgimento de sintomas visíveis ou ativação de sistemas de tolerância alternativos.

O acúmulo de cobre e a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos de *A. blanchetiana* não mostraram ser capazes de alterar significativamente o sistema antioxidante enzimático e os



teores de poliaminas, podendo estar havendo a ativação de outros mecanismos de tolerância não estudados neste trabalho.

## **5. Referências**

- Apel, K. & Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-379.
- Appenzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M.** 2003. Anatomia vegetal. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Arnon, D.I. & Stout, B.R.** 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology* 14: 371-375.
- Athar, R. & Ahmad, M.** 2002. Heavy metal toxicity: effect on plant growth and metal uptake by wheat, and on free living azotobacter. *Water, Air, and Soil Pollution* 138: 165-180.
- Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., Benavides, M.P. & Tomaro, M.L.** 2005. Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil* 270: 343-353.
- Beckett, P.H.T. & Davis, R.D.** 1978. The additivity of the toxic effects of Cu, Ni and Zn in young barley. *New Phytology* 81: 155-173.
- Benimeli, C.S., Medina, A., Navarro, C.M., Medina, R.B., Amoroso, M.J. & Gómez, M.I.** 2009. Bioaccumulation of copper by *Zea mays*: impact on root, shoot and leaf growth. *Water, Air, & Soil Pollution* (Online) DOI 10.1007/s11270-009-0259-6.
- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Parte II p. 52-77.

- Bermudez, G.M.A., Rodriguez, J.H. & Pignata, M.L.** 2009. Comparison of the air pollution biomonitoring ability of three *Tillandsia* species and the lichen *Ramalina celastri* in Argentina. *Environmental Research* 109: 6-14.
- Bond, G. & Hewitt, E.J.** 1967. The significance of copper for nitrogen fixation in nodulated *Alnus* and *Casuarina* plants. *Plant and Soil* 27: 447-449.
- Bourotte, C., Forti, M.C. Melfi, A. J. & Lucas, Y.** 2006. Morphology and solutes content of atmospheric particles in an urban and a natural area of São Paulo, Brazil. *Water, Air and Soil Pollution* 170: 301-316.
- Bors, W., Langebartels, C., Michel, C. & Sandermann, H.** 1989. Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* 28: 1589-595.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. *In*: B.B. Buchanan, W. Gruissen & R.L. Jones (eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, New York, pp. 1158-1203.
- Bulbovas, P.** 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras de resistência da espécie à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Chamseddine, M., Wided, B.A., Guy, H., Marie-Edith, C. & Fatma, J.** 2009. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. *Plant Growth Regulation* 57: 89-99.
- Cheng, S.** 2003. Heavy metals in plants and phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research-International* 10: 335-40.
- Conama 2005.** Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>
- Cuypers, A., Vangronsveld, J. & Clijsters, H.** 2002. Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* copper and zinc phytotoxicity: a comparison. *Journal of Plant Physiology* 159: 869-876.

- Dechen, A.R. & Nachtigall, G.R.** 2006. Micronutrientes. *In*: M.S., Fernandes (ed). 2006. Nutrição Mineral de Plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, pp. 327-354.
- Dias, A.P.S., Pina, J.M., Rinaldi, M.C.S. & Moraes, R.M.** 2007. Atividade de Antioxidantes em Folhas de *Psidium guajava* 'Paluma' em Diferentes Estágios de Maturação Expostas ao Ozônio. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 15-17.
- Elias, C., De Nadai Fernandes, E.A., França, E.J. & Bacchi, M.A.** 2006. Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica. *Biota Neotropica* 6. <http://www.biotaneotropica.org.br/v6n1/pt/abstract?article+bn02106012006> (acesso em 23.11.2009).
- Epstein, E. & Bloom, A.J.** 2006. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Londrina: Editora Planta. 403p
- Fernandes, J.C. & Henriques, F.S.** 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review* 57: 246-273.
- Fernandes, M.L.** 2006. Nutrição Mineral de Plantas. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Viçosa.
- Ferreira, D.F.** 2000. Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas. <http://www.dex.ufla.br/~danielff/sisvarmanual.pdf> (acesso em 20.08.2009).
- Flores, H.E. & Galston, A.W.** 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiology* 69: 701-706.
- Franchin, C., Fossati, T., Pasquini, E., Lingua, G., Castiglione, S., Torrigiani, P. & Biondi, S.** 2007. High concentrations of zinc and copper induce differential polyamine responses in micropropagated white poplar (*Populus alba*). *Physiologia Plantarum* 130: 77-90.

- Groppa, M.D. & Benavides, M.P.** 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.
- Groppa, M.D., Benavides, M.P. & Tomaro M.L.** 2003. Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Science* 164: 293-299.
- Hall, J.L.** 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.
- Hallwell, B. & Gutteridge, J.M.C.** 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.
- Hillenbrand, T., Toussaint, D., Böhm, E., Fuchs, S., Scherer, U., Rudolphi, A., Hoffmann, M., Kreißig, J. & Kotz, C.** 2005. Einträge von Kupfer, Zink und Blei in Gewässer und Böden - Analyse der Emissionspfade und möglicher Emissionsminderungsmaßnahmen. UBA-FB 000824, Dessau.
- Hung, S., Yu, C. & Lin, C.H.** 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46: 1-10.
- Iriti, M., Rabotti, G., Ascensão, A. & Faoro, F.** 2003. Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4308-4314.
- Jones Jr. J.B., Wolf, B. & Mills, H.A.** 1991. *Plant Analysis Handbook: a practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide*. Micro-Macro Publishing, Athens.
- Kanashiro, S.** 2005. Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Keller, T. & Schwager, H.** 1977. Air pollution and ascorbic acid. *European Journal of Forest Pathology* 7: 338-350.
- Kulikova, A.L., Kholodova, V.P. & Kuznetsov V.V.** 2009. Actin is involved in early plant responses to heavy metal stress and associates with molecular chaperons in stress environments. *Doklady Biological Sciences*, 424: 49-52.

- Langebartels C., Schraudner M., Heller W., Ernst D. & Sandermann H.** 2002. Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. *In*: D. Inzé & M. Van Montagu (eds.). *Oxidative Stress in Plants*. Taylor & Francis, London, pp. 105-135.
- Lefreve, I., Gratia, E. & Lutts, S.** 2001. Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). *Plant Science* 161: 943-952.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C.** 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593.
- Lima, G.P.P., Rocha, S.A., Tamaki, M. & Ramos, P.R.R.** 2006. Polyamines contents in some foods from Brazilian population basic diet. *Ciência Rural* 36: 1294-1298.
- Liu, J.H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. & Moriguchi, T.** 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology* 24: 117-126.
- Luo, Y. & Rimmer, D.L.** 1995. Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal-contaminated soil. *Environmental Pollution* 88: 79-83.
- Maksymiec, W. & Krupa, Z.** 2006. The effects of short-term exposure to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Experimental Botany* 57: 187-194.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. & Oliveira, S.A.** 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba, POTAFOS, 319p.
- Marsola, T., Miyazawa, M. & Pavan, M.A.** 2005. Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro em relação com o extraído do solo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9: 92-98.

- Martínez, J.B.** 1991. Cobre - Química. Gran Enciclopedia Rialp: Humanidades y Ciencia.  
[http://www.canalsocial.net/GER/ficha\\_GER.asp?id=10408&cat=quimica](http://www.canalsocial.net/GER/ficha_GER.asp?id=10408&cat=quimica) (acesso em 21.08.2009).
- Mazen, A.M.A.** 2004. Accumulation of four metals in tissues of *Corchorus olitorius* and possible mechanisms of their tolerance. *Biologia Plantarum* 48: 267-272.
- Mills, H.A. & Jones, J.B. Jr.** 1996. Plant analysis handbook II. Athen: Micro-macro Publishing. 422p.
- Mulgrew, A. & Williams, P.** 2000. Biomonitoring of air quality using plants. MARC, Berlin.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murphy, A.S., Eisinger, W.R., Shaff, J.E., Kochian, L.V. & Taiz, L.** 1999. Early copper-induced leakage of K<sup>+</sup> from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiology* 121: 1375-1382.
- Nogueira, C.A.** 2006. Avaliação da poluição atmosférica por metais na região metropolitana de São Paulo utilizando a bromélia *Tillandsia usneoides* como biomonitor. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Osswald, W.F., Kraus, R., Hippeli, S., Benz, B., Volpert, R. & Elstner, E.F.** 1992. Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Physiology* 139: 742-748.
- Panda S.K. & Khan, M.H.** 2004. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 115-118.
- Pellinen, R., Palva, T. & Kangasjärvi, J.** 1999. Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal* 20: 349-356.

- Qin, Y.M., Hu, C.Y. & Zhu, Y.X.** 2008. The ascorbate peroxidase regulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethylene is involved in cotton fiber cell elongation by modulating ROS homeostasis. *Plant Signaling & Behavior* 3: 194-196.
- Ramachandra-Reddy, A., Chaitanya K.V., Jutur, P.P. & Sumithra, K.** 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 52: 33-42.
- Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A. & Soldatini, G.F.** 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany* 54: 2529-2540.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P. & Watkins, C.B.** 1997. Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes (Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *Plant Physiology* 115: 137-149.
- Roy, P., Niyoki, K., Sengupta, D.N. & Ghosh, B.** 2005. Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress induced damage of plasma membrane and PM-bound H<sup>+</sup>-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science* 168: 583-591.
- Sanches, L.V.C.** 2009. Desenvolvimento de *Aechmea fasciata* (Bromeliaceae) em função de diferentes saturações por bases no substrato e modos de aplicação da fertirrigação. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.
- Shen, Z.G., Zhang, F.Q., & Zhang, F.S.** 1998. Toxicity of copper and zinc in seedlings of mung bean and inducing accumulation of polyamine. *Journal of Plant Nutrition* 21: 1153-1162.
- Shingles, R., Wimmers, L.E. & McCarty, R.E.** 2004. Copper transport across pea thylakoid membranes. *Plant Physiology* 135: 145-151.

- Soares, A.M.S. & Machado, O.L.T.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas* 1: 9-19.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2002. *Plant Physiology*. 3 ed. Sinauer Associates Inc. Publ., Sunderland.
- Wannaz, E.D. & Pignata, M.L.** 2006. Calibration of four species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry* 53: 185-209.
- Yruela, I.** 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 145-156.



## **Capítulo 3**

**Respostas biométricas e bioquímicas de plantas de *Aechmea blanchetiana* submetidas a diferentes concentrações contaminantes de zinco em cultivo *in vitro***

## 1. Introdução

O zinco (Zn) é o 23º elemento mais abundante na Terra e o segundo micronutriente mais abundante nos organismos (Broadley *et al.* 2007). É classificado como metal de transição e considerado metal pesado por possuir massa específica acima de  $5 \text{ g cm}^{-3}$  (Gonçalves Jr. *et al.* 2000). Está envolvido na síntese do triptofano, substância intermediária na formação do ácido 3-indol-acético (AIA), auxina reguladora da atividade enzimática relacionada com o aumento do volume celular (Kanashiro 2005) e presente na composição das moléculas superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD), carboxipeptidase, anidrase carbônica e inúmeras enzimas de dehidrogenase (Wollhouse 1983).

A principal fonte de zinco no ambiente é o intemperismo físico e químico de rochas matrizes (Broadley *et al.* 2007). As fontes antropogênicas de zinco estão presentes no uso indiscriminado do lodo de esgoto, que em geral contém grandes quantidades de zinco, como fonte de adubo em solos agrícolas podendo ocasionar acúmulo deste elemento e constituir risco para plantas (Takamatsu 1995). Altas concentrações de zinco também estão associadas à atividade urbana (Pignata *et al.* 2002, Wannaz & Pignata 2006; Bermudez *et al.* 2009). Na Alemanha o desgaste de pastilhas de freios e de pneus de automóveis contamina lençóis freáticos anualmente com 2.078 toneladas de zinco e 80 toneladas de chumbo e a deterioração lenta de placas metálicas utilizadas na construção civil é responsável por aumentar anualmente 682 toneladas de zinco no solo, a maioria atingindo o curso d'água (Hillenbrand *et al.* 2005). Monaci *et al.* (2000) observaram que dentre os metais liberados na atmosfera pelos motores dos automóveis os principais metais pesados são cromo, chumbo, bário e zinco.

A absorção, o acúmulo e a distribuição dos metais pesados em plantas dependem da espécie do elemento, do pH da solução, da temperatura, da capacidade excretora das raízes, entre outros fatores (Cheng 2003). Altas concentrações de zinco podem inativar enzimas,

deslocar elementos essenciais de seus sítios de ação e reduzir a disponibilidade de ferro e cálcio nos organismos (Soares *et al.* 2001, Rout & Das 2003).

A concentração normal de zinco nos tecidos foliares de plantas varia entre 3 e 150 mg Kg<sup>-1</sup> de massa de matéria seca, sendo que valores inferiores a 25 mg Kg<sup>-1</sup> são considerados inadequados para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Fernandes 2006). Em bromélias foram observadas concentrações entre 25 e 200 mg Kg<sup>-1</sup> de massa de matéria seca foliar, variando de acordo com a espécie (Benzing 1990, Jones *et al.* 1991; Mills & Jones 1996). O zinco em excesso é prejudicial, diminuindo a produção de matéria seca em plantas (Fagéria 2000), induzindo indiretamente o estresse oxidativo e, podendo causar cloroses e sintomas visíveis nas folhas (Cuypers *et al.* 2002). Soares *et al.* (2001) estudando o acúmulo de metais em 20 espécies arbóreas tropicais cultivadas em solo contaminado, observaram translocação de Zn das raízes para a parte aérea nas espécies *Machaerium nyctitans* (Vell.) Benth., *Myroxylon peruiferum* L.f., *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr., *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) H.S. Irwin & Barneby e *Trema micrantha* (L.) Blume, sendo essas as mais afetadas pela contaminação.

O risco toxicológico para animais e seres humanos do excesso de zinco é considerado menor que o de cádmio, arsênico, prata e chumbo, contudo estudos sugerem que sua dispersão no ambiente e o acúmulo nos solos, em especial de lodos (lama de depuração), podem gerar implicações à fertilização do solo devido à toxicidade a alguns microorganismos (Alloway 1995). Em células animais e vegetais a presença de metais pesados pode gerar distúrbios estruturais, metabólicos e fisiológicos decorrentes do estresse oxidativo, provocado pelo aumento da produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs) que reagem com moléculas vitais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Hallwell & Gutteridge 1989, Bray *et al.* 2000).

Alguns organismos são capazes de acumular metais pesados sem prejudicar seu desenvolvimento e esse acúmulo e distribuição dependem do metal, tempo de exposição, pH

do substrato e espécie estudada (Cheng 2003). *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl e *Brassica napus* L. são espécies conhecidas como acumuladoras de zinco e utilizadas como biorremediadoras (Brewer *et al.* 1999, Zhao *et al.* 2003). A espécie *Sedum alfredii* Hance foi recentemente descoberta na China como hiperacumuladora de zinco (Yang *et al.* 2002). Bermudez *et al.* (2009) demonstraram que as espécies *Tillandsia recurvata* (L.) L., *T. capillaris* Ruiz & Pav. e *T. tricholepis* Baker e o líquen *Ramalina celastri* (Spreng.) Ruiz Krog. and Swinsc. apresentam característica de acumuladores de metais pesados, incluindo o zinco. Segundo Elias *et al.* (2006) outras espécies de bromélias podem ser classificadas como acumuladoras de metais além das espécies do gênero *Tillandsia*, sendo a espécie *Canistropsis billbergioides* (Schult. f.) Leme acumuladora de zinco.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material biológico

Para o experimento foram utilizadas sementes de espécimes adultos de *Aechmea blanchetiana* coletadas em 18 de Dezembro de 2007 da coleção de bromélias da Seção de Ornamentais, IBt. A obtenção das sementes foi realizada a partir de frutos maduros, com retirada do tegumento e posterior lavagem em água deionizada para a retirada da mucilagem.

As sementes foram submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio (solução comercial 1,5%) na concentração de 100% v v<sup>-1</sup>, por 30 minutos sob agitação constante, seguida de três lavagens em água deionizada estéril em câmara de fluxo laminar. As sementes foram transferidas para frascos com 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog 1962) modificado, com metade da concentração de macronutrientes, acrescido de 30,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico Sigma e pH ajustado para 5,8 ± 0,2.

As culturas foram transferidas para sala de crescimento e mantidas à temperatura de 25 °C ± 3, fotoperíodo de 16 horas de claro e irradiância de 32 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 2.2. Métodos analíticos

O experimento foi realizado nos laboratórios da Seção de Ornamentais e da Seção de Ecologia do Instituto de Botânica, São Paulo, SP e no Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu, SP.

Plantas de *A. blanchetiana*, obtidas a partir das sementes germinadas *in vitro*, com 210 dias de cultivo apresentando de 7 (± 1) folhas, 6,0 (± 0,98) cm de comprimento foliar, 0,1217 (± 0,0520) g de massa de matéria fresca foliar, 0,0072 (± 0,0033) g de massa de matéria seca foliar, 1,58 (± 0,36) mm de diâmetro caular, 4 (± 1) raízes, 2,24 ± (0,87) cm de comprimento radicular, 0,0227 (± 0,0098) g de massa de matéria fresca radicular e 0,0026 (±

0,0013) g de massa de matéria seca radicular, foram transferidas para os tratamentos sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

Os tratamentos consistiram de 50 mL do meio MS (Murashige & Skoog 1962) modificado (metade da concentração de macronutrientes e solução de micronutrientes deficiente em zinco), suplementado com 30 g de sacarose L<sup>-1</sup>, pH ajustado para 5,2 (± 0,2) contendo soluções de Zn (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) de acordo com a Tabela 1, baseando-se no limite máximo recomendado pela resolução Conama 357/2005 para água doce - classe 1, em frascos de vidro transparentes com capacidade de 150 mL e esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, aclimatada à 25 ± 2 °C, em fotoperíodo de 16 horas de claro, 32 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiância e os frascos foram agitados manualmente três vezes por semana. A troca do meio foi realizada 60 dias após o início do experimento.

Tabela 1. Concentrações das soluções de sulfato de zinco utilizadas no preparo dos meios de cultura aos quais as plantas cultivadas *in vitro* foram submetidas.

| Tratamento<br>Zinco (µM) | Concentração de<br>Zinco (g L <sup>-1</sup> ) | Concentração de<br>ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 0,0                      | 0,0                                           | 0,0                                                                          |
| 2,75*                    | 0,00018                                       | 0,0007915                                                                    |
| 27,5                     | 0,0018                                        | 0,007915                                                                     |
| 275                      | 0,018                                         | 0,07915                                                                      |

\* limite máximo aceito pela resolução Conama 357/2005 para água doce - Classe I

As plantas permaneceram em cultura por 130 dias, quando foram retiradas dos tratamentos e avaliadas em relação aos parâmetros biométricos e bioquímicos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 repetições (frascos) por tratamento, cada frasco contendo 6 plantas, totalizando 120 plantas por tratamento e 480 plantas para o experimento.

### 2.3. Avaliações Morfológicas

Foram avaliados o número de folhas, comprimento das plantas (medida entre a base do caule e a extremidade superior da maior folha), número de raízes ( $> 1,0$  cm); comprimento da maior raiz, diâmetro do caule e massas de matéria fresca e seca da parte aérea e raízes.

### 2.4. Análises bioquímicas e químicas

Para a confecção das análises de antioxidantes nos tecidos foliares das plantas de *A. blanchetiana*, foram previamente testados os métodos utilizados para a análise em folhas de *Nicotiniana tabacum* Bel (W3) e *Ipomoea nil* Scarlet O'Hara, com o intuito de adaptar um protocolo de análises para a espécie em estudo.

#### 2.4.1. Análises bioquímicas

*Ácido ascórbico (AA)* - O teor de AA foi determinado, no mesmo dia em que as plantas foram retiradas dos tratamentos, utilizando o método de Keller & Schwager (1977). (Detalhes no Capítulo 2, pág. 41) em 5 amostras de folhas frescas. As leituras foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  de massa de matéria seca.

*Ascosbato peroxidase (APX)* - a atividade da APX foi avaliada em cinco amostras frescas de folhas de cada tratamento de acordo com o método descrito por Ramachandra-Reddy *et al.* (2004). (Detalhes no Capítulo 2 pág. 41). As leituras foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em  $\Delta\text{A min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de massa de matéria seca.

*Superóxido dismutase (SOD)* - A atividade de SOD foi determinada em cinco amostras frescas de folhas por tratamento utilizando o método de Osswald *et al.* 1992. (Detalhes no Capítulo 2 pág. 42). As leituras foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em  $\text{unid s}^{-1} \text{g}^{-1}$  de massa de matéria seca.

*Poliaminas* - Três amostras de 0,4 g de massa de matéria fresca foliar, retiradas da 5ª, 6ª e 7ª folhas de seis plantas foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas à análise de teores de poliaminas segundo o método descrito por Flores & Galton (1982), modificado por

Lima *et al.* (2006) (Detalhes no Capítulo 2 pág. 42). Os teores de poliaminas livres foram expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de matéria seca.

#### **2.4.2 Análises da concentração de elementos minerais**

As concentrações de macro e micronutrientes foram determinadas em plantas inteiras (parte aérea + sistema radicular) segundo metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997). (Detalhes no Capítulo 2 pág. 43).

#### **2.4.3. Análise do acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em folhas**

A detecção do acúmulo de peróxido de hidrogênio nos tecidos foliares foi realizada segundo o método de Iriti *et al.* (2003) com modificações (Detalhes no Capítulo 2 pág. 43).

#### **2.4.4. Análise estatística**

Diferenças estatísticas entre os tratamentos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o Software Estatístico Sisvar (Ferreira 2000).

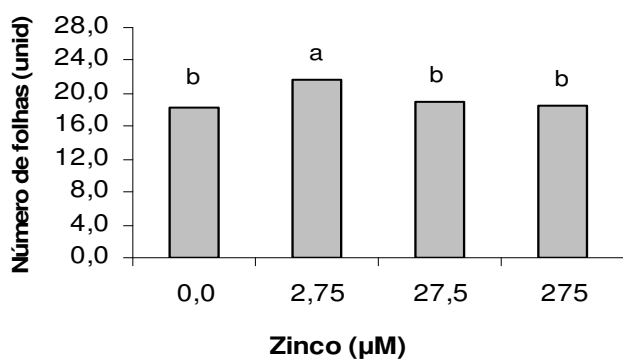


### **3. Resultados e Discussão**

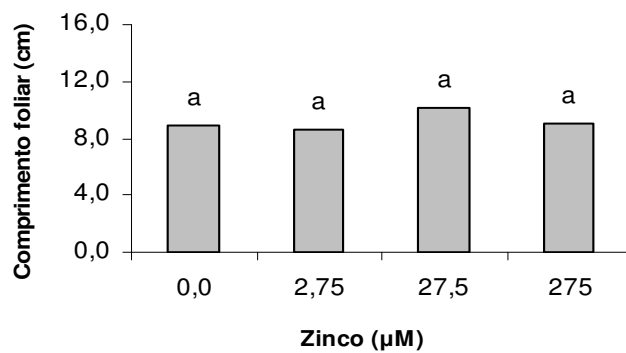
#### **3.1. Análises Biométricas**

As análises biométricas da parte aérea apresentaram diferenças estatísticas para as variáveis número de folhas e massa de matéria seca da parte aérea (Figuras 1A e 1D), sendo os maiores valores observados em plantas cultivadas no tratamento 2,75  $\mu\text{M}$  de Zn, concentração limite aceita pela resolução Conama e 10 vezes maior que a concentração da formulação do meio nutritivo MS. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos para as variáveis: comprimento foliar, massa de matéria fresca da parte aérea e diâmetro do caule (Figuras 1B, 1C e 1E).

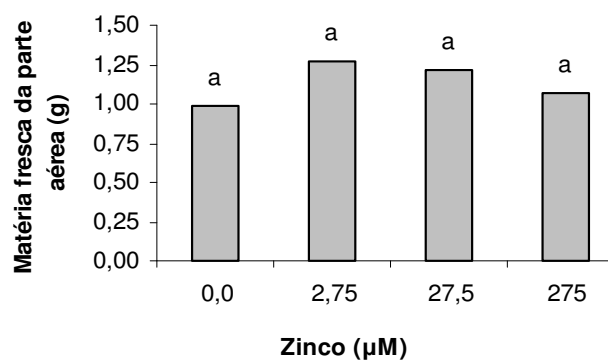
As variáveis número de raízes e massa de matéria seca radicular apresentaram diferença estatística (Figuras 2A e 2D), obtendo os menores valores no tratamento 0,0  $\mu\text{M}$  de Zn. Os parâmetros comprimento radicular e massa de matéria fresca das raízes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Figuras 2B e 2C).



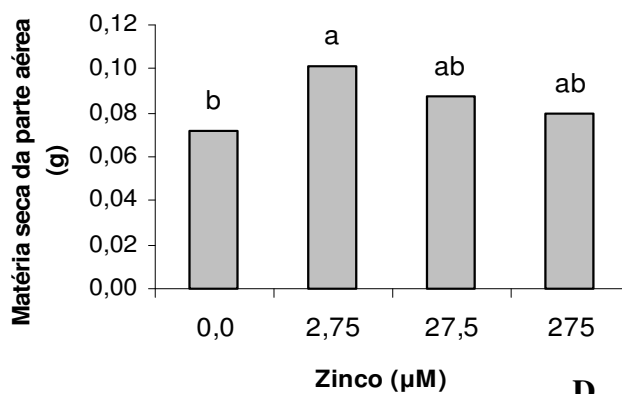
**A**



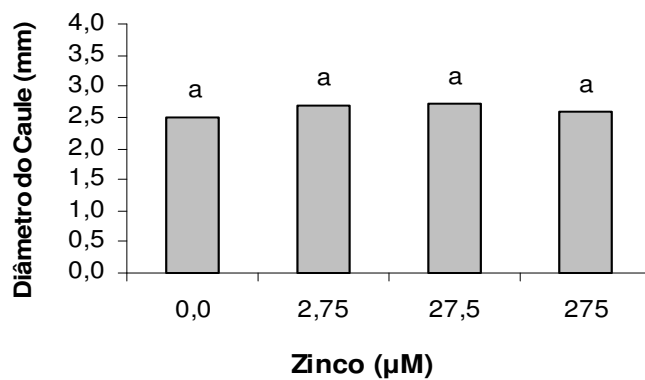
**B**



**C**



**D**



**E**

Figura 1. Médias do número de folhas (A), comprimento foliar (B), massa de matéria fresca (C) e seca (D) foliar e diâmetro do caule (E) de plantas de *A. blanchetiana* cultivadas em diferentes concentrações de Zn. Letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

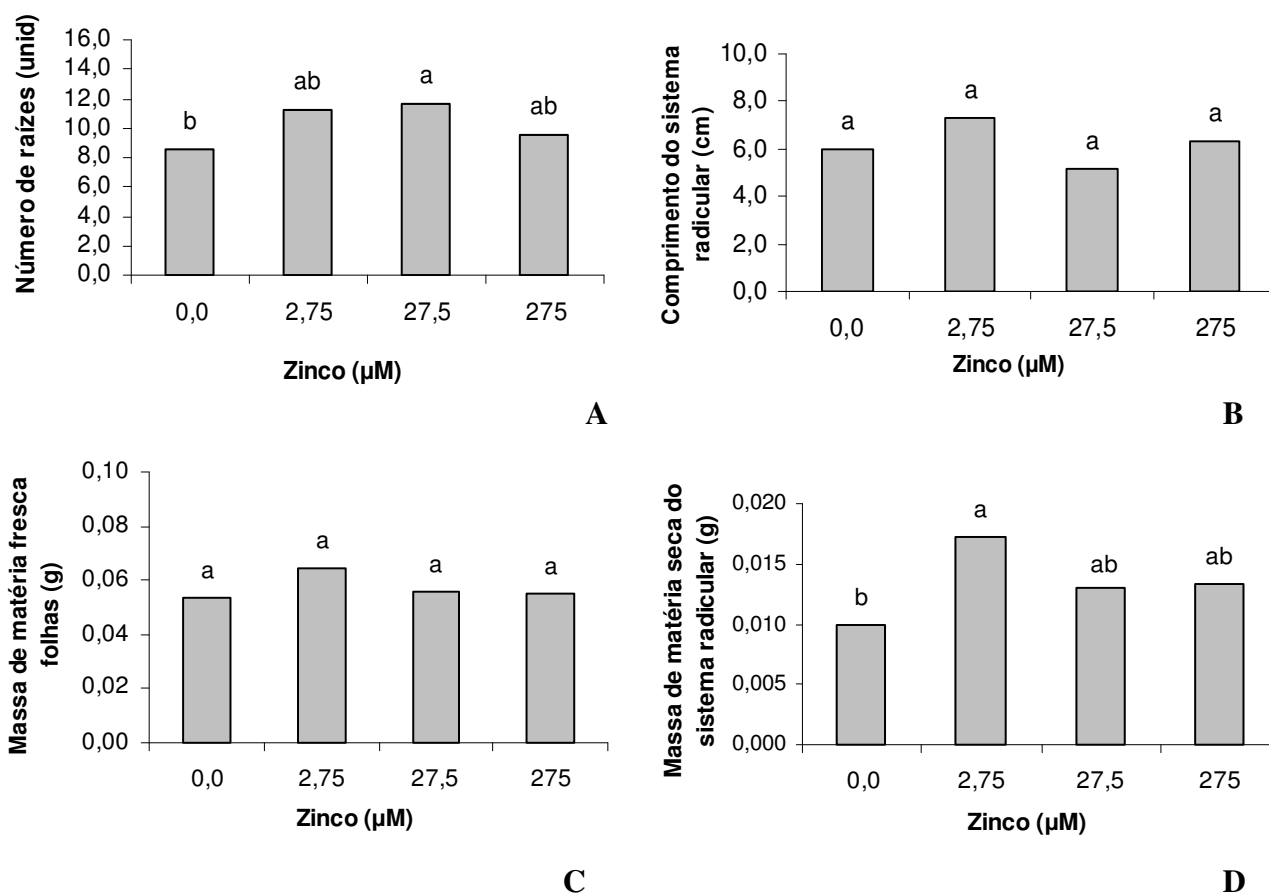


Figura 2. Médias do número de raízes (A), comprimento do sistema radicular (B), massa de matéria fresca (C) e seca (D) das raízes de plantas de *A. blanchetiana* cultivadas em diferentes concentrações de zinco. Letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O número de raízes e folhas, e as massas de matéria seca foliar e radicular foram menores na ausência de zinco, indicando que a espécie apresenta sensibilidade à deficiência de zinco. As concentrações mais altas de zinco (27,5 e 275  $\mu\text{M}$  de Zn), diminuíram o crescimento e a produção de biomassa das plantas, estando esse resultado relacionado com a ação deletéria da toxidez do zinco ao crescimento vegetal (Rout & Das 2003, Fernandes 2006).

Os resultados obtidos nas plantas de *A. blanchetiana* para a toxidez das concentrações elevadas de zinco se assemelham aos descritos na literatura. Os primeiros danos em *Mentha pulegium* L., devido ao excesso de zinco, ocorreram no crescimento radicular, com redução da

divisão celular (Candan & Tarhan 2003). Fagéria (2000) obteve menor produção de massa de matéria seca da parte aérea em mudas de milho, soja, arroz e trigo em função do aumento da concentração de zinco, mudas de eucalipto cultivadas em altas concentrações de zinco também apresentaram redução da massa de matéria seca e na translocação de Fe das raízes para a parte aérea (Soares *et al.* 2001). Natale *et al.* (2002) observaram redução no crescimento de raízes de goiaba (*Psidium guajava* L.) cv. Paluma) irrigadas com soluções contaminadas por zinco.

### 3.4. Teores de macro e micronutrientes

Os teores de macronutrientes e micronutrientes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Figuras 3 e 4), excetuando os teores de zinco (Figura 5).

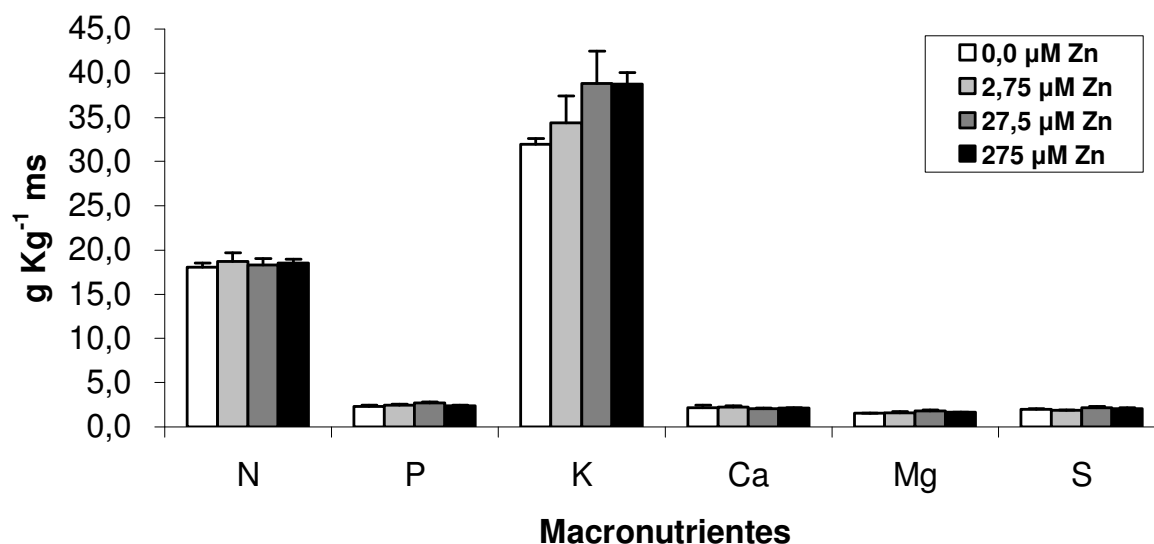


Figura 3. Teores dos macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) de plantas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes concentrações de zinco. (T - erro padrão).

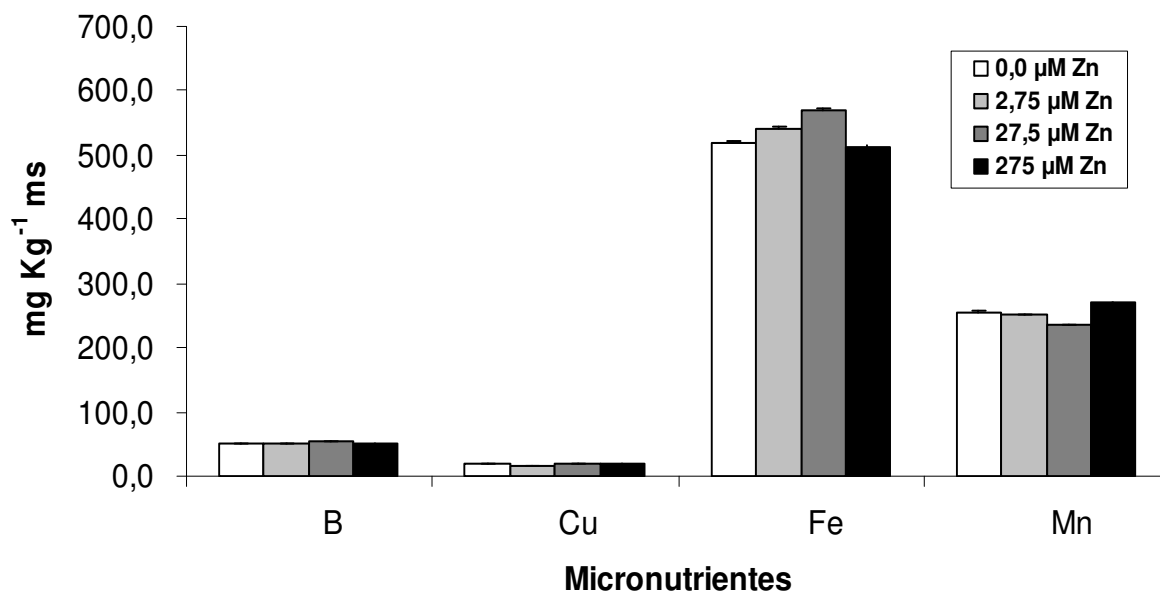


Figura 4. Teores dos micronutrientes boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn) de plantas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes concentrações de zinco. (T - erro padrão).

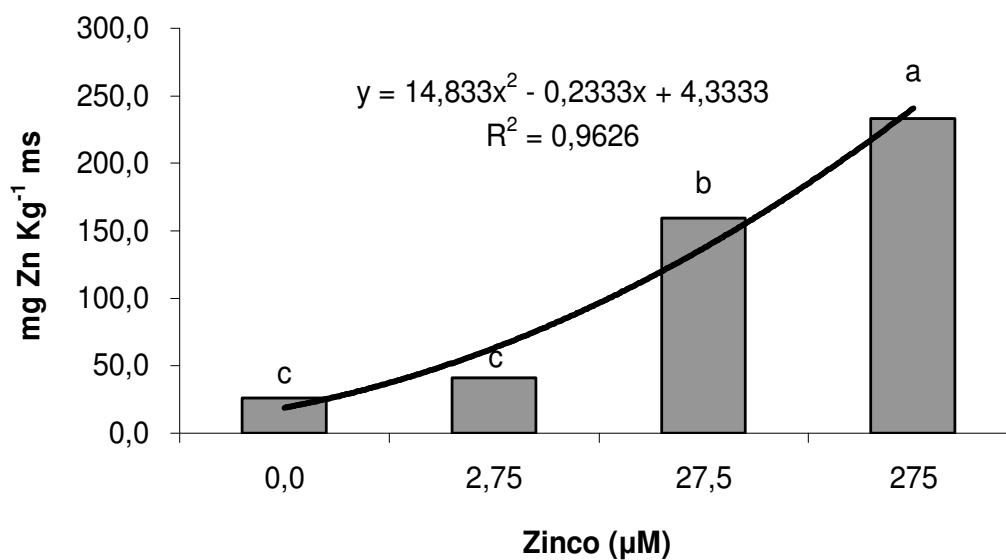


Figura 5. Teores de zinco em plantas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes concentrações de zinco. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Plantas de *A. blanchetiana* cultivadas no tratamento 275  $\mu\text{M}$  de Zn apresentaram tendência de diminuição dos teores de ferro (Figura 4), podendo estar relacionado com a inibição/competição do zinco à absorção de ferro (Broadley *et al.* 2007). Plantas de *Eucalyptus maculata* Hook. e *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake cultivadas em altas concentrações de zinco reduziram os teores de ferro e cálcio da matéria seca da parte aérea a níveis considerados deficientes para o crescimento das espécies (Soares *et al.* 2001).

Plantas de *A. blanchetiana* cultivadas em 27,5 e 275  $\mu\text{M}$  de Zn apresentaram maiores teores de zinco no tecido vegetal, com valores médios máximos de 233,3 mg Zn Kg<sup>-1</sup> nas plantas cultivadas no tratamento 275  $\mu\text{M}$  de Zn (Figura 5) enquanto as cultivadas nos tratamentos 0,0 e 2,75  $\mu\text{M}$  de Zn apresentaram 26,3 e 41,0 mg Zn Kg<sup>-1</sup> respectivamente, valores superiores aos considerados deficientes para espécies vegetais (Fernandes 2006). Nas bromélias *Tillandsia paucifolia* Baker (Benzing 2000), *Ananas comosus* (L.) Merr. e *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker (Jones *et al.* 1991, Mills & Jones 1996) foram observados teores foliares entre 35,5-41,8; 20-120 e 25-200 mg Zn kg<sup>-1</sup> de massa de matéria seca respectivamente. Kanashiro (2005) trabalhando com plantas de *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro* obteve 110 mg Zn Kg<sup>-1</sup> massa de matéria seca foliar nas plantas controle.

O local de acúmulo de metal nas plantas pode variar de acordo com o metal e a espécie. Nas plantas hiperacumuladoras *Sedum alfredii* Hance (Chao *et al.* 2008) e *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl (Küpper *et al.* 1999; Vázquez *et al.* 1994) em concentrações de 1000  $\mu\text{M}$  de zinco e acima de 3000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de zinco, respectivamente, foram observados acúmulos preferenciais de zinco na epiderme foliar. Plantas de *Aechmea fasciata* cultivadas *ex vitro* apresentaram 43% dos teores de zinco acumulado nas folhas, 28% no caule e 29% nas raízes (Sanches 2009). Neste estudo foram analisadas plantas inteiras de *A. blanchetiana* (raiz, cobre e folhas) não tendo sido possível determinar a localização do acúmulo do zinco, entretanto o aumento linear dos teores de zinco nas plantas pode ser resultado de mecanismos que conferem tolerância às plantas (Hall 2002).

Segundo Fagéria (2000), os níveis de zinco aplicado no solo alteraram a quantidade de zinco acumulada na parte aérea de mudas de milho, arroz, feijão, soja e trigo e estão diretamente relacionados à produção de matéria seca da parte aérea das plantas. Em mudas de cedro o aumento da concentração de zinco no meio eleva o índice de translocação de macro e micronutriente da raiz para parte aérea com exceção do fósforo (Paiva *et al.* 2003).

### 3.3. Acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos foliares

Na face adaxial da epiderme foliar de *A. blanchetiana* (Figura 6B) e no tecido vegetal das plantas utilizadas no controle negativo (branco) (Figura 6A) não foi observado acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A ausência de estômatos e escamas na face adaxial da epiderme é característica da espécie *A. blanchetiana* e pode estar relacionada com a ausência de coloração do tecido. As escamas estão relacionados com a absorção de água e nutrientes (Appenzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2003), sendo componente primordial da epiderme foliar de muitas bromélias atmosféricas e formadoras de tanque (Scatena & Segecin 2005, Takanashi *et al.* 2007) e portanto, sitios de maior absorção e acúmulo de zinco nas folhas. Plantas cultivadas em 0,0 µM de Zn não apresentaram coloração evidente por DAB nos estômatos (Figura 6C), o tratamento 2,75 µM de Zn apresentou maior intensidade de coloração nos estômatos e no apoplasto (Figura 6D), o tratamento 27,5 µM de Zn apresentou maior intensidade na coloração nos estômatos e, aparentemente, nos cloroplastos das células epidérmicas (Figura 6E) e o tratamento 275 µM Zn, além dos tecidos mencionados, houve coloração nas parede celulares e citoplasma (Figura 6F).

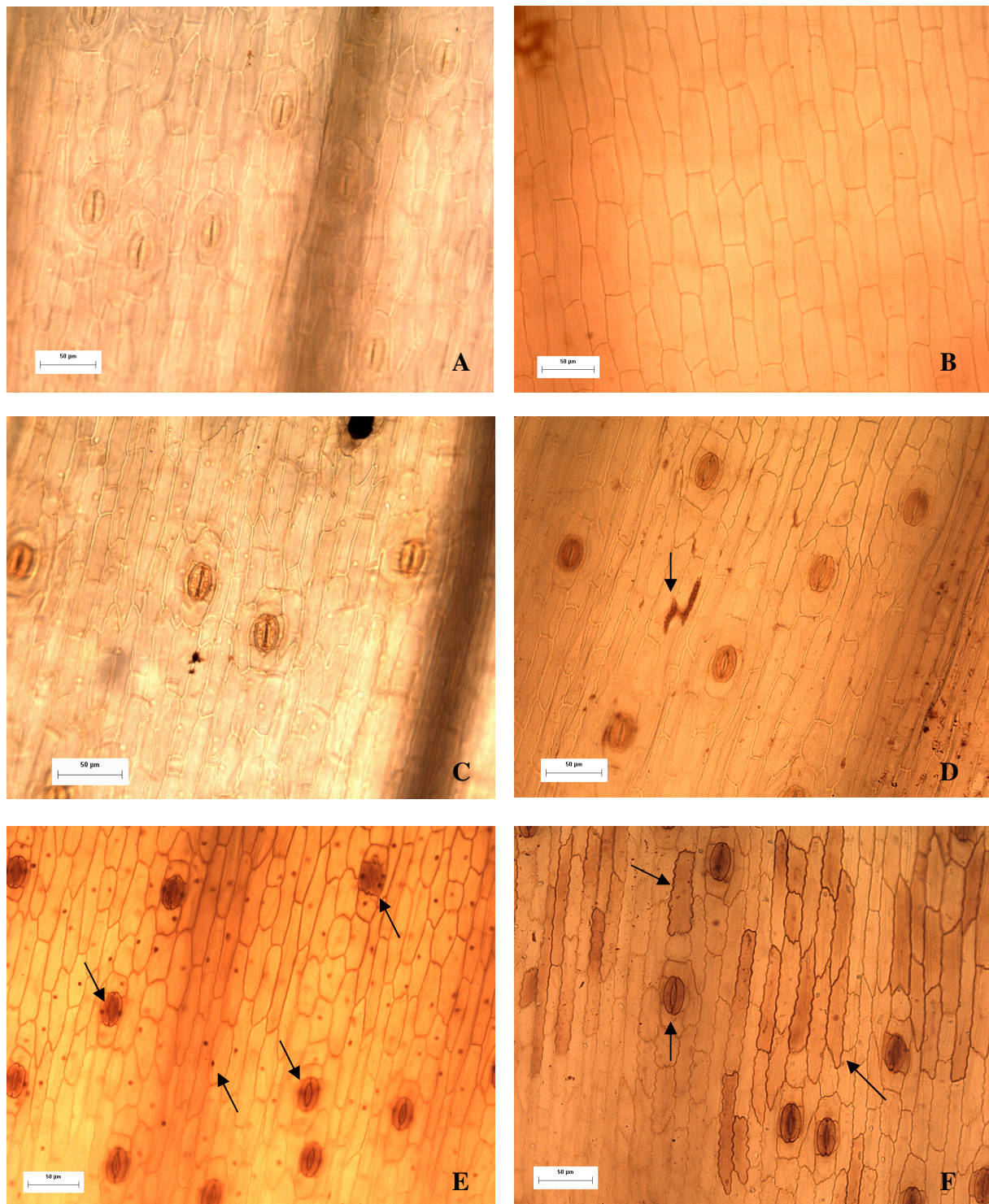


Figura 6. Acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em folhas de *A. blanchetiana* submetidas a diferentes concentrações de zinco. A: branco; B: face adaxial da folha; C: estômatos da face abaxial da epiderme das folhas ( $0,0 \mu\text{M}$  de Zn); D: acúmulo nas paredes celulares da face abaxial da epiderme foliar ( $2,75 \mu\text{M}$  de Zn); E: estômatos e núcleos celulares da face abaxial da epiderme foliar ( $27,5 \mu\text{M}$  de Zn); F: estômatos e células epidérmicas da face abaxial da epiderme foliar ( $275 \mu\text{M}$  de Zn). Acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  representado pela coloração marrom e indicada pelas setas.



A molécula de  $H_2O_2$  é relativamente estável e eletronicamente neutra, sendo capaz de atravessar a membrana e parede plasmática com facilidade (Qin *et al.* 2008), podendo explicar o acúmulo observado também no citoplasma de células epidérmicas cultivadas em 275  $\mu M$  de Zn. Segundo Bestwick *et al.* (1997) a presença de  $H_2O_2$  na parede celular é resultante da ação de peroxidases sobre, por exemplo, compostos fenólicos presentes nesses sítios, sendo o excesso de  $H_2O_2$  produzido o primeiro fator no desenvolvimento de danos na membrana.

Plantas de *Betula pendula* Roth (arbórea) expostas a altos teores de ozônio, apresentam acúmulo subcelular de  $H_2O_2$  nas folhas em duas fases distintas, sendo a primeira localizada nas paredes e membranas celulares e a segunda no citoplasma e mitocôndrias (Pellinen *et al.* 1999), resultados semelhantes aos observados para *A. blanchetiana*. O acúmulo de  $H_2O_2$  na parede celular das plantas de *A. blanchetiana* cultivadas em 275  $\mu M$  de Zn pode estar relacionada com a participação da molécula nos mecanismos de defesa, como o reforço da parede celular, elevando a resistência das plantas à vários tipos de estresse (Dempsey & Klessig 1995). Segundo Santos *et al.* (2006) pectinas e histidinas reagem com íons metálicos imobilizando-os na parede celular. Chao *et al.* (2008) afirmaram que a produção de  $H_2O_2$  em plantas de *Sedum alfredii* Hance é distribuída, principalmente, entre as paredes celulares da epiderme e tecidos vasculares, sendo essa distribuição similar ao acúmulo de zinco nas plantas, indicando que a presença de  $H_2O_2$  nas plantas de *A. blanchetiana* possivelmente esteja acompanhando o acúmulo de zinco nesta espécie.

### 3.3. Análises Bioquímicas

#### *Atividade Antioxidante*

Não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos para as variáveis teor de ácido ascórbico (AA) (Figura 7A) e atividade da ascorbato peroxidase (APX) (Figura 7B). Os resultados da atividade da superóxido dismutase (SOD) apresentaram significância

estatística entre os tratamentos, sendo a menor atividade observada no tratamento 27,5  $\mu\text{M}$  de Zn e a maior no tratamento 275  $\mu\text{M}$  de Zn (Figura 7C).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  em baixas concentrações possui função sinalizadora, responsável pela ativação do sistema antioxidante (Soares & Machado 2007), importante nas reações de tolerância ao estresse e necessária para a conexão de componentes da parede celular como parte da defesa estrutural e regulando genes associados à expressão do sistema antioxidante (Lamb & Dixon 1997). Entretanto o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser deletério para os tecidos vegetais, sendo o excesso neutralizado por enzimas antioxidantes (Soares & Machado 2007). Nas plantas de *A. blanchetiana* não houve variação significativa da atividade da APX e observou-se a tendência no aumento dos teores de AA, podendo o acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos tecidos foliares estar associado à alta atividade da SOD no tratamento 275  $\mu\text{M}$  de Zn, uma vez que a atividade da enzima está diretamente ligada à produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

O zinco apresenta características físicas e químicas similares ao cádmio, assim como suas interações com sistemas biológicos (Rout & Das 2003). Folhas de tomate expostas a altas concentrações de cádmio apresentaram rápida ativação de SOD (Chamseddine *et al.* 2009) enquanto Panda & Khan (2004) observaram o aumento da atividade de SOD em plantas de *Hydrilla verticillata* L. cultivadas com 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de Cd. Nas plantas de *A. blanchetiana* a atividade de SOD no tratamento 275  $\mu\text{M}$  de Zn aumentou consideravelmente quando comparada ao tratamento 27,5  $\mu\text{M}$  de Zn, indicando que a concentração 275  $\mu\text{M}$  Zn pode estar relacionada com a ativação de um sinal indutor da atividade da SOD.

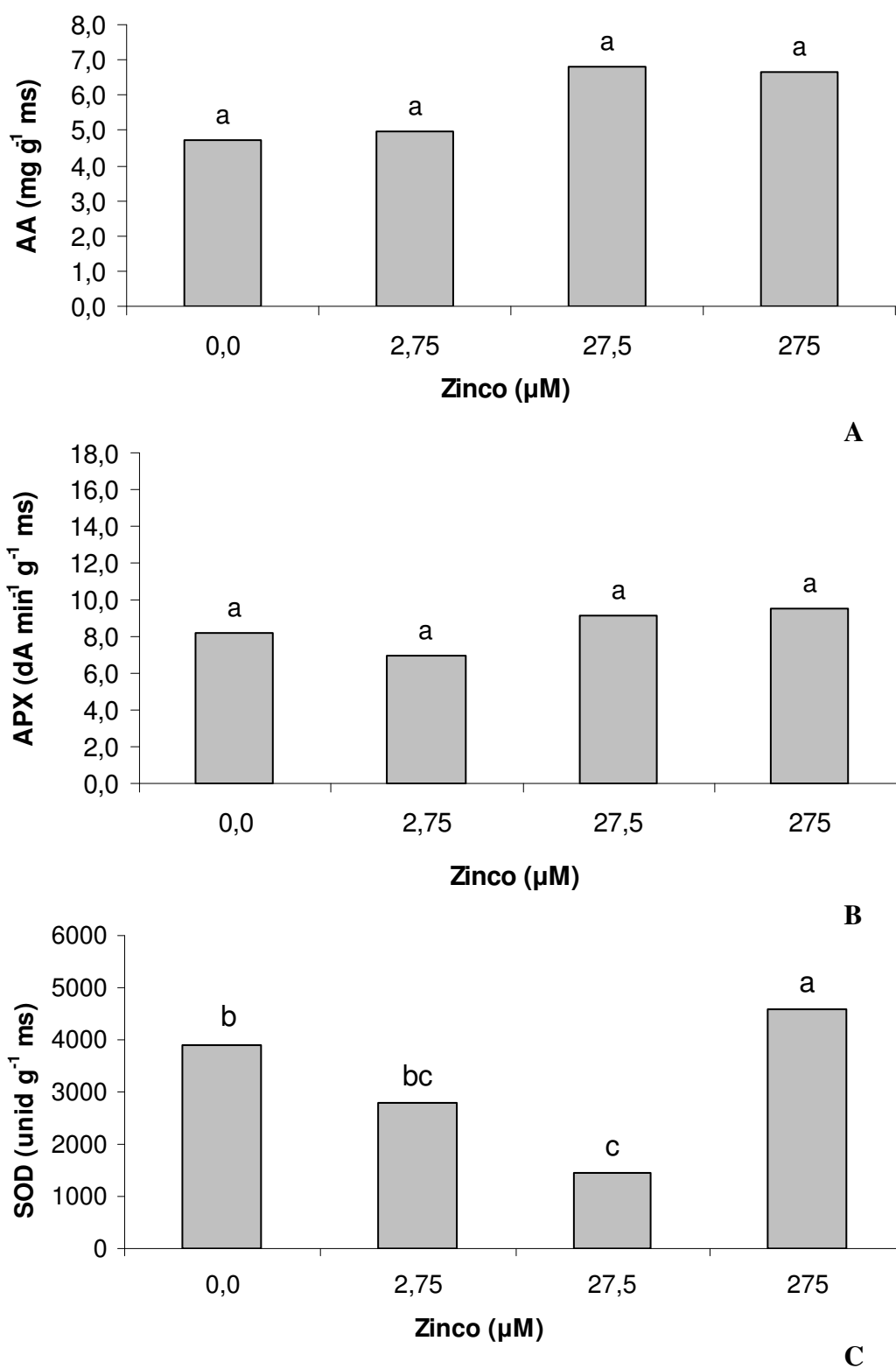


Figura 7. Médias dos teores de ácido ascórbico, AA (A), atividade da ascorbato peroxidase, APX (B) e atividade da superóxido dismutase, SOD (C) em plantas de *A. blanchetiana* submetidas a diferentes concentrações de zinco.

A SOD faz parte do primeiro ajuste de tolerância das plantas ao estresse oxidativo e sua atividade pode afetar a concentração celular de  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Gratão *et al.* 2005), mantendo a interação com outras enzimas antioxidantes garantindo um balanço altamente otimizado, de forma a reduzir o risco de danos oxidativos (Gomes-Junior 2006). Os níveis da atividade da SOD em *A. blanchetiana* foram semelhantes aos observados nas espécies *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 (Esposito 2008), *Psidium guajava* L. cv Paluma (Dias *et al.* 2007), espécies bioindicadoras de poluição atmosférica, e *Caesalpinia echinata* Lam. (Bulbovas *et al.* 2005) expostas ao ozônio. Segundo Bray *et al.* (2000), plantas tolerantes à altas concentrações de metais pesados tendem a apresentar níveis mais altos dos teores e atividade dos antioxidantes. Wang *et al.* (2008) concluíram que níveis altos de atividade de SOD protegem as plantas acumuladoras de metais dos danos oxidativos induzidos pela toxidez de cádmio.

#### *Teores de Poliaminas*

Os teores de triamina espermidina (Spd) se mantiveram constante para todos os tratamentos e apresentaram valores inferiores aos da Put e Spm. Os maiores valores de tetramina espermina (Spm) foram observados nos tratamentos 27,5 e 275  $\mu M$  Zn, os teores de diamina putrescina (Put) não apresentaram variações significativas entre os tratamentos, embora tenha sido observada a tendência de aumento dos teores de Put com o aumento da concentração de zinco até o tratamento 27,5  $\mu M$  Zn e diminuição na concentração 275  $\mu M$  Zn (Figura 8).

As poliaminas, principalmente a Put, Spd, e Spm, são compostos policatiônicos de baixo peso molecular e presente em todos os seres vivos. Condições de estresse induzem o acúmulo de poliaminas livres ou conjugadas, indicando que a biossíntese das poliaminas pode ser utilizada como componente de resposta à estresses pela planta (Bouchereau *et al.* 1999,

Liu *et al.* 2007). A síntese de poliaminas é bem documentada e sabe-se que a Put é originada do metabolismo da ornitina ou argenina, sendo posteriormente transformada em Spd e Spm.

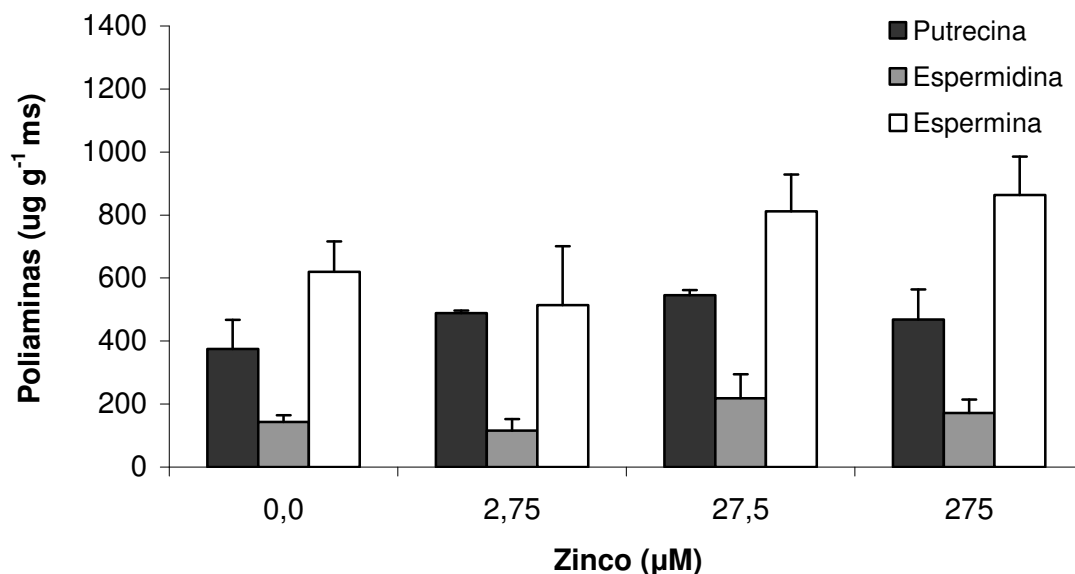


Figura 8. Médias das concentrações de poliaminas (putrecina, Espermidina e Espermina) de plantas de *A. blanchetiana* submetidas à concentrações de zinco.

A tendência observada nos teores de Spm entre os tratamentos nas folhas de *A. blanchetiana*, maiores teores nas maiores concentrações de zinco, estão de acordo com os observados por Franchin *et al.* (2007) em plantas de *Populus alba* L. tratadas com zinco, que apresentaram acúmulo de poliaminas ao longo do tempo e apenas na maior concentração de zinco. A resposta das diferentes poliaminas varia com o metal e o órgão da planta avaliado, em *Phaseolus vulgaris* L. submetidas ao tratamento de cádmio, os teores de Put aumentado nas raízes, hipocótilo e epicótilo enquanto que Spd aumentou em hipocótilo, diminuiu nas folhas e não se alterou nas raízes, e os teores de Spm diminuíram em todas as partes das plântulas (Weinstein *et al.* 1986). Os teores de Spd não foram alterados pelos tratamentos, indicando pequena ou nenhuma influência direta das concentrações utilizadas de zinco no seu metabolismo.

Resultados semelhantes à tendência observada para os teores de Put nas folhas de *A. blanchetiana* foram observados em folhas de microestacas de *Populus alba* cultivadas *in vitro*, que apresentaram altos teores de Put nos primeiros dias de exposição a todas as concentrações de zinco (0,25; 0,50 e 1,00 mM), entretanto ao final do experimento as plantas cultivadas nas concentrações de 0,25 e 0,50 mM Zn apresentaram teores menores de Put (Franchin *et al.* 2007). Basso *et al.* (2007) observaram o aumento no teor da Put em brotos de Eucalipto sob efeito de diferentes tratamentos de alumínio (Al) nos primeiros dias de coleta, mas no final do experimento ocorreu à diminuição dos teores de Put nas plantas cultivadas nas maiores concentrações de alumínio.

A Spm atua na regulação da estabilidade e permeabilidade das membranas celulares aumentando a tolerância das plantas a diferentes estresses (Lefreve *et al.* 2001; Roy *et al.* 2005). A tendência de aumento das concentrações de Spm observada nas plantas de *A. blanchetiana* cultivadas nas maiores concentrações de zinco pode estar associada ao acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas paredes celulares observadas na técnica de DAB. As poliaminas apresentam atividade antioxidante por protegerem os ácidos nucléicos contra desnaturação enzimática ou oxidativa e por prevenirem contra peroxidação de lipídeos (Bouchereau *et al.* 1999). Os maiores valores de Spm observados nas plantas cultivadas com 27,5 e 275 µM de Zn podem estar relacionados com a propriedade da Spm em aumentar a tolerância das espécies à presença de metais (Wang *et al.* 2007).

#### 4. Conclusões

As concentrações de zinco não alteraram significativamente os teores endógenos de poliaminas nos tecidos foliares, embora a tendência de aumento dos teores de Spm com o aumento das concentrações de Zn possa indicar um mecanismo de tolerância da espécie, não alteraram os teores de macro e micronutrientes e o crescimento do sistema foliar e radicular, sendo a deficiência mais deletéria ao crescimento do sistema radicular.

Os teores de zinco nas plantas de *A. blanchetiana* foram significativamente maiores na concentração 27,5 e 275  $\mu\text{M}$  Zn, sugerindo que a espécie apresenta capacidade acumuladora.

O acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos tecidos da epiderme foliar foi influenciado pelo aumento da concentração de zinco no meio e, possivelmente, está relacionado com a localização do acúmulo de zinco na folha.

A atividade da enzima SOD diminuiu com o aumento da concentração de zinco no meio, entretanto a concentração de 275  $\mu\text{M}$  elevou significativamente a atividade da enzima, podendo estar relacionada com a ativação de algum sinal indutor da atividade da SOD.

## 5. Referências

- Alloway, B.J.** 1995. Heavy metals in soils. 2 ed. Blackie Academic & Professional, New York.
- Appenzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M.** 2003. Anatomia vegetal. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Basso, L.H.M., Lima, G.P.P., Gonçalves, A.N., Vilhena, S.M.C. & Padilha, C.C.F.** 2007. Efeito do alumínio no conteúdo de poliaminas livres e atividade da fosfatase ácida durante o crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas *in vitro*. Scientia Forestalis 75: 9-18
- Benzing, D.H.** 1990. Vascular epiphytes. Cambridge University Press, New York.
- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Parte II p. 52-77.
- Bermudez, G.M.A., Rodriguez, J.H. & Pignata, M.L.** 2009. Comparison of air pollution biomonitoring ability of three *Tillandsia* species and lichen *Ramalina celastri* in Argentina. Environmental Research 109: 6-14.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H.R. & Mansfield, J.W.** 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* cv *phaseolicola*. The Plant Cell 9: 209-221.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. & Martin-Tanguy, J.** 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant Science 140: 103-125.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. In: B.B. Buchanan, W. Gruissen & R.L. Jones (eds.). Biochemistry & Molecular Biology of plants. American Society of Plant Physiologists, New York, pp. 1158-1203.



- Brewer, E.P., Saunders, J.A., Angle, J.S., Chaney, R.L. & McIntosh, M.S.** 1999. Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics 99: 761-771.
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I. & Lux, A.** 2007. Zinc in plants. New Phytologist 173: 677-702.
- Bulbovas, P., Rinaldi, M.C.S., Delitti, W.B.C. & Domingos, M.** 2005. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Revista Brasileira de Botânica 28: 687-696.
- Candan, N. & Tarhan, L.** 2003. The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in *Mentha pulegium* organs grown in  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  stress conditions. Plant Science 165: 769-776.
- Chamseddine, M., Wided, B.A., Guy, H., Marie-Edith, C. & Fatma, J.** 2009. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. Plant Growth Regulation 57: 89-99.
- Chao, Y., Zhang, M., Tian, S. Lu, L. & Yang, X.** 2008. Differential generation of hydrogen peroxide upon exposure to zinc and cadmium in the hyperaccumulating plant specie (*Sedum alfredii* Hance). Journal of Zhejiang University Science 9: 243-249.
- Cheng, S.** 2003. Heavy metals in plants and phytoremediation. Environmental Science and Pollution Research-International 10: 335-40.
- Conama** 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>
- Cuypers, A., Vangronsveld, J. & Clijsters, H.** 2002. Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* copper and zinc phytotoxicity: a comparition. Journal of Plant Physiology 159: 869-876.
- Dempsey, D.A. & Klessig, D.F.** 1995. Signals in plant disease resistance. Bulletin de l'Institut Pasteur 93: 167-186.

- Dias, A.P.S., Pina, J.M., Rinaldi, M.C.S. & Moraes, R.M.** 2007. Atividade de antioxidantes em folhas de *Psidium guajava* 'Paluma' em diferentes estágios de maturação expostas ao ozônio. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 15-17.
- Elias, C., De Nadai Fernandes, E.A., França, E.J. & Bacchi, M.A.** 2006. Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica. *Biota Neotropica* 6: 1-9.
- Esposito, M.P.** 2008. Estudo da relação entre necroses foliares indicadoras de ozônio atmosférico e defesas antioxidativas em folhas de *Nicotiana tabacum* "Bel W3". Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Fagéria, N.K.** 2000. Adequate and toxic levels of zinc for rice, common bean, corn, soybean and wheat production in cerrado soil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 4: 390-395.
- Fernandes, M.L.** 2006. *Nutrição Mineral de Plantas*. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Viçosa.
- Ferreira, D.F.** 2000. Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas. <http://www.dex.ufla.br/~danielff/sisvarmanual.pdf> (acesso em 20.08.2009).
- Flores, H.E. & Galston, A.W.** 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiology* 69: 701-706.
- Franchin, C., Fossati, T., Pasquini, E., Lingua, G., Castiglione, S., Torrigiani, P. & Biondi, S.** 2007. High concentrations of zinc and copper induce differential polyamine responses in micropropagated white poplar (*Populus alba*). *Physiologia Plantarum* 130: 77-90.
- Gonçalves Jr., A.C.; Luchese, E.B. & Lenzi, E.** 2000. Avaliação da fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio em soja cultivada em latossolo vermelho escuro tratado com fertilizantes comerciais. *Química Nova* 23: 173-177.

- Gomes-Junior, R.A.** 2006. Resposta antioxidativa de células *in vitro* de café (*Coffea arabica*) submetidas aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Gratão, P.L., Prasad, M.N.V., Cardoso, P.F., Lea, P.J. & Azevedo, R.A.** 2005. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 7: 53-64.
- Hall, J.L.** 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.
- Hallwell, B. & Gutteridge, J.M.C.** 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.
- Hillenbrand, T., Toussaint, D., Böhm, E., Fuchs, S., Scherer, U., Rudolphi, A., Hoffmann, M., Kreißig, J. & Kotz, C.** 2005. Discharges of copper, zinc and lead to water and soil analysis of the emission pathways and possible emission reduction measures. UBA-FB 000824, 329p.
- Iriti, M., Rabotti, G., Ascensão, A. & Faoro, F.** 2003. Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4308-4314.
- Jones Jr. J.B., Wolf, B. & Mills, H.A.** 1991. Plant analysis handbook: a practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Micro-Macro Publishing, Athens.
- Kanashiro, S.** 2005. Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith *in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Keller, T. & Schwager, H.** 1977. Air pollution and ascorbic acid. *European Journal of Forest Pathology* 7: 338-350.
- Küpper, H., Zhao, F.J. & Mcgrath, S.P.** 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 119: 305-311.

- Lamb, C. & Dixon, R.A.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 251-275.
- Lefreve, I., Gratia, E. & Lutts, S.** 2001. Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). Plant Science 161: 943-952.
- Lima, G.P.P., Rocha, S.A., Tamaki, M. & Ramos, P.R.R.** 2006. Polyamines contents in some foods from Brazilian population basic diet. Ciência Rural 36: 1294-1298.
- Liu, J.H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. & Moriguchi, T.** 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. Plant Biotechnology 24: 117-126.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. & Oliveira, S.A.** 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba, POTAFOS, 319p.
- Mills, H.A. & Jones, J.B. Jr.** 1996. Plant analysis handbook II. Athen: Micro-macro Publishing. 422p.
- Monaci, F., Moni, F., Lanciotti, E., Grechi, D. & Bargagli, R.** 2000. Biomonitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emission in place of lead. Environmental Pollution 107: 321-327.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Natale, W., Prado, R.M., Corrêa, M.C.M., Silva, M.A.C. & Pereira, L.** 2002. Resposta de mudas de goiabeira à aplicação de zinco. Revista Brasileira de Fruticultura 24: 770-773.
- Osswald, W.F., Kraus, R., Hippeli, S., Benz, B., Volpert, R. & Elstner, E.F.** 1992. Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* (L.) Karst). Plant Physiology 139: 742-748.

- Paiva, H.N., Carvalho, J.G., Siqueira, J.O. & Corrêa, J.B.D.** 2003. Teor, conteúdo e índice de translocação de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) submetidas a doses crescentes de zinco. *Ciência Florestal* 13: 1-10.
- Panda S.K. & Khan, M. H.** 2004. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 115-118.
- Pellinen, R., Palva, T. & Kangasjärvi, J.** 1999. Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal* 20: 349-356.
- Pignata, M.L., Gudiño, G.L., Wannaz, E.D., Pla, R.R., González, C.M., Carreras, H.A. & Orellana, L.** 2002. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. *Environmental Pollution* 120: 59-68.
- Qin, Y.M., Hu, C.Y. & Zhu, Y.X.** 2008. The ascorbate peroxidase regulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethylene is involved in cotton fiber cell elongation by modulating ROS homeostasis. *Plant Signaling & Behavior* 3: 194-196.
- Ramachandra-Reddy, A, Chaitanya K.V., Jutur, P.P. & Sumithra, K.** 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 52: 33-42.
- Roy, P., Niyoki, K., Sengupta, D.N. & Ghosh, B.** 2005. Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress induced damage of plasma membrane and PM-bound H<sup>+</sup>-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science* 168: 583-591.
- Rout, G.R. & Das, P.** 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23: 3-11.
- Sanches, L.V.C.** 2009. Desenvolvimento de *Aechmea fasciata* (Bromeliaceae) em função de diferentes saturações por bases no substrato e modos de aplicação da fertirrigação.

Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.

**Santos, F.S., Sobrinho, N.M.B.A. & Mazur, N.** 2006. Mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados. *In*: M.L. Fernandes (ed.) 2006. Nutrição Mineral de Plantas. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Viçosa, pp. 419-432.

**Scatena, V.L. & Segecin, S.** 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 28: 635-649.

**Soares, A.M.S. & Machado, O.L.T.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas* 1: 9-19.

**Soares, C.R.F.S., Accioly, A.M.A., Marques, T.C.L.L.S.M., Siqueira, J.O. & Moreira, F.M.S.** 2001. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13: 302-315.

**Soares, C.R.F.S., Graziotti, P.H., Siqueira, J.O., Carvalho, J.G. & Moreira, F.M.S.** 2001. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36: 339-348.

**Takamatsu, A.A.** 1995. Avaliação da biolixiviação de metais pesados por bactérias do gênero *Thiobacillus* em lodos biológicos para utilização agrícola como fertilizante. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

**Takanashi, C.A., Ceccantini, G.C.T. & Mercier, H.** 2007. Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19: 119-126.

**Vázquez, M.D., Barcelo, J. & Barcelo, J.** 1994. Compartment of zinc in roots and leaves of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Acta Botanica* 107: 243-250.

- Wang, X., Shi, G., Xu, Q. & Hu, J.** 2007. Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. *Journal of Plant Physiology* 164: 1062-1070.
- Wang, Z., Zhang, Y., Huang, Z. & Huang, L.** 2008. Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant Soil* 310: 137-149.
- Wannaz, E.D. & Pignata, M.L.** 2006. Calibration of Four Species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry* 53: 185-209.
- Weinstein, L.H., Kaur-Sawhney, R., Rajam, M.V., Wettlaufer, S.H. & Galston, A.W.** 1986. Cadmium-induced accumulation of putrescine in oat and bean leaves. *Plant Physiology* 82: 641-645.
- Woolhouse, H.W.** 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. *In*: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond & H. Ziegler (eds.). *Physiological Plant Ecology III. Responses to the Chemical and Biological Environment*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 245-300.
- Yang, X., Long, X., Ni, W. & Fu, C.** 2002. *Sedum alfredii* H. a new Zn hyperaccumulating plant first found in China. *Chinese Science Bulletin* 47: 1634-1637.
- Zhao, F.J., Lombi, E. & McGrath, S.P.** 2003. Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil* 249: 37-43.

## **Capítulo 4**

### **Discussão Geral**



## ***Discussão Geral***

Os aspectos moleculares e bioquímicos da toxicidade de metais no metabolismo da espécie *Aechmea blanchetiana* cultivada *in vitro* foram analisados, auxiliando na investigação dos mecanismos de tolerância de plantas à metais pesados. O mesmo foi observado por Basso *et al.* (2007) que concluíram que a utilização das técnicas de cultivo *in vitro* possibilitaram o estudo dos mecanismos de adaptação de plantas de eucalipto à toxidez do alumínio. A técnica permite avaliar a ação de poluentes separadamente em diferentes espécies vegetais, e em tempo e espaço reduzidos.

A ausência de danos visíveis nas plantas de *A. blanchetiana* possivelmente está associada ao tempo de exposição da espécie ao metal e as concentrações utilizadas. A bromélia *Tillandsia tricholepis* Baker, espécie de crescimento lento, quando expostas à vários locais próximos à emissão de material particulado, evidenciou danos apenas 6 meses após sua exposição (Wannaz & Pignata 2006). Experimentos mais longos com plantas de *A. blanchetiana* podem indicar se o tempo de exposição aos poluentes está relacionado com o surgimento de danos visíveis na espécie.

O crescimento do sistema radicular e foliar das plantas de *A. blanchetiana* foi pouco alterado pelos metais, embora o crescimento das raízes tenha sido menor nas plantas cultivadas com cobre, indicando que o cobre possa ser mais tóxico que o zinco para a espécie. Plantas de trigo tratadas com metais pesados (Cd, Zn, Cu, Pb, Cr e Ni) apresentaram diminuição da matéria seca e produção de grãos, redução do conteúdo de nitrogênio nos tecidos e do conteúdo de proteína nos grãos para todos os metais, sendo observada a ordem de toxidez de  $Cd > Cu > Ni > Zn > Pb > Cr$  para o crescimento das plantas (Athar & Ahmad 2002).

Os teores de macro e micronutrientes não foram significativamente alterados com o aumento das concentrações de cobre e zinco. Resultados semelhantes foram observados por

Marsola *et al.* (2005) em estudos com feijoeiro. Não foram realizados experimentos para determinar a localização dos metais estudados nos tecidos de *A. blanchetiana*, porém foi determinada uma linearidade entre o aumento dos teores de zinco nas plantas e o aumento das concentrações de zinco nos tratamentos. O acúmulo de cobre nos tecidos foi observado na maior concentração de cobre no meio (14,5  $\mu\text{M}$  Cu). O gênero *Aechmea* absorve até 80% do total de nutrientes oferecido por via foliar (Kampf 1984, citada por Sanches 2009) e, segundo Benzing (2000), as bromélias tendem a acumular macro e micronutrientes, juntamente com diversos íons nas folhas. O uso efetivo de plantas como bioacumuladoras requer conhecimento dos fatores que controlam a absorção e concentração de materiais acumulados nos tecidos, como o caminho de deposição, as propriedades biológicas, físicas e químicas do processo e efeitos do poluente e da espécie vegetal (Cape 2009). Sugere-se que mais estudos nesse sentido sejam realizados com a espécie.

O acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi observado nos experimentos de cobre e zinco por meio da técnica de DAB. As plantas são capazes de produzir EAOs em quantidades significativas, principalmente  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e esta pode ser regulada pela luz, hormônios ou ferimentos (Bentes & Matsuoka 2005). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ainda ser formado diretamente pela ação de metais como o cobre e o ferro na reação de Harber-Weiss (Apel & Hirt 2004), pela ação da enzima SOD sobre os íons superóxido ou naturalmente na respiração e fotossíntese (Soares & Machado 2007). As espécies da família Bromeliaceae refletem suas deficiências e os excessos nutricionais principalmente nas folhas (Paula *et al.* 1998), sendo, portanto, importante na avaliação de distúrbios físicos e químicos. Os estômatos e escamas do tecido foliar são o primeiro contato do tecido foliar com o metal presente no meio e pode estar diretamente ligada a presença da coloração de DAB observada nos estômatos.

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode atuar como molécula sinalizadora de defesa ou, em altas concentrações, ser prejudicial aos tecidos, atravessando membranas celulares e promovendo a peroxidação lipídica (Resende *et al.* 2003, Groppa & Benavides 2008). A inalteração na atividade de APX

em ambos os experimentos e nos teores de AA no estudo do zinco, sugerem que a ação sinalizadora do  $H_2O_2$ , ocorra sobre outros mecanismos de defesa não estudados nesse trabalho. Seu acúmulo, na epiderme em plantas cultivadas com zinco e no mesofilo de plantas cultivadas com cobre, pode ser precursor de danos que possam surgir com o maior tempo de exposição.

O conteúdo ou a atividade basal dos antioxidantes pode indicar o grau de resistência de uma determinada espécie a situações de estresse oxidativo (Bulbovas 2005). A atividade da enzima SOD nas plantas de *A. blanchetiana* foi afetada pelos tratamentos com cobre e zinco, podendo estar relacionado com a presença das formas Cu/Zn-SOD no citosol e cloroplasto das plantas (Alscher *et al.* 2002; Resende *et al.* 2003; Apel & Hirt 2004). Os altos teores basais de SOD e os poucos efeitos deletérios no crescimento das plantas observados em ambos os experimentos sugerem que a espécie possa se desenvolver em ambientes contaminados por metais pesados.

Os resultados da atividade do sistema antioxidante obtidos nesse estudo se assemelham aos realizados por Bulbovas (2005) em plantas de *Caesalpinia echinata* Lam., onde as defesas antioxidativas (AA, POD e SOD) não foram ativadas quando submetidas a concentrações crescentes de  $O_3$ . Panda & Khan (2004) observaram, em plantas de *Hydrilla verticillata* L., que com o aumento da concentração de quatro metais diferentes, houve a elevação uniforme da atividade de SOD nos tratamentos com cádmio e cobre e sua diminuição com zinco e cromo, indicando que o sistema antioxidante apresenta atividade diferenciada para cada metal. Candan & Tarhan (2003) estudando a ação dos metais zinco, cobre e manganês em plantas de *Mentha pulegium* L., observaram que os danos oxidativos aumentaram na proporção  $Mn > Zn > Cu$ ; entretanto, os resultados observados quanto ao acúmulo de  $H_2O_2$  no mesofilo foliar nas plantas de *A. blanchetiana*, indicam maior sintomatologia de toxidez por cobre que o zinco.

Entre poliaminas, geralmente Put e Spd são as mais abundantes, enquanto Spm está presente em quantidades inferiores ou traços (Bagni & Tassoni 2001). Nos experimentos, os teores de Spm, apesar de não significativos, foram maiores que os de Put e Spd, principalmente nas maiores concentrações de zinco. A aplicação exógena de Spm atuou como antioxidante em calos de *Hemerocallis* cultivadas *in vitro* (Debiasi *et al.* 2007). Altas concentrações de zinco e cobre em folhas de *Populus alba* L. induziram respostas diferenciais no acúmulo de poliamina, estando correlacionadas aos sintomas de toxidez (danos visíveis) (Franchin *et al.* 2007). As alterações nos conteúdos de poliaminas podem variar de acordo com as espécies vegetais ou cultivares, duração e intensidade do tratamento de estresse e estágio de desenvolvimento dos tecidos (Liu *et al.* 2007). A diminuição dos teores de Spm com o aumento das concentrações de cobre e o aumento da mesma em função dos teores de zinco observados nas plantas de *A. blanchetiana*, evidenciam que para a mesma espécie os teores de poliaminas podem variar com o metal estudado, apresentando diferentes respostas de toxicidez.

Luo & Rimmer (1995), sugeriram que a ação do zinco e do cobre em plantas de cevada é semelhante, podendo efetivamente um substituir o outro, contudo os diferentes resultados observados para o acúmulo de  $H_2O_2$  e teores de poliaminas nas plantas de *A. blanchetiana* indicam uma ação diferenciada de cada metal sobre os mecanismos de defesa da espécie. Por serem essenciais ao desenvolvimento e crescimento dos vegetais, o zinco e o cobre, provavelmente, são mais tolerados pelas plantas do que outros elementos químicos não essenciais, sendo necessária a exposição prolongada dessa espécie a esses metais para gerar mudanças bioquímicas.

A técnica de DAB *in vivo* permitiu detectar o acúmulo de  $H_2O_2$  e metais nos tecidos sendo a principal ferramenta de análise para determinar a ação do cobre e do zinco nas plantas de *A. blanchetiana*. A técnica não necessita de instrumentação sofisticada, possibilitando

avaliar os mecanismos de sensibilidade ou tolerância ao estresse, e o diagnóstico precoce e correto de lesões antes do surgimento de sintomas visíveis (Faoro & Iriti 2005).

As concentrações de cobre e zinco utilizadas, embora 10 vezes e 100 vezes maiores que as concentrações aceitas pela resolução Conama (2005), não foram suficientes para causar distúrbios severos na atividade do sistema antioxidante, crescimento ou equilíbrio nutricional, sugerindo que concentrações mais elevadas devam ser testadas. Entretanto, as variações na atividade da enzima SOD e as tendências observadas para os teores de poliaminas, em especial de Spm, indicam a importância e viabilidade de mais estudos quanto às respostas do sistema antioxidante de *A. blanchetiana*, submetidas a concentrações de zinco e cobre superiores às utilizadas nos experimentos.

O acúmulo de cobre e zinco nos tecidos de *A. blanchetiana*, nos tratamentos com as maiores concentrações, indica a capacidade acumuladora da espécie, sendo necessário a realização de estudos para futuramente determinar o uso da espécie como bioacumuladora.

## **Referências Bibliográficas**

- Alscher, R.G., Erturk, N. & Heath, L.S.** 2002. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Apel, K. & Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Biology* 55: 373-399.
- Athar, R. & Ahmad, M.** 2002. Heavy metal toxicity: effect on plant growth and metal uptake by wheat, and on free living azotobacter. *Water, Air, and Soil Pollution* 138: 165-180.
- Bagni, N. & Tassoni, A.** 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317.
- Basso, L.H.M., Lima, G.P.P., Gonçalves, A.N., Vilhena, S.M.C. & Padilha, C.C.F.** 2007. Efeito do alumínio no conteúdo de poliaminas livres e atividade da fosfatase ácida durante o crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas *in vitro*. *Scientia Forestalis* 75: 9-18.
- Bentes, J.L.S. & Matsuoka, K.** 2005. Localização de peróxido de hidrogênio durante a resposta de defesa de tomateiro contra *Stemphylium solani*. *Fitopatologia Brasileira* 30: 643-646.
- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Parte II, p. 52-77.
- Bulbovas, P.** 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras de resistência da espécie à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Candan, N. & Tarhan, L.** 2003. The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in *Mentha pulegium* organs grown in  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  stress conditions. *Plant Science* 165: 769-776.

- Cape, J.N.** 2009. Plants as Accumulators of Atmospheric Emissions. *In*: A.H. Legge (Ed). Developments in Environmental Science. Elsevier Ltd, Inglaterra. Cap 3. p.61-98.
- Conama** 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.
- Debiasi, C., Fraguas, C.B. & Lima, G.P.P.** 2007. Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp. *Ciencia Rural* 37: 1014-1020.
- Faoro, F. & Iriti, M.** 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biologia Plantarum* 49: 585-592.
- Franchin, C., Fossati, T., Pasquini, E., Lingua, G., Castiglione, S., Torrigiani, P. & Biondi, S.** 2007. High concentrations of zinc and copper induce differential polyamine responses in micropropagated white poplar (*Populus alba*). *Physiologia Plantarum* 130: 77-90.
- Groppa, M.D. & Benavides, M.P.** 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.
- Liu, J.H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. & Moriguchi, T.** 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology* 24: 117-126.
- Luo, Y. & Rimmer, D.L.** 1995. Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal-contaminated soil. *Environmental Pollution* 88: 79-83.
- Marsola, T., Miyazawa, M. & Pavan, M.A.** 2005. Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro em relação com o extraído do solo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9: 92-98.
- Panda S.K. & Khan, M.H.** 2004. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 115-118.

- Paula, M.B., Mesquita, H.A. & Nogueira, F.D.** 1998. Nutrição e adubação do abacaxizeiro. Informe Agropecuário 19: 33-39.
- Resende, M.L.V., Salgado, S.M.L. & Chaves, Z.M.** 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. Fitopatologia Brasileira 28: 123-130.
- Sanches, L.V.C.** 2009. Desenvolvimento de *Aechmea fasciata* (Bromeliaceae) em função de diferentes saturações por bases no substrato e modos de aplicação da fertirrigação. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.
- Soares, A.M.S. & Machado, O.L.T.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas 1: 9-19.
- Wannaz, E.D. & Pignata, M.L.** 2006. Calibration of four species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. Journal of Atmospheric Chemistry 53: 185-209.



## Capítulo 5

### **Conclusões Finais**

- A espécie *Aechmea blanchetiana* apresenta tolerância às concentrações de Cu e Zn estudadas, não apresentando mudanças significativas na atividade da ascorbato peroxidase (APX) e, no caso do zinco, nos teores de ácido ascórbico (AA). Contudo, os metais influenciaram a atividade da superóxido dismutase (SOD).
- A espécie possui capacidade acumuladora para cobre e zinco, em especial zinco.
- Na presença de Cu e Zn a espécie apresenta acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nos tecidos foliares e tendência de alterações nos teores de poliaminas, podendo o  $H_2O_2$  estar agindo como sinalizador para ativação do sistema de defesa e a poliaminas como mecanismo de tolerância.
- O uso da técnica de cultivo *in vitro* possibilitou a amenização de fatores externos que poderiam interferir nos resultados, mostrando ser um importante instrumento para pesquisas futuras.