



Influência de concentrações tóxicas de Cádmio nos teores de aminoácidos livres e índice de clorofila em *Brachiaria decumbens*¹

André Marques dos Santos⁽²⁾; **João Paulo Pereira Diegues**⁽³⁾; **Diana Hartuiq Debarba**⁽⁴⁾; **Matheus Motta Gomes**⁽⁴⁾; **Marco Andre Alves de Souza**⁽²⁾; **Leandro Azevedo Santos**⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CNPq (Edital Universal 14/2012).

⁽²⁾ Prof. Adjunto, Dep. de Química/ICE; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ; Seropédica, Rio de Janeiro; E-mail: amarques.ufrj@gmail.com; ⁽³⁾ Bolsista IC (Convênio UFRRJ/CNPq-PIBITI), Discente do Curso de Agronomia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ; ⁽⁴⁾ Discente do Curso de Eng. Química; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ; ⁽⁵⁾ Prof. Adjunto, Dep. Solos/IA; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.

RESUMO: Estudos têm sido realizados visando o entendimento dos mecanismos bioquímicos que as plantas utilizam para ativar seus mecanismos celulares de resposta adaptativa à contaminação por metais pesados. O conhecimento desses processos deve contribuir para a utilização de espécies vegetais em estratégias de fitorremediação. Nesse sentido, foi conduzido um experimento cultivando-se *Brachiaria decumbens* em solução nutritiva contaminada com Cádmio nas seguintes concentrações: 0 (testemunha, sem contaminação); 9,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1,09 mg de Cd L^{-1}); 19,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2,19 mg de Cd L^{-1}); 48,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (5,47 mg L^{-1}) e 97,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (10,94 mg L^{-1}). Raízes e folhas dessas plantas foram coletadas às 8, 24, 96 e 144 horas após a aplicação do Cd. Foi determinada a massa fresca, o índice de Clorofila Falker (ICF) e os teores N-amino livre. A contaminação com Cd prejudicou o acúmulo de massa fresca, reduziu o índice ICF e provocou aumento nos teores de aminoácidos livres em *B. decumbens*. Desta forma, esta espécie parece ter ajustado seu metabolismo a fim de resistir à contaminação por Cd.

Termos de indexação: Metais Pesados, Fitorremediação e Índice ICF.

INTRODUÇÃO

A capacidade extratora e a tolerância das plantas a elevadas concentrações de metais pesados representa as bases de processos tecnológicos variados, conhecidos por fitorremediação, e se relacionam com diversas características, como: capacidade de acumular altas concentrações de metais nos tecidos; potencial para produção de biomassa; e sistema radicular bastante ramificado e eficiente na absorção do contaminante do solo (Lasat, 2002; Nascimento & Xing, 2006). No caso dos metais, as espécies acumuladoras teriam maior potencial fitoextrator, mas geralmente apresentam tamanho reduzido e baixa taxa de crescimento, o

que limita sua aplicação em larga escala (Raskin et al., 1997).

Além da extração de metais biodisponíveis do solo, a introdução de plantas em área contaminada melhora o aporte de material orgânico, aumenta a quantidade de raízes que contribuem para melhorar a estrutura, atenua processos erosivos e melhora o habitat para os microrganismos do solo (Khan et al., 2000).

Grandes esforços têm sido realizados para integrar conhecimentos que facilitem a reabilitação de solos poluídos com metais pesados, e assim, possibilitar o retorno da funcionalidade e estabilidade do ecossistema formado (Vangronsveld & Cunningham, 1998). Para isto, procura-se amenizar o efeito da fitotoxicidade dos metais no solo, visando ao estabelecimento da vegetação.

No Brasil, apesar dos estudos nessa área ainda serem muito escassos, trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de avaliar o comportamento de espécies herbáceas na fitorremediação de áreas contaminadas com metais pesados. Dentre as espécies estudadas, a *Brachiaria decumbens* apresenta-se como uma espécie promissora, pois é amplamente cultivada nos trópicos, possui alta produção de biomassa e tolerância a altas concentrações de metais pesados no solo.

Santos et al. (2011) apontaram a *B. decumbens* como a planta que mais tolerou e acumulou Cádmio (Cd) e Zinco (Zn) em seus tecidos foliares, apresentando potencial para utilização em projetos de recuperação de áreas contaminadas com esses elementos. Esses mesmos autores sugerem a realização de estudos adicionais visando melhor compreensão do mecanismo adaptativo dessa planta em resposta ao estresse provocado pelo excesso de Cd e Zn.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de concentrações crescentes de Cd sobre parâmetros bioquímicos do metabolismo de *B. decumbens*, visando uma melhor compreensão de seu mecanismo de tolerância ao



Cd, para uso dessa espécie em estratégias futuras de fitorremediação.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições experimentais em câmara de crescimento

Sementes de *B. decumbens* foram germinadas em mistura de areia autoclavada e vermiculita. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para câmara de crescimento e trinta dias após a germinação, as mesmas foram transferidas para vasos contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada. A solução nutritiva foi fornecida inicialmente à metade da força iônica, dos dez dias em diante à força iônica total, mantendo-se o pH em 5,5. Os tratamentos consistiram na contaminação da solução nutritiva utilizando-se nitrato de cádmio como fonte de Cd, nas seguintes concentrações: 0 (testemunha, sem contaminação); 9,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1,09 mg de Cd L^{-1}); 19,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2,19 mg de Cd L^{-1}); 48,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (5,47 mg L^{-1}) e 97,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (10,94 mg L^{-1}). Em cada vaso foram colocadas cinco plântulas, correspondentes a cada coleta.

Raízes e folhas dessas plantas foram coletadas às 8, 24, 96 e 144 horas após a aplicação do Cd. Após a coleta, raízes e folhas foram separadas e pesadas. As raízes foram colocadas em solução de CaCl_2 (10 mmol L^{-1}) por 10 minutos e posteriormente lavadas com água deionizada. Parte do material vegetal foi separado para determinação de metais e o restante foi congelado em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenados a -80°C para as demais análises.

Após a aplicação do Cádmio, foi determinado o índice de Clorofila Falker (ICF), utilizando-se o aparelho clorofiLOG CFL1030 (FALKER Automação Agrícola, Brasil).

Foi avaliado o acúmulo de massa fresca e coletado aproximadamente 1 g de material fresco da parte aérea e raízes para realização da extração alcoólica seguida de partição com clorofórmio (Fernandes, 1984). A fração solúvel obtida foi armazenada e posteriormente utilizada para a determinação dos teores N-amino livre (Yemm e Cocking, 1955).

Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente utilizando-se o programa Sisvar para Windows versão 5.3 (Ferreira, 2011). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ou pelo desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a aplicação do Cádmio, houve redução no índice ICF (Índice de clorofila Falker) causado pela contaminação da solução de cultivo de *B. decumbens* (Figura 1). A queda no índice ICF ocorreu já 24 horas após a aplicação dos tratamentos, sendo mais acentuada no último tempo de coleta (Figura 1). Desta forma, acredita-se que a aplicação de Cd influenciou negativamente os teores de clorofila total, prejudicando a fotossíntese.

Foi observada diminuição na massa fresca da parte aérea e raízes em todas as concentrações de Cádmio (Figura 2). Na parte aérea e raízes, a maior contaminação (97,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd) comprometeu grandemente a produção de biomassa vegetal em *B. decumbens*, já que não houve diferença significativa no acúmulo de massa fresca as 8 e 144 horas (Figura 2).

Na parte aérea de *B. decumbens* (Figura 3), houve aumento na síntese de aminoácidos quando as plantas foram submetidas à contaminação por Cd, especialmente quando a exposição foi de longa duração (144 h). O mesmo padrão não foi observado nas raízes, com exceção do maior tempo de exposição (144 h), no qual a maior dose de contaminação com Cd provocou aumento nas concentrações de aminoácidos em relação à testemunha, sem contaminação (Figura 3). Assim, parece estar havendo mudança no metabolismo vegetal a fim de proporcionar condições às plantas para resistirem melhor à contaminação.

De fato, é conhecido que as plantas utilizam-se dos aminoácidos e seus derivados, visando promover alguma resistência ao metal e detoxificar o efeito desses em suas células (Briat & Lebrun, 1998). Os aminoácidos livres, tais como histina (His) e nicotinamida, desempenham papel importante na hiperacumulação de metais, pois eles formam complexos estáveis com cátions divalentes. A histidina livre é considerada o mais importante ligante envolvido na hiperacumulação de Níquel (Ni) (Callahan et al., 2006).

Foi constatado que estes aminoácidos, no xilema, podem quelatar metais pesados como o Cd e o Ni (Briat & Lebrun, 1999). Em soja, foi observado o aumento de aminoácidos solúveis na seiva do xilema nestas plantas após a exposição ao Ni e ao Cd (Shintinawy & El-Ansary, 2000). Em plântulas de trigo, foi verificado que, após o tratamento com Cobre (Cu) houve um acúmulo de aminoácidos solúveis como valina, lisina e arginina tanto nas raízes como na parte aérea (Lesko et al., 2001). Em *Crotalaria cobalt* exposta ao Cobalto (Co), foi constatado um significativo aumento de cisteína, o que sugere que este aminoácido esteja envolvido na complexação do Co nas células desta planta (Oven

et al., 2002). Em arroz, foi verificada a variação de prolina, um indicador de estresse hídrico, na parte aérea após a exposição desta planta ao Cu (Chen et al., 2000). Em *Alysum lesbiacum*, foram verificadas variação de histidina na presença do Ni e a formação de um complexo de quelatação deste metal com este aminoácido (Kramer et al., 1996).

CONCLUSÕES

A contaminação com Cd influenciou negativamente o acúmulo de massa fresca e o índice ICF de *B. decumbens*, sugerindo ter havido danos ao aparato fotossintético com consequente redução na produção de biomassa pela espécie estudada.

Por outro lado, houve aumento nos teores de aminoácidos livres quando a *B. decumbens* foi submetida à contaminação por Cd. Desta forma, parece estar havendo um ajuste no metabolismo vegetal a fim de proporcionar condições às plantas para resistirem melhor à contaminação.

Os dados obtidos até o momento são preliminares e mais estudos são necessários para o completo entendimento dos mecanismos bioquímicos utilizados pela *B. decumbens* para resistir à contaminação por metais pesados.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelos recursos disponibilizados para realização da pesquisa e também pela bolsa de Iniciação Científica disponibilizada por meio do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (Convênio UFRRJ/CNPq-PIBITI).

REFERÊNCIAS

BRIAT, J.F. & LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. *Plant Biology and Pathology*, 322(1):43-54, 1998.

BRIAT, J.F. & LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus De L'Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences*, 322:43-54, 1999.

CALLAHAN, D.L.; BAKER, A.J.M.; KOLEV, S.D.; WEDD, A.G. Metal ion ligands in hyper-accumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11:2-12, 2006.

CHEN, C.T.C.; CHEN, L.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Science*, 160:283-290, 2000.

FERNANDES, M.S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. *Turrialba*, 34:9-18, 1984.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35(6):1039-1042, 2011.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley, Cal. Agric. Exp. Station, 1950. 347p.

KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T.M.; KHOO, C.S.; HAYES, W.J. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 21:197-207, 2000.

KRAMER, U.; HOWELLS, J. D. C.; CHARNOCK, J. M.; BAKER, A. J. M.; SMITH, J. C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*: 379:635-638, 1996.

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

LESKO, K.; STEFANOVITS, E.; PAIS, I.; SIMON, L. Effect of cadmium and titanium- ascorbate stress on biologically active compounds in wheat seedling. *Novenytermeles*, 50:71-81, 2001.

NASCIMENTO, C.W.A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia Agricola*, 63:299-311, 2006.

OVEN, M.; GRILL, E.; GOLA, G.A.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Increase of free cysteine and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. *Phytochemistry*, 60(5):467-474, 2002.

RASKIN, I.; SMITH, R.D.; SALT, D.E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:221-285, 1997.

SANTOS, F. S. D.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B. DO; MAZUR, N.; GARBISU, C.; BARRUTIA, O.; & BECERRIL, J. M. Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição de pigmentos fotoprotetores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. *Química Nova*, 34(1):16-20, 2011.

SHINTINAWY, EL.; ANSARY, A. Differential effect of Cd⁺² and Ni⁺² on amino acid metabolism in soybean seedlings. *Biologia Plantarum*, 43(1):79-84, 2000.

VANGRONSVELD, J.; CUNNINGHAM, S.D. Metal-contaminated soils: in situ inactivation and phytoremediation. Berlin: Springer, 1998. 265p.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. *Analytical Biochemistry*, 80:209-213, 1955.

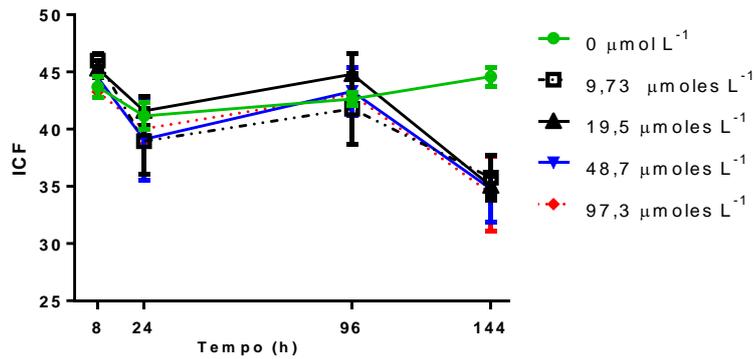


Figura 1 – Valores médios do Índice de Clorofila Falker (ICF) em folhas de *Brachiaria decumbens* cultivadas em solução nutritiva contaminada com Cádmiu (0; 9,73; 19,5; 48,7; 97,3 µmoles L⁻¹) após 8, 24, 96 e 144 horas de contaminação. As barras verticais representam a média de quatro repetições ± desvio padrão.

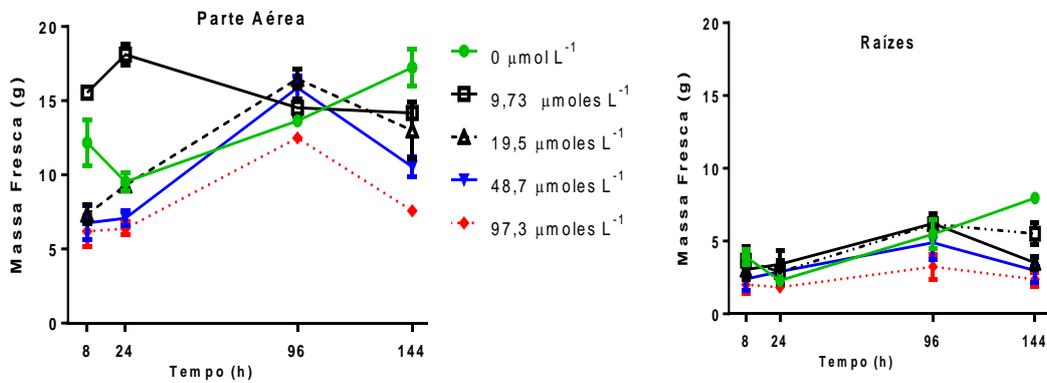


Figura 2 – Massa fresca da parte aérea e raízes de *Brachiaria decumbens* cultivada em solução nutritiva contaminada com Cádmiu (0; 9,73; 19,5; 48,7; 97,3 µmoles L⁻¹) após 8, 24, 96 e 144 horas de contaminação. As barras verticais representam a média de quatro repetições ± desvio padrão.

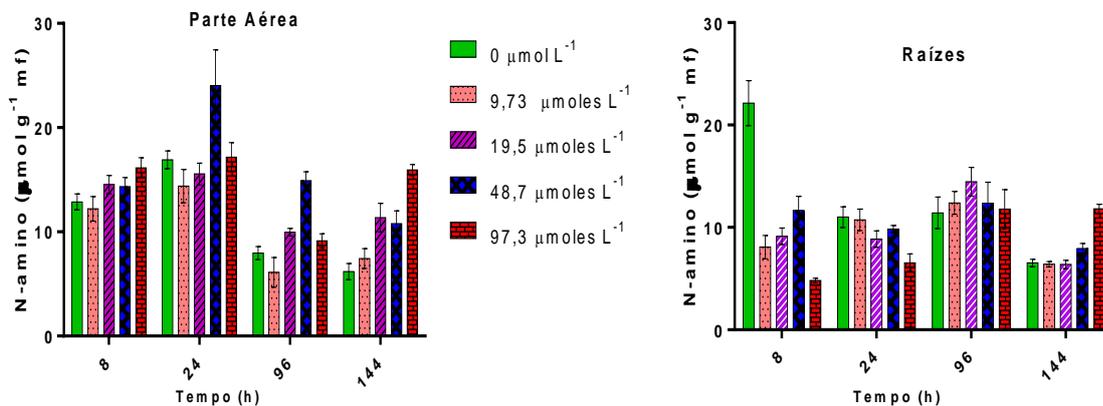


Figura 3 – Teores de N-amino na parte aérea e raízes de *Brachiaria decumbens* cultivada em solução nutritiva contaminada com Cádmiu (0; 9,73; 19,5; 48,7; 97,3 µmoles L⁻¹) após 8, 24, 96 e 144 horas de contaminação. As barras verticais representam a média de quatro repetições ± desvio padrão.