Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Análise das possíveis alterações do metabolismo de lisina induzidas pelo cádmio
em milho (*Zea mays*)

Fabiana Hibary Kato Belini

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Fabiana Hibary Kato Belini
Bacharel em Ciências Biológicas

Análise das possíveis alterações do metabolismo de lisina induzidas pelo cádmio em milho (*Zea mays*)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Belini, Fabiana Hibary Kato

Análise das possíveis alterações do metabolismo de lisina induzidas pelo cádmio em milho (*Zea mays*) / Fabiana Hibary Kato Belini. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

83p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Milho 2. Cádmio 3. Metabolismo de lisina 4. Estresse abiótico L. . I.
Título

DEDICATÓRIA

*Às minhas filhas, Sofia e Clara,
Ao meu amado esposo, Hideraldo,
Aos meus pais, irmão, cunhada e sobrinhos*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus por sempre iluminar meu caminho;

À FAPESP e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos que foram fundamentais para a realização deste trabalho;

À FAPESP (2009/54676-0) e CNPq (476096/2013-8) pelo apoio financeiro ao projeto;

Ao Prof. Ricardo Antunes de Azevedo, por ter confiado em mim e pela orientação e dedicação dispensada durante estes anos;

À doutora Salete, pela ajuda, pelos ensinamentos e amizade;

Aos meus amigos de laboratório (Mônica, Karina, Berenice, Fernanda, Márcia e Katherine);

Ao Fernando pela constante ajuda;

Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial ao Cláudio Segatelli, que sempre esteve disposto a ajudar;

Especialmente agradeço muito à minha família. Às minhas filhas, Sofia e Clara, pois seus sorrisos, beijos e abraços fizeram e fazem as dificuldades se tornarem mais leves; ao meu esposo, Hideraldo, pela paciência e imenso apoio durante todos esses anos; aos meus pais, que não mediram esforços para me ajudar sempre que precisei; ao meu irmão e família, pelas orações e confiança;

Enfim, à todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho;

EPÍGRAFE

“A razão e a fé caminham juntas, mas a fé vai mais longe”

(Santo Agostinho)

Sumário

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E METABOLISMO DA LISINA.....	13
2.1. INTRODUÇÃO	13
2.1.1. Cádmio	13
2.1.2. Enzimas Antioxidantes	14
2.1.3. Proteínas de reserva.....	15
2.1.4. Biossíntese e Degradação da lisina	15
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.2.1. Condução do experimento.....	18
2.2.2. Quantificação de Cádmio.....	19
2.2.3. Análise do solo	19
2.2.4. Quantificação de proteínas	19
2.2.5. Análise da peroxidação lipídica e quantificação de peróxido de hidrogênio	19
2.2.6. Análise das enzimas antioxidantes	20
2.2.6.1. Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	20
2.2.6.1.1. Atividade da enzima SOD em espectrofotômetro	20
2.2.6.1.2. Atividade da enzima SOD em PAGE não-desnaturante	20
2.2.6.1.3. Caracterização das isoenzimas de SOD	20
2.2.6.2. Atividade de Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	21
2.2.6.2.1. Atividade da enzima CAT em espectrofotômetro	21
2.2.6.2.2. Atividade da enzima CAT em PAGE não-desnaturante	21
2.2.6.3. Atividade de glutatona redutase (GR, EC 1.6.4.2)	21
2.2.6.3.1. Atividade da enzima GR em espectrofotômetro	21
2.2.6.3.2. Atividade da enzima GR em PAGE não-desnaturante.....	21
2.2.6.4. Atividade de Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)	22
2.2.6.4.1. Atividade da enzima APX em espectrofotômetro.....	22
2.2.6.4.2. Atividade da enzima APX em PAGE não-desnaturante	22
2.2.6.5. Atividade de Guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7)	22
2.2.6.5.1. Atividade da enzima GPX em espectrofotômetro.....	22
2.2.6.5.2. Atividade da enzima GPX em PAGE não-desnaturante	22
2.2.7. Proteínas de Reserva.....	23
2.2.7.1. Extração das Proteínas de Reserva.....	23
2.2.7.2. SDS-PAGE	23
2.2.8. Aminoácidos Solúveis Totais em Grãos	23
2.2.9. Enzimas do metabolismo da lisina	24
2.2.9.1. Extração e purificação parcial das enzimas AK, HSDH e DHDPS.....	24
2.2.9.1.1. Determinação da atividade da enzima AK	24
2.2.9.1.2. Determinação da atividade da enzima HSDH.....	25
2.2.9.1.3. Determinação da atividade da enzima DHDPS	25
2.2.9.1.3.1. Síntese do aspartato semialdeído (substrato da DHDPS)	25
2.2.9.2. Extração e purificação parcial das enzimas LOR e SDH	25
2.2.9.2.1. Determinação da atividade da enzima LOR.....	26
2.2.9.2.2. Determinação da atividade da enzima SDH.....	26
2.2.10. Separação e quantificação de aminoácidos solúveis pela cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)	26
2.3. RESULTADOS	28
2.3.1. Quantificação de cádmio	28
2.3.2. Quantificação de cádmio no solo.....	28
2.3.3. Análise da peroxidação lipídica e quantificação de peróxido de hidrogênio	29
2.3.4. Enzimas antioxidantes.....	29
2.3.5. Proteínas de reserva do grão	32
2.3.5.1. Quantificação das proteínas de reserva	32
2.3.5.2. SDS-PAGE proteínas de reserva.....	32
2.3.6. Grãos coletados com 20 DAP	33
2.3.6.1. Peroxidação lipídica.....	34

2.3.7. Aminoácidos totais (grãos 50 DAP)	35
2.3.8. Enzimas envolvidas na síntese da lisina	35
2.3.8.1. Determinação da atividade específica da AK	35
2.3.8.2. Determinação da atividade específica da HSDH	36
2.3.8.3. Determinação da atividade específica da DHDPS	37
2.3.9. Enzimas envolvidas na degradação da lisina	37
2.3.9.1. Determinação das atividades específicas da LOR e da SDH	37
2.3.10. Separação e quantificação de aminoácidos livres por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)	38
2.4. DISCUSSÃO	40
REFERÊNCIAS	48
3. CAPÍTULO 2. METABOLISMO DA LISINA: OUTRO CONTEXTO	55
3.1. MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1.1. Experimento em casa de vegetação	55
3.1.2. Quantificação de cádmio	56
3.1.3. Análise das atividades especificadas das enzimas AK, DHDPS, HSDH, LOR e SDH	56
3.1.4. Separação e quantificação de aminoácidos solúveis pela cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)	56
3.2. RESULTADOS	56
3.2.1. Quantificação de Cádmio	56
3.2.2. Determinação da atividade específica da AK	56
3.2.3. Determinação da atividade específica da HSDH	57
3.2.4. Determinação da atividade específica da DHDPS	58
3.2.5. Determinação da atividade específica da LOR e SDH	58
3.2.6. Separação e composição dos aminoácidos livres por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)	59
3.3. DISCUSSÃO	61
REFERÊNCIAS	64
4. ESTUDOS COMPLEMENTARES	65
4.1. PLÂNTULAS	65
4.1.1. Introdução	65
4.1.2. Uso eficiente de nitrogênio	65
4.1.3. Material e Métodos	66
4.1.3.1. Condução do experimento com plântulas em casa de vegetação	66
4.1.3.2. Análise do solo	66
4.1.3.3. Análise da peroxidação lipídica	67
4.1.3.4. Aminoácidos totais em folhas	67
4.1.4. Resultados	67
4.1.4.1. Plântulas	67
4.1.4.2. Análise do solo	67
4.1.4.3. Peroxidação lipídica	68
4.1.4.4. Aminoácidos solúveis totais	69
4.1.5. Discussão	69
REFERÊNCIAS	71
4.2. EMBRIÕES IMATUROS E ENSAIO DO COMETA	73
4.2.1. Introdução	73
4.2.1.1. Efeito do Cd em radículas/coleóptilos de embriões imaturos (20 DAP)	73
4.2.1.2. Avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa	73
4.2.2. Material e Métodos	75
4.2.2.1. Germinação de embriões imaturos	75
4.2.2.1.1. Análise das enzimas catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase em PAGE não-desnaturante	76
4.2.2.2. Ensaio do Cometa	76
4.2.2.2.1. Germinação em papel filtro	76
4.2.2.2.2. Preparação das lâminas	76
4.2.3. Resultados	77
REFERÊNCIAS	80

5. CONCLUSÕES.....	83
---------------------------	-----------

RESUMO

Análise das possíveis alterações do metabolismo de lisina induzidas pelo cádmio em milho (*Zea mays*)

O crescente aumento da contaminação do solo por metais pesados, em especial o cádmio (Cd), associado à importância dos cereais, sendo estes nos países subdesenvolvidos e alguns em desenvolvimento a maior fonte protéica, são aspectos importantes que originaram a ideia deste estudo que procura analisar o metabolismo do aminoácido essencial lisina em milho (*Zea mays*), submetido à contaminação por Cd. Foram realizados vários ensaios a fim de se avaliar a atividade das principais enzimas do sistema antioxidante, a quantidade de aminoácidos solúveis totais e a atividade das enzimas da via do anabolismo e catabolismo da lisina. Os resultados foram apresentados na forma de dois capítulos. O capítulo 1 apresenta a caracterização bioquímica das plantas de milho (linhagem 161) submetidas ao estresse pelo Cd analisando-se a quantificação do metal nos diferentes tecidos vegetais, análise das principais enzimas do sistema antioxidante, quantificação de proteínas de reserva e aminoácidos solúveis totais, além da análise das principais enzimas da via da lisina. Os resultados da caracterização bioquímica mostraram que estes parâmetros avaliados não diferiram significativamente entre as plantas contaminadas e as do controle. No capítulo 2 foi realizada a análise das principais enzimas da via da lisina em um outro genótipo de milho, sendo uma variedade comercial (AL Avaré). De maneira geral, os resultados mostraram que o Cd induziu leves alterações nas atividades de algumas enzimas da via da lisina. Além disso, foram observadas diferenças entre os dois genótipos, tanto nas atividades específicas de enzimas como na quantificação de aminoácidos livres. Além dos dois capítulos, foram incluídos dois estudos complementares, que trouxeram análises adicionais ao estudo principal. O estudo complementar 1, apresenta os resultados de um estudo com plântulas de milho, de diferentes genótipos, sendo um com maiores teores de lisina (*opaco2*) e os outros para alta eficiência no uso de nitrogênio (EUN) e para baixa EUN. Tanto os resultados da peroxidação lipídica, quanto a quantidade de aminoácidos solúveis totais apresentaram diferenças entre os genótipos e doses de Cd utilizadas. O estudo complementar 2 apresenta alguns dados de enzimas antioxidantes, em PAGE não-desnaturante, de coleótilos e radículas de embriões imaturos (sem a presença de endosperma) e germinados na presença de Cd. Estes dados mostraram uma nítida resposta antioxidante. Além disso, foram analisadas algumas células provenientes de radículas de sementes de milho germinada na presença de Cd, a fim de se avaliar os danos do metal sobre o DNA. Em resumo, os resultados obtidos neste estudo nos ajudaram a entender um pouco mais sobre o efeito do Cd nos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas analisadas. Entretanto, estes dados podem ser considerados o ponto de partida para estudos mais detalhados.

Palavras-chave: 1. milho 2. cádmio. 3. metabolismo de lisina 4. estresse abiótico

ABSTRACT

Analysis of possible changes in lysine metabolism induced by cadmium in maize (*Zea mays*)

The increase of soil contamination by heavy metals, especially cadmium (Cd), associated with the importance of cereals, which are the major source of protein in the underdeveloped and some developing countries, are important aspects that gave rise to the idea for this study which tries to analyze the metabolism of the essential amino acid lysine in maize (*Zea mays*), submitted to the contamination by Cd. Several tests were carried out to evaluate the activity of the main enzymes of the antioxidant system, the amount of total soluble amino acids and the activity of enzymes of lysine metabolism. The results were presented two chapters. Chapter 1 reports the biochemical characterization of the maize plants (a line with higher levels of lysine, L161) submitted to stress by Cd analyzing the metal quantification in different plant tissues, analysis of the main enzymes of the antioxidant system, quantification of reserve proteins and total soluble amino acids, in addition to the analysis of the main enzymes of lysine pathway. The results showed that these parameters did not differ significantly between contaminated plants and those of the control. In Chapter 2 the main enzymes of lysine metabolism were analyzed in a commercial variety of maize (AL Avaré). Overall, the results showed that Cd induced slight changes in the activities of some enzymes of lysine pathway. In addition, differences were observed between the two genotypes, both in the specific activities of enzymes and on quantification of soluble amino acids. In addition to the two chapters, two complementary studies were included, which provided additional analyzes to the main study. Complementary study 1 presents the results of a study with maize seedlings of different genotypes, one with higher lysine (*opaque2*) and others for high efficiency in nitrogen use (EUN) and low EUN. Lipid peroxidation results and the amount of total soluble amino acids showed differences between the genotypes and the Cd concentrations used. Complementary study 2 presents some non-denaturing antioxidant enzyme data from coleoptiles and immature embryo rootlets (without the presence of endosperm) and germinated in the presence of Cd. These data showed a clear antioxidant response. In addition, some cells from germinated maize seedlings were analyzed in presence of Cd in order to evaluate the damage of the metal on the DNA. In summary, the results obtained in this study helped us to understand a little more about the effect of Cd on the physiological and biochemical processes of the plants analyzed. However, these data can be considered the starting point for more detailed studies.

Palavras-chave: 1. maize 2. cadmium. 3. lysine metabolism 4. abiotic stress

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas (Departamento de Genética – ESALQ) vem realizando estudos basicamente inseridos em duas principais linhas de pesquisa. Uma é a avaliação das alterações fisiológicas e bioquímicas, geradas pelo estresse oxidativo, ocasionada por metais pesados em plantas. A outra se baseia no estudo do metabolismo de aminoácidos essenciais, em especial a lisina, em cereais. Durante esses anos, estas duas linhas de pesquisa foram desenvolvidas separadamente, de maneira que a análise das modificações geradas pelo estresse oxidativo concomitantemente com a análise da via metabólica da lisina ainda não havia sido realizada. Assim, a ideia deste trabalho surgiu, baseando-se na junção destas duas linhas de pesquisa, tendo por objetivo principal analisar se existem alterações no metabolismo da lisina em plantas de milho expostas ao cádmio (Cd). Além deste, outros objetivos específicos foram abordados, tais como: analisar se existe o transporte do metal para os grãos e se este transporte ou mesmo o fato do cultivo da planta na presença de um metal tóxico pode afetar a síntese e acúmulo das proteínas de reserva do grão. Ainda mais, se existe alguma resposta por parte das principais enzimas antioxidantes.

Esta tese apresenta os resultados da caracterização bioquímica das plantas de milho submetidas ao estresse pelo Cd (quantificação do metal nos diferentes tecidos vegetais; análise das principais enzimas do sistema antioxidante; proteínas de reserva e aminoácidos solúveis totais), bem como da análise das principais enzimas da via da lisina; quantificação de aminoácidos solúveis totais; peroxidação lipídica nos grãos (em dois distintos genótipos de milho).

Além disso têm-se, ao final, algumas estudos complementares que elucidaram um pouco mais sobre a influência do Cd no processo fisiológico/bioquímico das plantas analisadas.

2. CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E METABOLISMO DA LISINA

2.1. Introdução

2.1.1. Cádmio

O Cádmio (Cd) é um dos metais pesados mais tóxicos para as plantas e seres humanos e, devido principalmente a ações antrópicas, este metal vem sendo continuamente agregado ao meio ambiente. De acordo com Gill e Tuteja, (2011), o seu coeficiente de absorção é maior quando comparado com outros metais pesados como zinco e cobre. A absorção do Cd depende da sua concentração no solo, da proporção de Cd disponível como Cd^{+2} e da capacidade de sequestro das plantas (Benavides et al., 2005). O Cd é tóxico para a maioria das plantas em concentrações superiores a $5-10 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco, exceto para plantas hiper acumuladoras de Cd, as quais podem tolerar até mesmo concentrações de Cd de $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco (Gill e Tuteja, 2011).

A exposição dos seres humanos ao Cd ocorre geralmente por meio de duas fontes principais: 1) por via oral (por água e ingestão de alimentos contaminados) e 2) por inalação (Kabata-Pendias e Mukherjee, 2007). A ingestão de alimentos contaminados é cada vez mais preocupante pois os cereais e outros vegetais, normalmente, são responsáveis por cerca de 50-70% da ingestão de Cd, variando de acordo com a taxa de consumo, a qual, em crianças, está tipicamente na faixa de 2 a $25 \mu\text{g}$ por dia e, em adultos, de 10 a $50 \mu\text{g}$ por dia (Favano, 1998).

Os efeitos tóxicos do Cd sobre a saúde humana passaram a ganhar maior atenção após a década de 1970 devido à catástrofe ocorrida no Japão, onde as pessoas foram contaminadas pela ingestão de arroz e água contaminados com Cd. Esta doença, conhecida como “itai-itai” (“dói-dói”), causava dor intensa nos ossos, devido a sua desmineralização, provocada pela substituição do cálcio (Pan et al., 2010).

Vários efeitos nocivos têm sido atribuídos ao excesso de Cd no organismo tais como: lesões renais, esqueléticas e pulmonares (Favano, 1998), efeitos negativos sobre o fígado, vasos sanguíneos, sistemas reprodutivo, imunológico, nervoso, endócrino e cardiovascular, além disso vários tipos de câncer estão relacionados ao Cd como por exemplo câncer de pâncreas, pulmão, próstata (McLaughlin et al., 1999; Schwartz e Reis, 2000; Waisberg et al., 2003; Benbrahim-Tallaa et al., 2007).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio do Decreto nº 55.871, de 26 de Março de 1965, estabelece o valor de 1 mg.kg^{-1} , como a concentração máxima de Cd permitida em alimentos (ANVISA, 1965). Em 29 de Agosto de 2013, a ANVISA publicou a resolução nº 42, que dispõe sobre o regulamento Mercosul sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Nesta resolução, ficou estabelecido que em cereais e em produtos de/e a base de cereais, o limite máximo é de $0,10 \text{ mg.kg}^{-1}$. Neste caso, o limite máximo se aplica a: cereais não processados destinados ao consumo humano; cereais destinados ao consumo humano direto, sem casca, polido e/ou transformado quando corresponda e farelo quando destinado ao consumidor final (ANVISA, 2013).

Em 20 de Fevereiro de 2014, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) publicou a Decisão da Diretoria nº 045/2014/E/C/I, que dispõe sobre a aprovação dos valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo, e o valor estabelecido de intervenção agrícola para a presença de Cd no solo é de $3,6 \text{ mg.kg}^{-1}$.

A toxicidade do Cd, em plantas, causa o crescimento atrofiado, clorose, necrose, inibição da absorção de muitos elementos essenciais, inibição de certas atividades enzimáticas, diminuição do potencial hídrico, alterações na permeabilidade da membrana e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro de compartimentos

subcelulares (Mahmood et al., 2009, Nedjimi e Daoud, 2009, Beltagi et al., 2010, Gallego et al., 2012). As plantas, por sua vez, possuem um bem organizado sistema enzimático antioxidativo com a finalidade de lidar contra os danos induzidos pelas EROs.

2.1.2. Enzimas Antioxidantes

Os metais pesados, como o Cd, assim como outros agentes causadores de estresse abiótico, podem induzir a produção de EROs e causar estresse oxidativo. As EROs, além de seus efeitos deletérios, agem como moléculas sinalizadoras (Gratão et al., 2005, Opdenakker et al., 2012) ajustando o metabolismo celular às mudanças ambientais. Estes ajustes determinam a qualidade do material vegetal, influenciando a sobrevivência e promovendo várias adaptações nas plantas (Rozpadek et al., 2014)

Durante o processo de evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção contra as EROs, como as enzimas antioxidantes, incluindo: superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) e ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) (Gratão et al., 2005).

SOD é a primeira linha de defesa, a qual converte O_2^- em H_2O_2 . No entanto, H_2O_2 também é tóxico para as células e é então detoxificado por outras enzimas para formar H_2O e O_2 (Monteiro et al., 2011). As peroxidases decompõem o H_2O_2 pela oxidação de co-substratos tais como compostos fenólicos e/ou antioxidantes, enquanto a CAT decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio molecular, e a GR catalisa a redução, dependente de NADPH, da glutathione oxidada (GSSG) à glutathione reduzida (GSH).

A intensidade de resposta ao estresse por Cd é espécie específica. Em girassol, baixas concentrações de Cd acarretaram um aumento na atividade de enzimas antioxidantes, com exceção da SOD, que permaneceu inalterada mesmo em concentrações mais altas. (Gallego et al., 1999). Em folhas de ervilha a atividade de SOD foi significativamente aumentada (Darluzo et al., 1997). Em altas concentrações de Cd, a atividade de SOD aumentou em *Alyssum argenteum* e *Alyssum maritimum* (Gwozdz et al., 1997), *Pisum sativum* (Dixit et al., 2001), enquanto em *Lupinus luteus*, o aumento de sua atividade não foi observado (Gwozdz et al., 1997). De acordo com Liu et al. (2010), baixas concentrações de Cd (abaixo de 10 mg.kg^{-1}) estimula atividades de glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18), SOD, peroxidases e CAT em folhas de sorgo. Os autores sugeriram que baixas concentrações de Cd podem ser percebidas pelas plantas de sorgo como estresse oxidativo, o qual pode estimular o sistema antioxidante resultando no decréscimo de EROs e redução do dano oxidativo. Quando o estresse causado pelo Cd supera a capacidade das enzimas protetoras, suas atividades declinam rapidamente, simultaneamente com o dano celular (Soudek et al., 2014). De fato, para várias espécies estudadas, quando em concentrações muito baixas o Cd pode estimular crescimento assim como observado para outros elementos, o que é conhecido como efeito hormético (Gratão et al., 2008), mas ao elevar a concentração o efeito passa a ser negativo e deletério. Tal efeito também foi observado em cultura de células de cana-de-açúcar (Fornazier et al., 2002) e em cultura de células de café (Gomes-Junior et al. 2006), onde baixas concentrações de Cd estimularam o crescimento, enquanto as altas concentrações causaram uma redução do mesmo. Além disso, um aumento da massa seca do micélio de *Aspergillus nidulans* foi observado em baixas concentrações de Cd, enquanto que nas doses mais altas, a massa seca diminuiu drasticamente (Guelfi et al., 2003).

2.1.3. Proteínas de reserva

Os grãos de milho são constituídos principalmente de endosperma (aproximadamente 90%) e embrião (aproximadamente 10%). No endosperma, existem aproximadamente 10% de proteínas e destas, aproximadamente 70% são classificadas como proteínas de reserva (Flint-Garcia et al., 2009).

As proteínas de reserva em cereais são classificadas de acordo com sua solubilidade, sendo: as albuminas solúveis em água, as globulinas solúveis em solução salina, as prolaminas solúveis em álcool e as glutelinas solúveis em solução alcalina (Landry et al., 2000).

As albuminas e globulinas são formadas por uma série de proteínas com alto teor de lisina e se localizam principalmente no embrião e na periferia do grão. As albuminas representam de 3 a 5%, do conteúdo de proteína total, e as globulinas de 10 a 20%. As glutelinas possuem cerca de 5% de lisina, e representam uma fração importante com 35 a 45% do conteúdo total de proteína (Linko et al., 1989, Shewry e Tatham, 1990).

A fração prolamina, no milho denominada zeína, é encontrada em mais da metade das proteínas dos grãos maduros. Elas contêm altas concentrações de prolina e glutamina e baixas concentrações de lisina e triptofano, o que explica a carência de lisina em grãos de milho (Azevedo e Arruda, 2010).

Devido a estas características, com o intuito de se aumentar o valor nutricional dos cereais, uma das alternativas promissoras tem sido a manipulação destas proteínas, aumentando o acúmulo das frações que contêm alto teor de aminoácidos essenciais e/ou diminuindo o acúmulo das frações que contêm baixo teor destes aminoácidos (Azevedo et al., 2003).

2.1.4. Biossíntese e Degradação da lisina

Alesiani et al. (2016) através dos dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) projetam que o consumo mundial de cereais em 2016/17 aumentará chegando a 2.547 bilhões de toneladas. Embora exista cerca de uma dúzia de culturas de cereais, utilizadas para alimentação, somente o trigo, milho e arroz são importantes fontes de alimento para os humanos, contabilizando 94% de todo consumo de cereais (FAOSTAT, 2013). O milho contém cerca de 72% de amido, 10% de proteína e 4% de gordura, fornecendo uma densidade energética de 365 Kcal/100g (Nuss e Tanumihardjo, 2010), comparado com arroz e trigo, mas possui menor teor de proteínas.

As proteínas de origem vegetal fornecem grande parte das proteínas ingeridas, principalmente nos países subdesenvolvidos e em parte dos países em desenvolvimento, onde os cereais são a única fonte energética e proteica na dieta da maioria da população. Como citado anteriormente, o milho é um dos cereais mais consumidos e apresenta um teor de proteínas relativamente baixo. Além disso, seus grãos são carentes de aminoácidos essenciais, como a lisina, o que faz com que seu valor nutricional seja limitado.

Dos 20 aminoácidos normalmente incorporados em proteínas, somente 11 podem ser sintetizados pelos seres humanos e animais monogástricos (Azevedo et al., 1997). Os outros nove aminoácidos, chamados essenciais, têm que ser fornecidos através da dieta. As plantas e a maioria dos fungos e bactérias têm a capacidade de sintetizar todos os 20 aminoácidos desde que tenham uma fonte adequada de carbono e nitrogênio inorgânico. Quatro destes aminoácidos essenciais (lisina, treonina, metionina e isoleucina) são sintetizados através da via do ácido aspártico (Azevedo et al., 1997, 2006).

Desde a década de 60 até a década de 80, a via bioquímica do aspartato, que leva à síntese de lisina em plantas e bactérias, foi investigada extensivamente (Azevedo e Lea, 2001). Esta via se apresenta muito complexa,

frequentemente com o produto final (lisina, treonina, metionina e isoleucina) regulando as atividades das enzimas chave da via (Azevedo et al., 1997; 2006) (Figura 1).

A enzima que catalisa a primeira reação da via é a enzima aspartato kinase (AK, EC 2.7.2.4), a qual causa a fosforilação do aspartato para produzir β -aspartil fosfato (ASA). Pelo menos três isoenzimas distintas da AK podem ocorrer em plantas superiores. Duas destas isoformas podem ser inibidas pela lisina, a qual está envolvida na regulação global da via e pode ser sinergicamente inibida pela S-adenosilmetionina (SAM) (Rognes et al., 1980), normalmente responsável pela maior parte da atividade da AK (Lugli et al., 2002). A outra isoenzima é um polipeptídeo bifuncional com a homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) sensível a treonina (Azevedo et al., 1992).

A enzima aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11) converte o β aspartil-fosfato em aspartato semialdeído. Neste ponto, a via é dividida em dois ramos, um levando à síntese de lisina e o outro se subdivide em uma ramificação que leva à síntese de treonina e isoleucina, e a outra à síntese de metionina (Figura 1) (Azevedo et al., 1997).

Figura 1. Via metabólica do aspartato em plantas superiores. Adaptado de Azevedo et al. (2006). Principais enzimas da via em destaque onde: AK (aspartato kinase), DHDPS (dihidrodipicolinato sintase) e HSDH (homoserina desidrogenase)

A enzima HSDH catalisa a redução do aspartato-4-semialdeído em homoserina na presença das coenzimas NADH ou NADPH. A homoserina é fosforilada a O-fosfohomoserina pela ação da enzima homoserina kinase (HS, EC 2.7.1.39), a qual é então convertida a treonina pela enzima treonina sintase (TS, EC 4.2.99.2). A isoleucina é produzida a partir da treonina após cinco reações enzimáticas. A síntese do aminoácido metionina segue uma ramificação separada começando a partir da O-fosfohomoserina, seguindo três reações enzimáticas envolvendo as enzimas cistationa γ -sintase (EC 4.2.99.9), cistationa β -liase (EC 4.4.1.8) e metionina sintase (EC 2.1.1.13). A S-adenosilmetionina (SAM), a principal doadora de metil em plantas, é sintetizada a partir da metionina na reação catalisada pela enzima S-adenosilmetionina sintase (EC 2.5.1.6) (Azevedo et al., 1997).

O aminoácido lisina é produzido a partir do β -aspartil semialdeído em uma série de sete reações enzimáticas iniciadas pela enzima dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52). Seguindo de sua síntese, através da via do aspartato, a lisina ou é incorporada em proteína ou pode ser catabolizada em dois passos através da via da sacaropina (Figura 2). Esta via requer a enzima lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR, EC 1.5.1.8), a qual condensa a lisina e α -cetoglutarato em sacaropina, e a enzima sacaropina desidrogenase (SDH, EC 1.5.1.9), a qual hidroliza sacaropina em α -aminoadipato- δ -semialdeído e glutamato (Arruda et al., 2000). Essas duas enzimas têm sido apresentadas por serem

parte de um único polipeptídeo bifuncional, o qual é somente encontrado no endosperma e é regulado por vários mecanismos distintos (Gaziola et al., 1997, Arruda et al., 2000).

Figura 2. Via de degradação da lisina e metabólitos derivados desta rota (Varisi, 2007). Enzimas em destaque: LOR (lisina 2-oxoglutarato redutase) e SDH (sacaropina desidrogenase)

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Condução do experimento

Foram utilizadas sementes de milho (*Zea mays* L.) da linhagem (161) endosperma Normal, gentilmente cedidas pela EMBRAPA Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG. As sementes desta linhagem apresentam maiores concentrações de proteínas ricas em lisina.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, no Departamento de Genética/Esalq-USP, mantidas à temperatura ambiente de $25,3 \pm 7,3^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas. As sementes foram semeadas em vasos com capacidade de 20L, com uma planta por vaso (Figura 3), contendo uma mistura de solos com a seguinte proporção:

- em 50% da mistura foi utilizado um substrato resultante de esterqueira (mistura de restos de cultura de milho e soja, esterco bovino) e solo Nitossolo Vermelho Eutroférico latossólico, textura argilosa, a moderado.
- em 50% da mistura foi utilizado solo Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico típico, textura arenosa/média a moderado.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 15 plantas por tratamento com 3 repetições, 5 plantas por repetição. Os quatro tratamentos foram divididos pelo tempo de coleta sendo: 1) plantas controle coletadas aos 20 dias após a polinização (DAP), 2) plantas tratadas com Cd coletadas aos 20 DAP, 3) plantas controle coletadas aos 50 DAP e 4) plantas tratadas com Cd coletadas aos 50 DAP.

Aos 70 dias após o plantio (pré-florescimento), foi adicionado Cd na forma de CdCl_2 . Para tanto, foi preparada uma solução de CdCl_2 , na concentração de 30 mg.kg^{-1} de solo. Esta solução foi então adicionada aos vasos, sendo a irrigação feita manualmente, controlando-se afim de que não houvesse perda de solução e o controle fitossanitário realizado conforme necessário. Foi realizada a autopolinização controlada das plantas.

Figura 3. Plantas de milho da linhagem 161 cultivadas em casa de vegetação. Autopolinização

2.2.2. Quantificação de Cádmio

As amostras das raízes, colmo, folhas e grãos foram secadas e moídas, sendo posteriormente enviadas para o Departamento de Ciência do Solo/ESALQ para a análise do teor de Cd nestes órgãos através da espectroscopia de absorção atômica de chama.

2.2.3. Análise do solo

As amostras de solo foram secadas e posteriormente enviadas para o Departamento de Ciência do Solo/ESALQ para a análise de Cd disponível através do extrator Ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA).

2.2.4. Quantificação de proteínas

As folhas, coletadas aos 20 DAP, foram maceradas com nitrogênio líquido até formar uma farinha homogênea. Esse material foi utilizado para a extração de proteínas (realizada a 4°C). A farinha obtida das folhas (1 g) foi homogeneizada em 3 ml de tampão 100 mM fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 1 mM EDTA, 3 mM DTT e polivinilpirrolidona insolúvel (PVPP) 4% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, dividido em alíquotas e estocado em freezer a -80°C para análise das enzimas antioxidantes. A concentração de proteína foi determinada conforme descrito por Bradford (1976), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.2.5. Análise da peroxidação lipídica e quantificação de peróxido de hidrogênio

A análise da peroxidação lipídica foi baseada em Heath e Packer (1968), utilizando-se o biomarcador para avaliação de estresse, malondialdeído (MDA), que é um produto da peroxidação lipídica. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o produto detectado por espectrofotometria.

A peroxidação lipídica foi analisada em folhas e em grãos (20 DAP). Para tanto foram utilizados 200 mg dos respectivos materiais vegetais, que foram macerados em 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%, contendo aproximadamente 20% p/v de PVPP. Após a homogeneização realizou-se a centrifugação a 12000g por 10 minutos a 4°C. Foi adicionado 1 ml de TCA 20%, contendo 0,5% p/v de ácido tiobarbitúrico (TBA) em 250 µl do sobrenadante e a mistura foi mantida por 30 minutos a 95°C. Posteriormente a amostra sofreu um rápido resfriamento em gelo com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento e também para clarear a amostra. O sobrenadante foi centrifugado a 12000g por 10 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. As determinações das concentrações de MDA foram realizadas utilizando-se o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ e os resultados expressos em nmol.g⁻¹ de tecido fresco.

A quantificação de H₂O₂ foi baseada em Alexieva et al. (2001). Foram utilizados 200 mg de folhas que foram maceradas em 2 ml de TCA 0,1%, contendo aproximadamente 20% p/v de PVPP. Após a perfeita homogeneização realizou-se a centrifugação a 12000g por 10 minutos a 4°C. A mistura de reação consistiu em 200 µl do sobrenadante da amostra, 800 µl de 1M iodeto de potássio (KI) (preparado na hora do ensaio e protegido da luz) e 200 µl de 0,1 M tampão fosfato de potássio (pH 7,5). O branco do ensaio consistiu dos mesmos itens, exceto a amostra. A mistura de reação foi mantida em repouso no gelo por 1 hora (no escuro). Posteriormente a leitura em

espectrofotômetro foi realizada a 390 nm. A quantidade de H_2O_2 foi calculada usando-se uma curva padrão preparada anteriormente com concentrações conhecidas de H_2O_2 .

2.2.6. Análise das enzimas antioxidantes

2.2.6.1. Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

2.2.6.1.1. Atividade da enzima SOD em espectrofotômetro

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). A reação foi conduzida em uma câmara de reação (caixa), sob iluminação de lâmpada fluorescente a 25°C. A atividade foi determinada em uma solução de reação formada por 1765 µl de 50 mM tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 30 µl de 10 mM EDTA, 780 µl de 50 mM metionina, 225 µl de 1 mM NBT e 150 µl de 0,1 mM riboflavina. Ao mix desta solução foi adicionado 50 µl do extrato proteico, formando uma solução final de 3 ml. O tempo de reação é de 5 minutos em presença de luz. Para os brancos fez-se a mesma reação sem a amostra, sendo que um branco permanece no escuro e o branco do claro é colocado na caixa junto com as amostras. A leitura em espectrofotômetro foi realizada num comprimento de onda de 560 nm utilizando-se o branco do escuro para zerar o equipamento enquanto a leitura do branco da luz (formazana) foi feita juntamente com as amostras. Uma unidade de SOD é igual à concentração de SOD necessária para inibir 50% da fotoredução do NBT para formazana.

2.2.6.1.2. Atividade da enzima SOD em PAGE não-desnaturante

A atividade da SOD foi analisada em PAGE não-desnaturante (12%), a 4°C, utilizando como padrão 2 unidades de SOD de fígado bovino (Sigma) e 60 µg do extrato proteico. Após a separação das proteínas por eletroforese, com corrente constante de 20 mA/placa, a atividade da SOD foi determinada como descrito por Beuchamp e Fridovich (1971). Após a corrida, os géis foram enxaguados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro, à temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM NBT e TEMED 0,3%. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi descartada, os géis enxaguados com água destilada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas contra um fundo roxo.

2.2.6.1.3. Caracterização das isoenzimas de SOD

PAGE não-desnaturante (12%) foi utilizado para identificação das isoenzimas de SOD. Foram utilizados 400 µg de proteína total para caracterização. A eletroforese ocorreu nas mesmas condições anteriormente descritas para SOD. Após a corrida, o gel foi dividido verticalmente em três partes. Uma delas foi mantida em 100 mM Tampão fosfato de potássio, (pH 7,8). A segunda parte foi tratada com 100 ml do tampão fosfato de potássio contendo 1mM EDTA e 2 mM KCN e a última parte foi imersa em uma solução do referido tampão acrescido de 1 mM EDTA e 70 µl de H_2O_2 (30%). Todas estas etapas são realizadas no escuro para prevenir a foto-oxidação. Os géis permaneceram por 20 minutos nas soluções, e em seguida foram lavados ligeiramente com água destilada e submetidos à revelação com NBT e riboflavina como descrito anteriormente. Ao final da revelação, as bandas são analisadas quanto à presença e ausência, conforme o fator inibidor presente nas soluções de tratamento.

Estes pré-tratamentos com soluções de KCN e H₂O₂ permitem a caracterização das isoenzimas de SOD como: Mn-SOD (que é resistente a ambos inibidores), Fe-SOD (é resistente ao KCN e inibida pelo H₂O₂ e Cu/Zn-SOD (é inibida por ambos).

2.2.6.2. Atividade de Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

2.2.6.2.1. Atividade da enzima CAT em espectrofotômetro

A atividade de CAT foi determinada em espectrofotômetro como descrito por Azevedo et al. (1998) em uma solução de reação formada por 1 ml de 100 mM tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 2,5 µl de H₂O₂ (30%). A reação foi iniciada com a adição de 25 µl de extrato proteico, sendo realizada a leitura à temperatura de 25°C, e a atividade determinada através da decomposição do H₂O₂, através de alterações na absorbância a 240 nm, ao longo de 1 minuto. Os resultados são expressos em µmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, considerando 39,4 M como fator de extinção.

2.2.6.2.2. Atividade da enzima CAT em PAGE não-desnaturante

A eletroforese foi realizada a 4°C e com corrente constante 20 mA/placa. Para cada gel (12%) foram aplicadas 60 µg do extrato proteico e uma unidade de padrão de CAT de fígado de boi (Azevedo et al., 1998). Para a revelação foi realizada a lavagem do gel por 45 minutos em água destilada (3 x 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em solução de H₂O₂ 0,003% à temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água destilada e colocado por 10 minutos em uma solução de FeCl₃ 1% (p/v) e de K₂Fe(CN)₆ 1% (p/v) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel documentado.

2.2.6.3. Atividade de glutathiona redutase (GR, EC 1.6.4.2)

2.2.6.3.1. Atividade da enzima GR em espectrofotômetro

A atividade foi analisada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 ml de 100 mM tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 0,5 ml de 1 mM 5,5'-dithio-bis (2-ácido nitrobenzóico – DNTB), 100 µl de 1 mM glutathiona oxidada (GSSG) e 100 µl de 0,1 mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 50 µl do extrato proteico e monitorada por 1 minuto através da redução da glutathiona oxidada na absorbância de 412 nm (Smith et al., 1988).

2.2.6.3.2. Atividade da enzima GR em PAGE não-desnaturante

A atividade de GR em PAGE (12%) foi realizada utilizando-se 60 µg do extrato proteico. Para a revelação do gel, após a separação das proteínas, lavou-se o gel 2x com água destilada por 15 minutos e incubou-se por 30 minutos, à temperatura ambiente, em uma solução de 0,25 M TRIS (pH 7,5), 10 mg de (3-(4,5-Dimetiltiazol 2-yl)-2,5-difeniltetrazol, MTT), 10 mg de dicloroindolacético (DPIP), 2,4 mM GSSG e 0,5 mM NADPH, para um volume final de solução de 50 ml. Depois de descartar esta solução, o gel foi lavado rapidamente em água destilada e feita a fixação em solução de ácido acético 7%. Foi utilizado como padrão uma unidade de GR de fígado bovino (Sigma Aldrich). (Lee e Lee, 2000).

2.2.6.4. Atividade de Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

2.2.6.4.1. Atividade da enzima APX em espectrofotômetro

O ensaio para atividade de APX foi realizado de acordo com Cakmak e Horst (1991). Foi utilizada uma solução de 650 µl de 80 mM Tampão Fosfato de Potássio (pH 7,0), 100 µl de 5 mM Ascorbato, 100 µl de 1 mM EDTA, 100 µl de 1 mM H₂O₂ e 50 µl do extrato proteico. A leitura foi feita em um comprimento de onda de 290 nm, por 1 minuto. A atividade específica de APX é expressa em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína, considerando 2,8 mM⁻¹ como coeficiente de extinção.

2.2.6.4.2. Atividade da enzima APX em PAGE não-desnaturante

A atividade de APX em PAGE foi determinada de acordo com Mittler e Zilinskas (1993) e Erdal (2012). Antes das amostras serem aplicadas no gel (12%), foi adicionado 2 mM de Ácido ascórbico ao tampão de corrida e realizada uma pré-corrida por 30 minutos. As amostras foram então aplicadas (60 µg do extrato proteico por canaleta) e deixou-se correr por aproximadamente 6 horas a 4°C e à corrente constante (20 mA/placa). Após a corrida, o gel foi equilibrado em 50 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e 2 mM Ácido ascórbico por duas vezes de 15 minutos. Em seguida, o gel foi incubado por 20 minutos em 50 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 4 mM Ácido ascórbico e 2 mM H₂O₂. O gel foi lavado com 50 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,0) por 1 minuto e em seguida incubado por 10 minutos em 50 mM tampão fosfato de sódio (pH 7,8), 22 mM TEMED, e 0,1 mM NBT, sob agitação por 10 minutos até aparecerem as bandas.

2.2.6.5. Atividade de Guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7)

2.2.6.5.1. Atividade da enzima GPX em espectrofotômetro

Para a atividade de GPX foi preparado um ensaio contendo 390 µl de Tampão Fosfato-Citrato (0,2 M Fosfato dissódico dibásico + 0,1 M Ácido cítrico) (pH 5,0), 10 µl do extrato proteico e 25 µl de guaiacol 0,5%. À esta solução, foi adicionado 25 µl de H₂O₂ 3% e então deixou-se em banho-maria a 30°C por 15 minutos. Após este tempo, colocou-se as cubetas em gelo, adicionou-se 50 µl de metabissulfito de sódio 2% e misturou-se em vortex. Após 10 minutos foi feita a leitura a 450 nm. A atividade de GPX foi expressa em µmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína (Matsuno e Uritani, 1972).

2.2.6.5.2. Atividade da enzima GPX em PAGE não-desnaturante

A atividade de GPX em PAGE foi conduzida nas mesmas condições como descrito para CAT.

Foram aplicadas ao gel 60 µg de extrato proteico por canaleta. Após 4 horas de corrida da eletroforese o gel foi lavado em água destilada e incubado à temperatura ambiente em uma solução contendo 100 ml de 50 mM Tampão Fosfato (pH 6,0), 250 µl de 2,58 mM guaiacol e 50 µl de 10 mM H₂O₂. Após o aparecimento das bandas, a solução foi retirada e o gel colocado em água destilada e documentado.

2.2.7. Proteínas de Reserva

2.2.7.1. Extração das Proteínas de Reserva

Para extração das proteínas de reserva foi utilizado o método de Landry et al. (2000), com algumas modificações. Primeiro, os grãos maduros foram moídos e a farinha seca (100 mg) foi submetida ao tratamento com hexano à temperatura ambiente por 15 minutos com leves agitações. Após este período, o material foi centrifugado (5 minutos, 11000g), o sobrenadante descartado e o pellet deixado para secar overnight.

Para a extração das globulinas, à farinha seca (100 mg) foi adicionado 625 µl de uma solução de 0,5 M NaCl, por 30 minutos, a 4°C, esta etapa foi repetida duas vezes. Os sobrenadantes obtidos após centrifugação foram misturados e armazenados para posterior análise. Em seguida, a fração albumina foi extraída submetendo o pellet à uma nova extração com 625 µl de água Milli-Q por 15 minutos a 4°C, duas vezes, sendo que o sobrenadante obtido após a primeira centrifugação foi armazenado e o sobrenadante da segunda centrifugação descartado. A glutelina foi obtida pela extração do pellet anterior com 625 µl de solução SDS 0,1% (p/v) (pH 10), contendo 2-mercaptoetanol 0,6% por 30 minutos à temperatura ambiente, repetindo-se duas vezes. Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação foram armazenados a -80°C para análise posterior.

As prolaminas foram obtidas em duas frações I e II. As prolaminas I foram extraídas ressuspensando-se a farinha seca (50 mg) em 1 ml de solução 2-propanol 55% (v/v) e 2-mercaptoetanol 0,6% (v/v), por 30 minutos, à temperatura ambiente, etapa a qual foi repetida duas vezes e os sobrenadantes obtidos após a centrifugação misturados e armazenados à -80°C. As prolaminas II foram obtidas pela extração do pellet obtido anteriormente com 1 ml de solução 0,5 M NaCl (pH 10) contendo 2-mercaptoetanol 0,6% (v/v) à temperatura ambiente por 30 minutos, repetindo-se mais uma vez este procedimento. Após este período, o extrato foi centrifugado e os sobrenadantes obtidos foram armazenados à -80°C para análises posteriores.

2.2.7.2. SDS-PAGE

O procedimento de preparação e corrida dos géis (10%) foi como descrito por Laemmli (1970). Após a extração das proteínas, amostras com 30 µg de proteína, de cada fração, foram aplicadas aos géis de SDS. Após a corrida, os géis foram corados com Comassie Blue e posteriormente registrados.

2.2.8. Aminoácidos Solúveis Totais em Grãos

Foram utilizados 150 mg de farinha em 1,5 ml de MCW (metanol:clorofórmio:água, na proporção 12:5:3). A mistura foi deixada overnight a 4°C. Centrifugou-se a 10000g por 20 minutos e retirou-se o sobrenadante ao qual foi adicionado 1 ml de clorofórmio e 1,5 ml de água para cada 4 ml de MCW. Centrifugou-se novamente retirando-se cuidadosamente a fase aquosa formada, a qual foi colocada por 1 hora a 38°C.

A concentração de aminoácidos solúveis totais foi determinada segundo o método descrito por Yemm e Cocking (1955). A reação para a quantificação foi realizada em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 1 ml da amostra, previamente diluída em água destilada (100 µl amostra + 900 µl água), 0,5 ml de 0,2 M Tampão citrato de sódio (pH 5,0), 0,2 ml de reativo de ninidrina 5% em metilglicol e 1 ml de 0,2 mM KCN. Os tubos de ensaio foram tampados com bolas de vidro, para evitar perdas por evaporação e deixados em banho-maria a 100°C por 20 minutos.

Após este período, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e adicionou-se 1,3 ml de etanol 60% em um volume final de 4 ml.

As concentrações de aminoácidos solúveis totais foram determinadas utilizando-se uma curva padrão de concentrações conhecidas de leucina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm.

2.2.9. Enzimas do metabolismo da lisina

2.2.9.1. Extração e purificação parcial das enzimas AK, HSDH e DHDPS

As sementes foram coletadas durante o desenvolvimento (imaturas, 20 DAP) e armazenadas em nitrogênio líquido a -80°C até a extração para todas as enzimas. Para a extração das enzimas AK, HSDH e DHDPS todos os procedimentos foram conduzidos a 4°C . As enzimas AK e HSDH foram extraídas em tampão 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 200 mM cloreto de potássio (KCl), 0,1 mM PMSF, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mM L-lisina, 2 mM L-treonina, 10% de glicerol (v/v) e PVPP 5% (p/v). Após maceração, o extrato foi filtrado e centrifugado a 12000g por 30 minutos para remover restos celulares. Ao extrato foi adicionado sulfato de amônio para saturação a 30% e, a seguir, o extrato foi colocado sob agitação por 30 minutos. Após agitação a amostra foi centrifugada a 12000g por 30 minutos e o sobrenadante submetido a uma segunda saturação com sulfato de amônio a 60%. A amostra foi precipitada por centrifugação a 12000g por 30 minutos e o pellet dissolvido em 25 mM Tampão Tris-HCl (pH 7,4) contendo 1 mM DTT, 0,1 mM L-lisina, 0,1 mM L-treonina e de 10% de glicerol (v/v). A amostra foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 e equilibrada com o mesmo tampão e coletada para análise da atividade da AK e HSDH.

A enzima DHDPS foi extraída em 100 mM Tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 1 mM PMSF, 2 mM EDTA, de Ácido ascórbico 1.4% (p/v) e PVPP 5% (p/v). Após a maceração, o extrato foi filtrado e centrifugado a 12000g por 30 minutos para remover restos celulares. Ao extrato foi adicionado sulfato de amônio para saturação a 30% e o extrato foi colocado sob agitação por 30 minutos. Após agitação, a amostra foi centrifugada a 12000g por 30 minutos e o sobrenadante submetido a uma segunda saturação com sulfato de amônio a 60%. A amostra foi precipitada por centrifugação a 12000g e o pellet dissolvido em 100 mM Tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 2 mM EDTA e Ácido ascórbico 1,4 % (p/v). A amostra foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 equilibrada com o mesmo tampão e coletada para análise da atividade da DHDPS.

2.2.9.1.1. Determinação da atividade da enzima AK

O ensaio da atividade da AK foi realizado como descrito por Azevedo et al. (2003), em 100 mM Tampão Tris-HCl (7,4) contendo 1mM DTT, 20% de glicerol (v/v); 500 mM ácido aspártico, 125 mM sulfato de magnésio, 200 mM adenosina trifosfato (ATP), 4 M hidroxilamina e amostra. O ensaio foi iniciado pela adição de ATP e incubado a 35°C por 30 minutos. Após incubação, o ensaio foi interrompido pela adição de solução de cloreto férrico (670 mM FeCl_3 e 20% de TCA). Após centrifugação a 12000g por 10 minutos, a absorbância foi determinada a 505 nm. Ensaios contendo 5 mM L-lisina, L-treonina e L-lisina + L-treonina foram incluídos para determinar a atividade da AK e para identificar as isoenzimas sensíveis a inibição por lisina e treonina. A atividade da AK foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

2.2.9.1.2. Determinação da atividade da enzima HSDH

A atividade da enzima HSDH foi determinada em espectrofotômetro a 340 nm como descrito previamente por Azevedo et al. (2003), em 100 mM Tampão Tris-HCl (pH 9,0) contendo 150 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 200 mM DL-homoserina, 4,8 mM NADPH e amostra. A atividade da HSDH foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

2.2.9.1.3. Determinação da atividade da enzima DHDPS

A atividade da enzima DHDPS foi determinada como descrito por Varisi et al.(2007). O ensaio continha 100 mM Tampão Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM piruvato, 10 mM ASA (aspartato semialdeído, neutralizado com NaOH antes do uso) e amostra. O ensaio foi incubado a 35°C por 1 hora. Após incubação, o ensaio foi interrompido pela adição de tampão de parada (0,22 M ácido cítrico, 0,55 M fosfato de sódio e 0,25 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de o-aminobenzaldeído) e incubado novamente a 35°C por 1 hora para permitir a coloração. Após centrifugação a 12000g por 10 minutos, a absorbância foi determinada a 520 nm. A atividade específica da enzima foi determinada em $\text{unidades} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína), sendo uma unidade definida como o aumento da absorbância de 0,001. min^{-1} .

2.2.9.1.3.1. Síntese do aspartato semialdeído (substrato da DHDPS)

O aspartato semialdeído (ASA) foi obtido pela ozonólise da DL-alilglicina. Para a síntese do ASA, 2,3 g (20 mM) de DL-alilglicina foram dissolvidos em 20 ml de HCl 1M e submetido ao processo de ozonólise, sendo a solução mantida em banho de gelo a 0°C durante 120 minutos até a conversão completa da DL-alilglicina à aspartato semialdeído (Black e Wright, 1955). A solução contendo ASA foi subdivida em frações contendo 1 ml e mantidas congeladas em meio ácido para manter sua estabilidade, sendo neutralizada pela adição de KOH, somente durante a condução dos ensaios.

2.2.9.2. Extração e purificação parcial das enzimas LOR e SDH

As sementes foram coletadas durante o desenvolvimento (imaturas, 20 DAP) e armazenados em nitrogênio líquido a -80°C até a extração. Foi realizada uma única extração para as duas enzimas sendo o procedimento conduzido a 4°C. Os grãos foram macerados em tampão de extração específico para cada enzima. Os extratos celulares foram homogeneizados na proporção de 1g:2 ml de tampão de extração, contendo 100 mM fosfato de potássio (pH 7.0), 50mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT e 10% de glicerol (v/v), 0,1 mM PMSF e PVPP 5% (p/v). Os homogeneizados foram filtrados em gaze e centrifugados por 30 minutos a 12000g. Os extratos brutos foram submetidos à precipitação com sulfato de amônio e centrifugados novamente.

Os pellets obtidos da extração das enzimas e purificados parcialmente foram ressuspensos no tampão de extração. Os extratos foram dessalinizados em coluna Sephadex G25 equilibrada com tampão 100 mM Tris-HCl para posteriormente serem utilizadas nos ensaios enzimáticos de acordo com Gaziola et al. (1999).

2.2.9.2.1. Determinação da atividade da enzima LOR

Os ensaios para atividade de LOR foram feitos mediante incubação, por 15 minutos a 30°C, de uma mistura contendo 100 mM Tampão Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM Ácido α -cetoglutárico neutralizado com KOH, 20 mM lisina, 0,14 mM NADPH e a preparação da enzima num volume final de 0,9 ml. Nos controles foi medida a atividade residual ocorrida pela oxidação inespecífica da NADPH sem adição do substrato lisina (branco).

A atividade da LOR foi verificada pela queda da absorbância em 340 nm por um período de 15 minutos. Para o cálculo da atividade utilizou-se a diferença entre a absorbância no tempo zero, e em 15 minutos, descontando-se os brancos. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para a oxidação de 1nmol de NADPH.min⁻¹ a 30°C.

2.2.9.2.2. Determinação da atividade da enzima SDH

Os ensaios para atividade da SDH foram feitos como descrito para LOR, num volume final de 0,9 ml, contendo 100 mM Tampão Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM NAD, 2 mM sacaropina e a preparação da enzima. No ensaio controle foi medida a atividade residual ocorrida pela redução inespecífica do NAD sem adição do substrato sacaropina (branco).

A atividade da SDH foi verificada pelo aumento da absorbância em 340 nm. Para o cálculo da atividade utilizou-se a diferença entre a absorbância no tempo zero, e em 15 minutos, descontando-se os brancos. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para a redução de 1nmol de NAD.min⁻¹ a 30°C. A atividade específica das enzimas foram descritas em nmol de NADPH ou NAD oxidado.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

2.2.10. Separação e quantificação de aminoácidos solúveis pela cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)

Os aminoácidos solúveis foram extraídos segundo o método de Bielecki e Turner, (1966), com três repetições. Foi utilizado 150 mg de farinha fina de material biológico com 3 repetições, em 1,5 ml de MCW (metanol: clorofórmio: água, na proporção 12:5:3). A mistura ficou overnight em geladeira e depois centrifugada a 10000g durante 20 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 0,375 ml de clorofórmio e 0,562 ml de água destilada e em seguida a amostra foi centrifugada novamente e a fase aquosa formada foi retirada cuidadosamente. A fase coletada foi colocada em banho-maria por 1 hora a 38°C e em seguida em Concentrador Vacufuge Eppendorf para completa concentração das amostras. As amostras foram ressuspensas em 100 μ l de água Milli-Q, filtradas em Millex, 0,22 μ m para posterior dosagem de aminoácidos solúveis totais através de UPLC. A análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) foi realizada com o sistema Acquity HClass (Waters), coluna BEH C18 (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 μ m). Para a derivatização foram aplicados em vials 70 μ l de tampão borato, 10 μ L da amostra contendo os aminoácidos ou do padrão em concentrações conhecidas (25, 50, 75 e 100 pmol. μ l⁻¹) e 20 μ l do derivatizante (AccQ – Tag Ultra Derivatization Kit - Waters). O branco consistiu de 80 μ l de tampão borato e 20 μ l do derivatizante. A mistura foi agitada imediatamente em vortex por alguns segundos e deixada repousar por 1 minutos à temperatura ambiente. Em seguida os vials foram colocados em banho a 55°C por 10 minutos. O volume da injeção foi de 1 μ l e a detecção foi através de comprimento de onda de 260 nm. O gradiente foi alterado na proporção do Eluent A - AccQ-Tag, (Waters) (A), 10% Eluent B AccQ-Tag, (Waters) (B), Água Milli-Q (C) e 100% Eluent B AccQ-Tag (D) no fluxo de 0,7 ml.min⁻¹, temperatura da coluna de 43°C e o tempo de corrida de 10 minutos e 20 segundos. As concentrações de aminoácidos

nas amostras foram determinadas em relação à curva padrão de concentrações conhecidas dos aminoácidos histidina, serina, arginina, glicina, aspartato, glutamato, treonina, alanina, prolina, lisina, tirosina, metionina, valina, isoleucina, leucina e fenilalanina.

2.3. Resultados

2.3.1. Quantificação de cádmio

Aos 20 DAP o material vegetal foi coletado e submetido à quantificação de Cd. A tabela 1 apresenta os dados do teor médio de Cd presente nos diferentes órgãos. Como podemos ver e, como já era esperado, a maior concentração do metal foi encontrada nas raízes, mas havendo um pequeno acúmulo nos grãos coletados aos 20 DAP (0,56% em relação ao total) e nos grãos maduros (0,15% em relação ao total).

Tabela 1. Quantificação de cádmio nos órgãos vegetais (mg.kg⁻¹)

Tratamentos	Grão (mg.kg ⁻¹)	Folha (mg.kg ⁻¹)	Colmo (mg.kg ⁻¹)	Raiz (mg.kg ⁻¹)
Controle 20 DAP	-	-	-	0,2±0,06
Controle 50 DAP	-	0,14±0,02	-	0,37±0,07
Cádmio 20 DAP	0,24±0,03	0,18±0,02	0,68±0,35	41,31±8,28
Cádmio 50 DAP	0,06±0,03	0,32±0,08	0,7±0,22	39,63±14,76

(-) valores não detectáveis;

Valores apresentados pelas respectivas médias±desvio padrão

2.3.2. Quantificação de cádmio no solo

A tabela 2 apresenta os dados da quantificação de Cd disponível no solo no momento das respectivas coletas (20 DAP e 50 DAP). Podemos notar que no solo coletado aos 20 DAP o teor de Cd disponível foi superior àquele encontrado no solo coletado aos 50 DAP.

Tabela 2. Quantificação de cádmio disponível no solo

	Cd (mg.kg ⁻¹)
Controle 20 DAP	<0,1
Controle 50 DAP	<0,1
Cádmio 20 DAP	250,93±97,21
Cádmio 50 DAP	112,00±8,86

2.3.3. Análise da peroxidação lipídica e quantificação de peróxido de hidrogênio

Com o objetivo de se avaliar o estresse oxidativo, causado pelo Cd, foram realizadas as análises da peroxidação lipídica e a quantificação de H_2O_2 em folhas coletadas aos 20 DAP.

A Figura 4 mostra os resultados obtidos para MDA e H_2O_2 . Podemos notar que apesar do ligeiro aumento de H_2O_2 (não significativo) nas plantas contaminadas pelo Cd, a peroxidação lipídica não foi superior neste tratamento, apresentando nível semelhante ao do controle.

Figura 4. Quantificação de MDA e H_2O_2 em folhas de milho coletadas aos 20 DAP. Os gráficos apresentam os dados médios de ambos tratamentos (N=3) com suas respectivas barras de erro. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste t, considerando-se o nível de significância em $P < 0,05$

2.3.4. Enzimas antioxidantes

A Figura 5 apresenta os dados da enzima SOD. Os dados mostraram que não houve uma diferença significativa na atividade da enzima bem como no perfil proteico das isoenzimas de SOD, entre as plantas contaminadas e as plantas controle. Além disso, pode-se ver na Figura 5c que o gel de caracterização das isoenzimas da SOD mostra que as isoenzimas I e II são Mn-SOD pois foram resistentes aos inibidores, e as isoenzimas III e IV são Cu/Zn-SOD, uma vez que foram inibidas por ambos inibidores. Ao comparar-se a localização das bandas em relação ao padrão (Figuras 5b e 5c), pode-se dizer que provavelmente a isoenzima V (Figura 5b) já havia saído do gel (Figura 5c), o que impossibilitou sua caracterização.

Figura 5. Atividade de superóxido dismutase (SOD). Em (a) atividade total de SOD, em (b) atividade de SOD em PAGE não-desnaturante para 3 amostras distintas do controle e com Cd, apresentando 5 isoenzimas diferentes, e em (c) a caracterização das isoenzimas de SOD pela ação dos inibidores KCN e H₂O₂. O gráfico apresenta os dados médios de ambos tratamentos (N=3) com suas respectivas barras de erro. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste t, considerando-se o nível de significância em $P < 0,05$

Os resultados da enzima CAT estão apresentados na Figura 6. Da mesma maneira como visto para SOD, os resultados não diferiram significativamente entre as plantas contaminadas e as plantas controle.

Figura 6. Atividade de catalase (CAT). Em (a) atividade total de CAT e em (b) atividade de CAT em PAGE não-desnaturante para 3 amostras distintas do controle e com Cd, apresentando apenas uma isoenzima. O gráfico apresenta os dados médios de ambos tratamentos (N=3) com suas respectivas barras de erro. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste t, considerando-se o nível de significância em $P < 0,05$

Podemos observar o mesmo para a enzima GR, ou seja, os dados não apresentaram diferença significativa entre as plantas contaminadas e as plantas controle, seja para a atividade total (Figura 7a), seja para variações específicas para diferentes isoenzimas de GR observadas (Figura 7b).

Figura 7. Atividade de glutatona redutase (GR.) Em (a) atividade total de GR e em (b) atividade de GR em PAGE não-desnaturante para 3 amostras distintas do controle e com Cd, apresentando o mesmo padrão de isoenzimas, com 7 isoenzimas. O gráfico apresenta os dados médios de ambos tratamentos (N=3) com suas respectivas barras de erro. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste t, considerando-se o nível de significância em $P < 0,05$

Os resultados das duas outras peroxidases analisadas (APX e GPX) também mostraram a mesma resposta, com a atividade das enzimas e seu perfil de isoenzimas não apresentando diferenças significativas entre as plantas contaminadas e as plantas controle (Figura 8). Entretanto, no caso das isoenzimas de GPX, as bandas IV e V mostram uma clara redução de atividade (intensidade) no Cd em relação ao controle (Figura 8d).

Figura 8. (a) atividade total de ascorbato peroxidase (APX); (b) atividade da APX em PAGE não-desnaturante para 3 amostras distintas do controle e com Cd, apresentando 2 isoenzimas. (c) atividade total de guaiaacol peroxidase (GPX) e (d) atividade da GPX em PAGE não-desnaturante para 3 amostras distintas do controle e com Cd, apresentando 5 isoenzimas. Os gráficos apresentam os dados médios de ambos tratamentos (N=3) com suas respectivas barras de erro. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste t, considerando-se o nível de significância em $P < 0,05$

2.3.5. Proteínas de reserva do grão

2.3.5.1. Quantificação das proteínas de reserva

A tabela 3 apresenta os dados médios da quantificação das proteínas de reserva dos grãos. Os resultados mostraram uma variação clara, apesar de não significativa, no sentido de aumento da porcentagem relativa da fração glutelina no tratamento com Cd e redução das outras frações em comparação ao controle.

Tabela 3. Quantificação das proteínas de reserva dos grãos (mg.ml⁻¹) e porcentagem relativa das frações protéicas

	Albumina		Globulina		Glutelina		Prolamina	
	mg.ml ⁻¹	%	mg.ml ⁻¹	%	mg.ml ⁻¹	%	mg.ml ⁻¹	%
Controle	1,27±0,04	18,0	1,44±0,19	20,3	3,01±0,32	42,4	1,37±0,17	19,3
Cádmio	1,24±0,04	16,5	1,38±0,22	18,4	3,47±0,30	46,4	1,39±0,05	18,6

Resultados apresentados pelas respectivas médias±desvio padrão

Análise estatística foi feita pelo teste t, considerando-se o nível de significância em $P<0,05$

2.3.5.2. SDS-PAGE proteínas de reserva

A Figura 9 apresenta os géis obtidos para as diferentes frações proteicas. A análise das diferentes frações não revelou alterações mais importantes ou significativas que pudessem ser atribuídas ao Cd.

Figura 9. SDS-PAGE para as proteínas de reserva (Albumina, Glutelina, Globulina, Prolamina I e II) dos grãos coletados aos 50 DAP. Foram aplicadas no gel 3 amostras distintas de cada tratamento

2.3.6. Grãos coletados com 20 DAP

Quando foram coletados os diversos órgãos para realização das análises, foi visto que a quantidade de grãos para análise das enzimas do metabolismo de lisina seria insuficiente (Figura 10). Desta maneira, não foi possível separar as análises por tratamentos independentes, como fora planejado. Assim, mostrou-se necessário fazer um “pool” de grãos para que as análises pudessem ser realizadas, de modo que o material ficou dividido em: grãos obtidos de plantas contaminadas e grãos obtidos de plantas não contaminadas. Desta maneira, as análises foram feitas com uma amostra composta de cada tratamento e a análise estatística, para as enzimas do metabolismo da lisina (AK, HSDH, DHDPS, LOR e SDH), foi realizada comparando-se as médias de ambos tratamentos (teste t, $P < 0,05$).

Figura 10. Espigas de milho coletadas aos 20 DAP, apresentando poucos ou nenhum grão

2.3.6.1. Peroxidação lipídica

A avaliação do estresse nos grãos 20 DAP, através da quantificação de MDA (Figura 11), mostrou que não houve diferença significativa entre os grãos que vieram das plantas não contaminadas e das contaminadas.

Figura 11. Quantificação de MDA em grãos de milho imaturos. Para a análise estatística foi realizado o teste t, considerando-se o nível de significância em $P < 0,05$

2.3.7. Aminoácidos totais (grãos 50 DAP)

A Figura 12 mostra o resultado da análise da quantificação de aminoácidos solúveis totais presentes nos grãos de milho maduros. Pode-se observar que a quantidade de aminoácidos solúveis totais, apesar de mostrar uma discreta diminuição nos grãos contaminados com Cd, não foi significativa.

Figura 12. Aminoácidos solúveis totais em grãos de milho coletados aos 50 DAP. Para a análise estatística foi realizado o teste t, considerando-se o nível de significância em $P < 0,05$

2.3.8. Enzimas envolvidas na síntese da lisina

2.3.8.1. Determinação da atividade específica da AK

Os resultados dos ensaios dos tratamentos com os aminoácidos treonina, lisina e treonina+lisina (na concentração de 5 mM) demonstraram que estes aminoácidos causaram a inibição da atividade da AK, mostrando a presença de isoformas de AK sensíveis a cada um destes aminoácidos nos materiais analisados. O padrão de inibição encontrado demonstra que a lisina provocou maior inibição da atividade total da AK (Tabela 4), indicando a predominância da isoforma sensível à lisina. No tratamento com Cd, a inibição da atividade da enzima, pela lisina, foi bem superior ao apresentado no controle. A inibição causada pela presença dos dois aminoácidos juntos (lisina+treonina) causou um efeito sinérgico, sendo também superior no tratamento com Cd.

Tabela 4. Inibição da atividade da AK pelos aminoácidos lisina, treonina e lisina+treonina na concentração de 5 mM. Porcentagem relativa ao controle do ensaio.

AK	Treonina	Lisina	Treonina+Lisina
Controle	29,92%	34,79%	60,34%
Cádmio	23,88%	55,97%	82,08%

A atividade específica da AK observada mostrou variações interessantes pois não só a atividade no tratamento com Cd foi maior que no controle sem Cd (porém não significativa), como a inibição pela lisina foi também maior na presença de Cd (Figura 13).

Figura 13. Atividade específica da AK em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína. C (controle); T (treonina); L (lisina) e L+T (lisina+treonina)

2.3.8.2. Determinação da atividade específica da HSDH

A atividade da HSDH foi detectada em níveis semelhantes entre os tratamentos (Figura 14). Da mesma forma, foi observada a inibição causada pelo aminoácido treonina, na concentração de 5 mM, sendo menor na presença de Cd (Tabela 5). Estes resultados indicam a presença de uma isoforma sensível à inibição por treonina que no entanto não apresentou padrão distinto de resposta pela presença do metal.

Figura 14. Atividade específica da HSDH em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína. C (controle) e T (treonina).

Tabela 5. Inibição da atividade da HSDH pelo aminoácido treonina na concentração de 5 mM. Porcentagem relativa ao controle do ensaio.

HSDH	Treonina
Controle	36,50%
Cádmio	33,26%

2.3.8.3. Determinação da atividade específica da DHDPS

A Figura 15 apresenta os resultados da atividade específica da DHDPS, que mostra um padrão similar de atividade entre os tratamentos testados, com e sem Cd, e para os agentes inibidores utilizados, indicando que tanto lisina como aminoetilcisteína (AEC), um análogo de lisina, promovem uma forte inibição da atividade da DHDPS (Tabela 6).

Figura 15. Atividade específica da DHDPS em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína. L (lisina) e AEC (S-aminoetilcisteína)

Tabela 6. Inibição da atividade da DHDPS pelo aminoácido lisina na concentração de 5 mM. Porcentagem relativa ao controle do ensaio.

DHDPS	Lisina	AEC
Controle	81,61%	76,25%
Cádmio	78,80%	74,05%

2.3.9. Enzimas envolvidas na degradação da lisina

2.3.9.1. Determinação das atividades específicas da LOR e da SDH

A atividade específica da LOR foi significativamente menor no tratamento com Cd (Figura 16a), porém no caso da enzima SDH os valores foram praticamente idênticos com ou sem o metal (Figura 16b).

Figura 16. (a) Atividade específica da LOR em nmol NADPH.min⁻¹.mg⁻¹ proteína. Onde a diferença da atividade foi significativa entre os tratamentos (*) ($P < 0,05$), (b) Atividade específica da SDH em nmol NAD.min⁻¹.mg⁻¹ proteína

2.3.10. Separação e quantificação de aminoácidos livres por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)

A figura 17 mostra os resultados da quantificação dos aminoácidos presentes nas amostras (em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de proteína). Como pode-se notar, todos os aminoácidos, com exceção da prolina, apresentam quantidades semelhantes em ambos tratamentos. A prolina mostrou-se presente em maiores quantidades nos tratamentos com Cd. A porcentagem relativa média dos aminoácidos dentre os tratamentos está apresentada na tabela 7. Além disso, chamamos atenção para a figura 18, que apresenta um aspecto geral dessa porcentagem relativa, no que diz respeito aos aminoácidos da via do aspartato, que é foco deste estudo. Apesar de não ser uma diferença significativa, no controle, a porcentagem relativa média de aspartato foi relativamente maior do que no tratamento com Cd. Podemos notar ainda que, todos os aminoácidos da via, tiveram uma menor porcentagem relativa no tratamento com Cd comparado ao controle. Por outro lado, a prolina, como já foi mencionado, apresentou um significativo acréscimo no tratamento com Cd.

Levando-se em conta os outros aminoácidos analisados, excluindo-se os participantes da via do aspartato, podemos observar através da tabela 7 que os aminoácidos histidina e arginina, apesar de não significativa, tiveram uma porcentagem relativa maior no tratamento com Cd. Enquanto isso, todos os outros (serina, glicina, alanina, tirosina, valina, leucina e fenilalanina) apresentaram teores menores no tratamento com Cd, ou seja, todos os aminoácidos essenciais, com exceção da histidina, tiveram porcentagens relativas menores no tratamento com Cd.

Figura 17. Quantificação dos aminoácidos solúveis em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína. Onde: HIS (histidina), SER (serina), ARG (arginina), GLY (glicina), ASP (aspartato), GLU (glutamato), THR (treonina), ALA (alanina), PRO (prolina), TYR (tirosina), MET (metionina), VAL (valina), ILE (isoleucina), LEU (leucina), PHE (fenilalanina). (*) A diferença entre os tratamentos foi significativa. Para a análise estatística foi realizado o teste t, considerando-se o nível de significância em $P < 0,05$

Tabela 7. Porcentagem relativa dos aminoácidos (mg.g⁻¹ proteína)

Aminoácidos	Controle (% mg.g ⁻¹ proteína)	Cádmio (% mg.g ⁻¹ proteína)
HIS	0,87	1,11
SER	4,05	2,96
ARG	3,13	3,34
GLY	1,56	1,35
ASP	3,53	2,93
GLU	9,86	8,69
THR	2,26	2,24
ALA	22,72	19,33
PRO	36,16	43,86
LYS	1,53	1,49
TYR	2,99	2,92
MET	1,75	1,22
VAL	3,78	3,52
ILE	1,83	1,70
LEU	1,96	1,56
PHE	2,11	1,85

Figura 18. Aspecto geral dos resultados da porcentagem relativa média dos aminoácidos da via do aspartato. Setas à esquerda indicam o controle e as setas à direita indicam o tratamento com Cd (Controle/Cd), mostrando os aminoácidos que tiveram suas porcentagens relativas aumentadas ou diminuídas em ambos tratamentos

2.4. DISCUSSÃO

O Cd acumulado nas plantas pode interferir em vários processos fisiológicos levando à redução da produtividade agrícola (Zhang et al., 2002) e muitas vezes a morte das plantas. Sabe-se que o Cd pode ser facilmente absorvido pelas raízes e translocado para diferentes partes das plantas (Vitória et al., 2001, Pereira et al., 2002, Tiryakioglu et al., 2006). Plantas expostas ao Cd apresentam uma toxidez que pode ser observada nos diferentes estágios do desenvolvimento das mesmas. Um efeito claro desta toxidez pode ser observado na germinação. Quando sementes são postas a germinar em ambiente com altos níveis de Cd, a atividade das α e β amilases é significativamente reduzida, comprometendo a respiração (Chugh e Sawhney, 1996), resultando na inibição do crescimento do eixo embrionário e da radícula (Shaw et al., 2004).

Em tomate (*Solanum. lycopersicum* L.), a absorção de macronutrientes (Ca, S, P e Mg) diminuiu nas plantas cultivadas na presença de Cd (Gratão et al., 2015). O Cd também pode inibir fortemente o crescimento como relatado para plântulas de *Crotalaria juncea* (Pereira et al., 2002). Em arroz (*Oryza sativa* L.) foi identificado um efeito de dosagem significativo, com inibição do crescimento das raízes, que foi mantido com o aumento da concentração de CdCl₂ (Cardoso et al., 2002). O mesmo foi mostrado para rabanete (*Raphanus sativus* L.), onde o aumento das doses de CdCl₂ causou a diminuição do crescimento (Vitória et al., 2001).

A presença de Cd causa efeitos variados na atividade enzimática. Segundo Kurdziel et al. (2004) e Lösch (2004) o alvo potencial da ação de metais como o Cd são enzimas e proteínas que contêm grupos sulfidril (SH) ligados entre si por ligações dissulfeto. A presença do Cd leva a oxidação destes grupos que, reagindo com o enxofre, destrói as ligações dissulfeto, desnaturando a proteína, resultando na redução ou perda da atividade enzimática.

Outro efeito do Cd na atividade enzimática está associado ao fato de que grande número de enzimas contém metais na sua constituição e a substituição destes por outro metal de mesma carga e tamanho similar, pode resultar na inibição da atividade da enzima (Shaw et al., 2004).

Muitos estudos mostram por que o Cd é tóxico, entretanto pouco se sabe sobre o transporte de Cd em plantas e tão pouco se sabe a respeito dos mecanismos de compartimentalização no vacúolo de células de raiz, folhas e sementes. De fato, existem estudos, porém estes tem sido muito simples e limitados não havendo estudos cinéticos mais claros ou detalhados quanto a mobilidade do metal em plantas.

Os poucos estudos de transcriptoma, proteoma e metaboloma substanciam a conclusão da análise genética de que a tolerância ao Cd é controlada por diferentes genes e, portanto, diferentes mecanismos fisiológicos estão envolvidos. Embora estes estudos tenham identificado genes induzidos sob a presença de Cd, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais este metal pesado modula seus níveis de expressão (Guimarães et al., 2008).

Não obstante, a absorção e a distribuição de metais em plantas variam de acordo com a espécie estudada. Em arroz, o maior acúmulo de Cd ocorre nas raízes e nos nós (Fujimaki et al., 2010). Em tomate, acumula-se principalmente nas raízes e um pouco nos frutos (Gratão et al., 2008, Monteiro et al., 2011), enquanto em milho, acumula-se principalmente nas raízes, havendo um pequeno acúmulo no grão (Fässler et al., 2010). Já em girassol e tabaco, as folhas são os locais de maior acúmulo de Cd (Fässler et al., 2010). Mas de forma geral, a enorme maioria das espécies estudadas até hoje mostram acúmulo preferencial no sistema radicular (Azevedo et al., 2012).

A dose de Cd utilizada neste estudo foi escolhida baseando-se em um experimento piloto, onde foram cultivadas algumas plantas na presença das seguintes concentrações: 0, 10 e 50 mg.kg⁻¹. Assim, após realizar-se a quantificação do metal nos diferentes órgãos vegetais e tendo visto que, no grão, o teor de Cd não era significativamente diferente entre as plantas cultivadas na presença de 10 e 50 mg.kg⁻¹, enquanto que as plantas cultivadas na maior dose

apresentaram sinais claros dos danos ocasionados pelo estresse, optou-se por utilizarmos uma dose média de 30 mg.kg⁻¹.

Nossos resultados mostraram que, como era esperado, o maior teor de Cd foi encontrado nas raízes (97,34% nas raízes coletadas aos 50 DAP, em relação ao restante da planta) enquanto nos grãos coletados no mesmo período foi acumulado apenas 0,15% do total de Cd, ou seja, com valores inferiores a 0,1 mg.kg⁻¹. Estes resultados estão de acordo com outros como Mengel e Kirkby (1982) e Fässler et al. (2010), que afirmaram que o teor de Cd, em grãos de cereais, a partir de solos contaminados, nunca excede 1 mg.kg⁻¹. Estes dados sugerem que existem mecanismos que limitam o transporte de Cd das raízes para a parte aérea, preservando os tecidos fotossintéticos. No entanto, cabe também destacar a possibilidade de que a planta de milho apresenta grande massa verde e o desenvolvimento dos grãos apenas ocorre na fase final de seu desenvolvimento, ou seja, havendo um longo período de tempo e grande quantidade de massa para o acúmulo do Cd em detrimento de seu acúmulo no grão.

De acordo com Stritsis e Claassen (2013), as raízes das plantas avaliadas em seu estudo (milho, girassol, linho e espinafre), acumularam muito mais Cd do que as partes aéreas e, as dicotiledôneas absorveram muito mais Cd do que monocotiledôneas. Além disso, foi visto que as raízes de milho mostraram uma maior tolerância ao Cd do que as outras plantas. Estes fatos corroboram para uma variedade de mecanismos possíveis para o controle tanto da entrada do metal na planta, por exemplo por mecanismos de exclusão e não disponibilização química, como na sua distribuição e efeito celular uma vez absorvido e assimilado no metabolismo. Recentemente Dourado et al. (2013), mostraram que plantas de tomate cultivadas em solo, na presença de Cd e de bactérias do gênero *Burkholderia*, tiveram os níveis de peróxido e clorose diminuídos, além da absorção de Cd pela raiz, que também foi menor nestas plantas. Esta característica é de suma importância pois uma vez que a bactéria imobiliza o Cd, diminui o potencial tóxico sobre as raízes.

Uma importante abordagem que deve ser levada em consideração em experimentos é a que diz respeito ao período de aplicação do Cd no solo. Neste estudo, o solo foi contaminado quando as plantas já estavam estabelecidas, no período pré-florescimento. Isto foi feito pois considerou-se que, desta forma, a espiga, ou melhor, os grãos em formação, seriam uma fonte de dreno principal. Entretanto, pode-se pensar que se a planta ficasse em contato com o metal durante todo o seu desenvolvimento, ou seja, desde a germinação, a resposta poderia ser diferente? O teor de Cd nos grãos seria maior? Estes questionamentos serão esclarecidos no próximo capítulo.

Um aspecto importante, e que deve ser levado em consideração, é o conhecimento das diferentes fases de crescimento do milho, ou seja, é de extrema relevância o entendimento dos diversos estádios de crescimento, desde a sua emergência até a maturidade fisiológica.

O sistema de identificação divide o desenvolvimento da planta de milho em vegetativo (V) e reprodutivo (R). O estágio de 3 folhas completamente desenvolvidas (V3) é o qual todas as folhas e espigas que a planta eventualmente irá produzir estão sendo formadas. Pode-se dizer que o número máximo de grãos ou a produção potencial estão sendo definidas neste estágio. No estágio V5 (cinco folhas completamente desenvolvidas), tanto a iniciação das folhas como das espigas vai estar completa (Magalhães et al., 2006).

Baseando-se nestes dados, pode-se dizer que a melhor estratégia, além de ser a mais realista, seria plantar as sementes já em solo contaminado. Ou então, na pior das hipóteses, contaminar o solo no período pós-germinação, para que a planta, já no estágio V3 esteja sob estas condições. Em resumo, existe uma variedade de condições experimentais possíveis e que podem levar a resultados distintos na resposta da planta

Os dados da peroxidação lipídica e da quantificação de peróxido de hidrogênio mostraram que não houve diferença significativa entre as plantas contaminadas e aquelas controle. Somado a isso, os resultados obtidos neste estudo mostraram claramente que não houve diferença na atividade das enzimas antioxidantes avaliadas.

Nas raízes, tanto aos 20 DAP quanto nas plantas mais velhas (50 DAP), a porcentagem relativa de Cd foi semelhante (97,4% e 97,37% do total, respectivamente). O mesmo foi observado no colmo, onde a porcentagem relativa de Cd aos 20 DAP foi de 1,6% do total e nas plantas mais velhas foi de 1,72%. Estas observações foram diferentes nas folhas e nos grãos sendo que em folhas, a porcentagem relativa de Cd nas plantas mais velhas foi de 0,78%, aproximadamente 2x mais do que o encontrado nas plantas mais jovens (0,42%) indicando que a absorção do metal é contínua. Aos 20 DAP, nos grãos esta porcentagem foi de 0,56%, chegando a quase 4x daquela apresentada nos grãos maduros (0,15%) (Tabela 1). Entretanto, este fator pode ser explicado pelo aumento da matéria seca dos grãos, que ocorre no período de enchimento do mesmo.

De acordo com Xu et al. (2013), a aplicação de NTA (ácido nitrilotriacético) no período da pré-polinização levou a um relativo aumento no acúmulo de Cd nas folhas e a um relativo decréscimo no acúmulo no colmo. O quelante NTA aumenta o transporte de Cd do solo para as folhas, onde ele é depositado durante a transpiração. Como a biomassa das folhas aumenta, a distribuição relativa de Cd nas folhas também aumenta.

Como já foi dito, os dados mostram claramente que não houve diferenças nas atividades das enzimas antioxidantes avaliadas (em folhas). Estes resultados estão de acordo com os dados de Gratão et al. (2008) trabalhando com tomate, onde as respostas obtidas sobre os níveis de atividade de todas as enzimas analisadas, entre elas, CAT, SOD e GR, em raízes e folhas, foram similares àqueles encontrados no controle. Entretanto, no fruto, o resultado mostrou os maiores níveis de atividade enzimática quando comparado com os outros tratamentos, indicando uma maior resposta antioxidante devido ao aumento do acúmulo de Cd neste tecido.

Enzimas antioxidantes podem ajudar a aliviar a toxicidade do metal pesado por mecanismos protetores diretos, mas estas enzimas também são afetadas adversamente por altas concentrações destes metais (Gill e Tuteja, 2010). Shi et al. (2015) mostraram que as atividades da SOD e peroxidase (POD), em folhas de milho expostas ao Pb e ao Cd, aumentaram em um primeiro momento e depois diminuíram com o tempo. Talvez se as análises das enzimas tivessem sido realizadas poucos dias após a aplicação de Cd, a resposta poderia ser diferente. Ainda, não pode ser esquecido o fato de que mesmo o metal não sendo translocado para outros tecidos e órgãos, a sinalização do estresse pelo metal pode ocorrer e gerar uma resposta. No entanto, a resposta pode depender tanto do estágio de desenvolvimento da planta, órgão e concentração do metal. Para este estudo e para as condições e linhagem de milho utilizada, não parece ter ocorrido sinalização ao ponto de gerar uma resposta antioxidativa a uma possível condição de estresse, visto ainda que tanto peroxidação lipídica como conteúdo de H_2O_2 não foram alterados.

Independentemente da forma de aplicação do Cd, sabe-se que a maioria dos estudos sobre os efeitos do Cd nas plantas são experimentos à curto prazo, onde as raízes são expostas a diferentes concentrações do metal por poucas horas ou dias, e as plantas não estão aclimatadas aos potenciais efeitos tóxicos do Cd. Assim, a absorção de Cd pode ser superestimada como consequência do rápido acúmulo do metal no apoplasto, o qual é livremente acessível à solução externa, enquanto que para a absorção de Cd para o simplasto, os íons tem que atravessar a membrana celular, que é um processo muito mais demorado (Redjala et al., 2010). Outro fato comum nos estudos é o uso da hidroponia que muda completamente a interação solução nutriente e sistema radicular. Neste estudo procuramos considerar uma situação mais real àquela encontrada em sistemas de produção de milho.

Estudos com o objetivo de se obter dados cinéticos para a absorção do metal, e podendo ser extrapolado para plantas cultivadas no solo, são escassos. Stritsis e Claassen (2013) obtiveram dados da cinética da absorção de

plantas que foram continuamente expostas ao Cd. Para tanto, eles determinaram a influência da absorção do metal ao longo do período de crescimento, isto é, o resultado do influxo de Cd foi uma média de plantas que tinham sido aclimatadas à exposição do metal. Esta abordagem contrastou acentuadamente com estudos de curto prazo, uma vez que o padrão de absorção em todas as espécies (*Zea mays* L., *Helianthus annuus* L., *Linum usitatissimum* L., *Spinacia oleracea* L.) mostrou que o influxo de Cd aumentou linearmente com a concentração da solução de Cd, não mostrando sinais de saturação.

O milho é uma importante fonte de proteínas e estas, denominadas proteínas de reserva, podem ser separadas no grão em quatro frações de acordo com sua solubilidade (Osborne e Mendel, 1924). De maneira geral, as zeínas, solúveis em solução alcoólica, são as mais abundantes nos grãos. Em seguida vêm as glutelinas, solúveis em solução alcalina. Posteriormente têm-se, em menor quantidade, as albuminas e globulinas, solúveis em água e solução salina, respectivamente (Azevedo et al., 2003).

Como a linhagem de milho utilizada neste trabalho foi a 161 (endosperma com o teor um pouco mais elevado de aminoácidos essenciais, lisina especialmente, do que os milhos comerciais), os nossos resultados mostraram que as proteínas presentes em maior quantidade nos grãos analisados, tanto no controle quanto no tratamento com Cd, foram as glutelinas (mais de 40%). Além disso, podemos notar que as outras três frações (zeínas, albuminas e globulinas) tiveram uma porcentagem semelhante nos grãos (em torno de 20% cada uma).

De acordo com Kabata-Pendias e Pendias (2001), o nível máximo de Cd em culturas agrícolas é 0,05 – 0,5 mg.kg⁻¹, contudo, este metal não é muito translocado para os grãos de cereais (Shtangeeva et al., 2011). Deve-se notar que esta dinâmica geralmente ocorre em solos com baixas concentrações de metais pesados; em solos com altas concentrações, algumas plantas podem acumular estes elementos em seus grãos. Dudka et al. (1994) estudaram o desenvolvimento do trigo em solos com altas concentrações de Cd e observaram que o metal não revelou-se prejudicial às plantas. Entretanto, os grãos produzidos por elas apresentaram níveis considerados tóxicos para animais e seres humanos, ou seja, houve um certo grau de translocação do metal para os grãos. Para uma cultura distinta dos cereais, plantas de café também foram submetidas ao Cd e dependendo da concentração do metal as plantas adultas em estágio produtivo (4 anos) morreram. Já em concentrações mais baixas, o metal foi distribuído na planta e apesar de não acumular no grão, levou ao um gosto metálico que inviabilizou a planta para uso comercial (Tezotto et al., 2012).

Uma abordagem interessante seria avaliar as mesmas enzimas analisadas nos grãos. Entretanto, infelizmente, isto não foi possível pois não havia quantidade suficiente de grãos. Ocorre que, como já foi abordado, ao coletar-se os grãos de milho, notou-se que a sua produção foi muito baixa (Figura 10). Pela figura nota-se que existiram espigas sem nenhum grão sequer.

As prolaminas (zeínas) são as proteínas mais abundantes no endosperma, representando 60% ou mais do teor total de proteínas (Gaziola et al., 1999). Muitas mutações são caracterizadas por mudanças na síntese das proteínas de reserva nos grãos de milho (Molina et al., 2001). O mutante *opaco-2* (*O₂*) difere do milho tipo selvagem na quantidade e distribuição das proteínas do endosperma, com um decréscimo na proporção de zeínas e um amplo aumento nas glutelinas, globulinas e albuminas (Gaziola et al., 1999).

Berdejo (2010), ao analisar o total de proteínas de reserva em grãos de milho da linhagem 161 endosperma normal (n), opaco (o) e QPM (q), notou que as linhagens 161n e 161o apresentaram uma concentração maior de proteínas quando comparadas com a L161q e que as frações proteicas zeínas e glutelina foram as que apresentaram as maiores concentrações nos grãos. Outros estudos para uma variedade de mutantes de endosperma de milho dentro do grupo opaco (o1, o5, o7) e floury (fl1 e fl2) também mostraram padrões diferentes tanto para a distribuição das

proteínas de reserva como na regulação das atividades das enzimas da via metabólica do ácido aspártico (Azevedo et al., 2003, 2004a, 2004b).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram claramente que a fração proteica glutelina foi aquela encontrada em maior concentração, indicando ser um material diferente do milho comum, no qual predominaria a fração prolamina. Por outro lado, as frações zeínas apresentaram praticamente as mesmas concentrações das frações albumina e globulina nos grãos (19,3%, 18,0% e 20,3%, respectivamente, para as plantas controle e 18,6%, 16,5% e 18,4%, respectivamente, para as plantas com Cd). Pelo material de estudo ser o milho de endosperma Normal, esperava-se que o teor de zeínas fosse um pouco maior do que o encontrado uma vez que, de acordo com Berdejo (2010), a fração zeína representou 47,0% do valor total das proteínas de reserva da L161n e a fração globulina + albumina foi a de menor concentração apresentando 14,7% do total de proteínas da L161n. Desta maneira, repetiu-se a extração e quantificação das mesmas, com sementes sempre proveniente da sede, Embrapa, e o resultado foi semelhante ao anterior, com a fração glutelina apresentando a maior concentração nos grãos.

A análise qualitativa das frações protéicas, através da análise dos géis de SDS, mostrou que tanto a presença/ausência de bandas bem como a sua intensidade foram semelhantes para todas frações, para as amostras de plantas contaminadas com o Cd e naquelas amostras controle. Se por um lado não foram observadas alterações mais claras ou bem evidentes para bandas específicas nas diferentes frações protéicas, as plantas na presença do Cd intensificaram os valores de distribuição das frações em relação ao controle, ou seja, as glutelinas foram ainda mais elevadas assim como as outras frações caíram ainda mais com Cd. Se pelos dados referentes à distribuição do Cd, marcadores de estresse e resposta antioxidativa não foram observados efeitos do metal para o milho, para a distribuição das frações protéicas ocorreu. No entanto, apenas com os dados e análises disponíveis, não é possível inferir as razões que levaram a este efeito.

O milho é uma cultura muito importante sendo muito utilizado para o consumo humano e animal no mundo todo. Devido a várias atividades antropogênicas, esta cultura assim como muitas outras, vem sendo submetida a exposição e o consequente aumento da contaminação por elementos tóxicos, entre eles, o Cd. Outro fato importante são os acidentes ambientais, tais como o ocorrido recentemente em Mariana-MG, no qual vastas áreas foram contaminadas por vários elementos que certamente inviabilizarão por muitos anos, quando não permanentemente, áreas de produção agrícola.

Estudos relacionando a influência de metais pesados sobre as culturas vegetais vêm sendo amplamente explorados a fim de se descobrir quais são os efeitos desta contaminação nas plantas e por conseguinte nos seres humanos e animais que venham a se alimentar delas, uma vez que a cadeia alimentar é a principal porta de entrada destes metais nos organismos.

De acordo com Chaudhary e Sharma (2009), a emergência e o desenvolvimento de tecidos embrionários em milho são sensíveis ao aumento nos níveis de Cd, mas os mecanismos fisiológicos e histológicos de tais alterações são pouco conhecidos.

As análises realizadas com os grãos imaturos (20 DAP), apesar de terem sido feitas com reduzida quantidade de amostra, adotando a amostragem através de um “pool” de grãos ao invés de tratamentos independentes, nos trouxeram resultados interessantes a serem discutidos.

Os dados da peroxidação lipídica mostraram que não houve diferença significativa entre os grãos controle e aqueles contaminados. Ou seja, de acordo com este parâmetro, no momento da coleta, o nível de peroxidação da membrana celular nos grãos estava semelhante, não sendo conclusivo mas indicando não haver algum estresse induzido

pelo Cd. O mesmo ocorreu com os resultados de aminoácidos solúveis totais, onde não foi percebida uma diferença significativa entre os tratamentos, exceto o caso da prolina que será discutido mais adiante.

Para as enzimas do metabolismo da lisina, em se tratando da AK, primeiramente notou-se a maior presença da isoforma sensível a lisina. Em relação à sua atividade específica, apesar de ter havido um leve aumento da participação da isoenzima sensível à lisina no tratamento com Cd que sugere uma distribuição diferencial entre as isoenzimas da AK. Este dado também sugere que mesmo não havendo indicativo de estresse pelo Cd pelas taxas de peroxidação lipídicas observadas, a sinalização pode ter atingido o metabolismo da lisina.

Uma próxima enzima importante da via da lisina, seguida pela AK, é a DHDPS e, de acordo com os resultados, sua atividade específica apesar de ter um leve aumento de atividade no tratamento com Cd, este não foi significativo. A enzima DHDPS age na síntese do ácido dihidrodipínico para posterior síntese da lisina. Após a sua síntese, a lisina passa a inibir a atividade da AK e DHDPS.

Tomando como base esta retroinibição da lisina sobre AK e DHDPS e, como no tratamento com Cd a atividade destas duas enzimas foi levemente superior (apesar de não significativa), poderia ser a quantidade de lisina menor nos grãos deste tratamento? Ou seja, se temos menos lisina sendo sintetizada, temos menos retroinibição das enzimas antecessoras da via.

Se olharmos os resultados da atividade específica da primeira enzima da via de degradação da lisina, a LOR, nota-se uma diminuição na atividade no tratamento com Cd. Neste caso, a indagação acima se torna um pouco mais aceitável, ou seja, se há menos lisina sendo sintetizada, há menos degradação. Entretanto, os resultados da SDH não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

O aspartato é sintetizado pela transaminação do oxaloacetato e também é o precursor de aminoácidos essenciais, entre eles a lisina. A enzima aspartato aminotransferase desempenha um papel central tanto na síntese quanto no catabolismo do aspartato (Pavlik et al., 2010). De acordo com Pandey et al. (2004), a atividade da aspartato aminotransferase, em arroz, diminuiu consideravelmente durante o estresse, e a redução foi maior com o aumento do estresse.

Boussama et al. (1999) em trabalho com milho, verificaram que o estresse causado por Cd diminuiu os teores de glutamina e asparagina. Da mesma maneira, Pavlik et al. (2010) observaram que a contaminação por arsênico, em espinafre, diminuiu a concentração de asparagina.

Desta maneira, um outro ponto importante foi partir para a análise da composição de aminoácidos livres nas amostras dos dois tratamentos. O metabolismo de aminoácidos desempenha um importante papel na resistência das plantas ao estresse por vários motivos, dentre eles, a detoxificação de EROs, regulação do pH intracelular e ajuste osmótico (Singh, 1999). Nossos resultados confirmaram um aumento significativo dos níveis de prolina nos grãos das plantas contaminadas com Cd. A correlação entre o aumento dos níveis celulares de prolina e a resistência aos efeitos do estresse é vastamente documentada. Vários trabalhos relatam a prolina como sendo um sequestrador de radicais livres, protetor de enzima e/ou soluto compatível. Além disso, pode agir como uma reserva de nitrogênio orgânico (Kavi Kishor et al., 2005, Kaur e Asthir, 2015).

A prolina, assim como a arginina, possuem como precursor o glutamato. De maneira interessante, os dados da porcentagem relativa dos aminoácidos nos tratamentos controle e com Cd, mostraram, apesar de não significativa, uma maior proporção de arginina (que é também um aminoácido relacionado ao estresse, o qual constitui, assim como a prolina, parte da sinalização ao estresse) no tratamento com Cd. Além disso, a porcentagem relativa de glutamato, no tratamento com Cd, foi inferior.

A arginina é um precursor da síntese de poliaminas (Illingworth et al., 2003) e estas são conhecidas por serem essenciais para o desenvolvimento e pela resposta ao estresse das plantas (Groppa e Benavides, 2008). Seu papel na tolerância ao estresse abiótico e na regulação da assimilação de nitrogênio é bem estabelecido em plantas (Maiale et al., 2004, Marco et al., 2011, Gupta et al., 2013, Guo et al., 2014).

Ainda levando-se em consideração os resultados das porcentagens relativas dos aminoácidos, além da prolina (que teve uma diferença significativa no tratamento com Cd) e da arginina (um leve acréscimo, porém não significativo), um outro aminoácido que apresentou o comportamento semelhante ao da arginina foi a histidina (que também é degradado por conversão em glutamato), ou seja, sua porcentagem relativa foi superior no tratamento com Cd.

As observações de Zemanová et al. (2014), trabalhando com *Noccaea caerulea* e *Arabidopsis thaliana*, indicaram que o aminoácido histidina pode estar envolvido na resistência e acúmulo ao Cd pela redução do dano oxidativo. De acordo com Xu et al. (2012), o acúmulo de histidina nas plantas (*Solanum nigrum* e *Solanum torvum*) promoveu a absorção e transporte de Cd das raízes para a parte aérea, aumentando o acúmulo de Cd nas folhas. Comparado a outros quelantes de baixo peso molecular como fitoquelatinas e nicotianamina, a biossíntese de histidina possui um custo metabólico relativamente baixo (Stepansky e Leustek, 2006). De fato, se compararmos estes resultados com os apresentados neste estudo temos também um acúmulo de Cd nas folhas e um comprovado transporte do metal das raízes para a parte aérea.

Mas o que podemos dizer em relação à lisina, ou melhor, ao metabolismo da lisina (que é o foco deste estudo)? Mais acima levantou-se uma suposição de que como, num padrão geral, não significativo, as atividades de AK e DHDPS foram superiores no tratamento com Cd e a atividade da LOR foi inferior neste tratamento, comparado ao controle, poderia então haver menos lisina no sistema.

Se olharmos os dados da porcentagem relativa, percebe-se que a diferença, além de não ser significativa, é irrisória entre os tratamentos, ou seja, no tratamento com Cd a porcentagem de lisina é apenas 0,04% menor do que no controle. Por outro lado, é óbvio que apenas um dado como este por si só não teria o alcance de conseguir explicar uma via metabólica tão complexa, ainda levando-se em consideração que o metabolismo de aminoácidos é dinâmico e uma via influencia a outra. Neste contexto, deve-se considerar também que estes aminoácidos são sintetizados para incorporação em proteínas, ou seja, pode ser que realmente tenha ocorrido alterações na biossíntese e degradação não perceptíveis após a incorporação nas proteínas. Isso também sugere que futuros estudos devam considerar análises proteômicas mais detalhadas. Por exemplo, a variação observada no aumento da fração de glutelinas no tratamento com Cd sugere que deve ter ocorrido uma maior demanda de lisina e outros aminoácidos que compõem esta fração proteica que estaria de acordo com as possibilidades levantadas nesta discussão quanto a regulação afetada do metabolismo de lisina na presença do Cd, mesmo que pouco significativa dentro das condições exploradas na tese e análises conduzidas.

As análises de metabólitos e enzimas, em raízes e folhas de milho submetidos à contaminação com Cd, mostram tanto o decréscimo na absorção de óxido nítrico quanto das atividades das enzimas nitrato redutase, nitrito redutase, glutamina sintase e glutamato sintase (Boussama et al., 1999). Esses resultados parecem resultar na restrição da síntese ativa de aminoácidos livres a partir do nitrato metabólico. Este fato foi evidenciado pela redução do teor total de aminoácidos nos tecidos das plantas estressadas (Boussama et al., 1999).

O oxaloacetato, vindo do ciclo de Krebs, vai formar o aspartato e este por sua vez, como já foi dito, é o precursor da lisina bem como da metionina, isoleucina e treonina. Ao observarmos a figura 18, nota-se que as porcentagens relativas média de todos os aminoácidos vindo dessa via, inclusive o aspartato, são menores no

tratamento com Cd. Os aminoácidos que por conversão são degradados em glutamato, que por sua vez é oxidado à α -cetoglutarato (arginina, histidina e prolina) tiveram seus teores percentuais relativos superiores no tratamento com Cd.

Estudos recentes indicam que os aminoácidos são utilizados não somente para a síntese de proteínas de reserva, mas também para a demanda de energia sendo catabolizados e seus produtos entrando no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para gerar energia (Galili, 2011). Os aminoácidos da via do aspartato, sob condições de privação de energia, podem ser catabolizados para o ciclo do TCA. Desta maneira, em condições de estresse, estes aminoácidos atuam como fontes energéticas através de seu catabolismo (Araujo et al., 2011).

Este trabalho trouxe uma amostra daquilo que acontece, no que se refere ao metabolismo de aminoácidos em grãos de milho, em especial o da lisina, sob condições de estresse abiótico causado pelo Cd (nas condições específicas utilizadas). Entretanto, em se tratando de vias metabólicas tão complexamente reguladas, há muito mais a ser investigado para podermos tentar entender essa fina regulação. Em relação à saúde humana, vimos que, mesmo em baixas concentrações, o Cd é transportado e se acumula no grão e de alguma maneira, mesmo que sutilmente, ele altera o balanço de aminoácidos totais livres dentro do grão.

REFERÊNCIAS

- Alesiani, A., Bedford, D., Cerquiglini, C., Claro, J., Giusti, A.M., Karumathy, G., Mancini, D., Marocco, E., Mascianá, P., Michetti, M., Milo, M., 2016. Food Outlook.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environ.* 24, 1337–1344. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x
- (ANVISA), A.N. de V.S., 2013. RDC nº 42 de 29 de Agosto de 2013. Diário Of. da União 33.
- (ANVISA), A.N. de V.S., 1965. Decreto No 55.871, de 26 de Março de 1965. Diário Oficial da União – Seção 1. Brasil.
- Araújo, W.L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C.J., Fernie, A.R., 2011. Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends Plant Sci.* doi:10.1016/j.tplants.2011.05.008
- Arruda, P., da Silva, W.J., 1982. Protein and amino acid metabolism in normal and *high-lysine sugary opaque-2* maize endosperm during kernel development. *Rev. Bras. Genética* 2, 313–327.
- Arruda, P., Kemper, E.L., Papes, F., Leite, A., 2000. Regulation of lysine catabolism in higher plants. *Trends Plant Sci.* doi:10.1016/S1360-1385(00)01688-5
- Arruda, P., Silva, W.J., Teixeira, P.F., 1978. Protein and Free Amino Acids in a High Double Mutant. *Phytochemistry* 17, 1217–1218.
- Azevedo, R.A., Smith, R.J., Lea, P.J., 1992. Aspartate kinase regulation in maize: Evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. *Phytochemistry* 31, 3731–3734. doi:10.1016/S0031-9422(00)97517-4
- Azevedo, R.A., Arruda, P., Turner, W.L., Lea, P.J., 1997. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* 46, 395–419. doi:10.1016/S0031-9422(97)00319-1
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x
- Azevedo, R.A., Lea, P.J., 2001. Lysine metabolism in higher plants Review Article 261–279.
- Azevedo, R.A., Damerval, C., Landry, J., Lea, P.J., Bellato, C.M., Meinhardt, L.W., Le Guilloux, M., Delhay, S., Toro, A.A., Gaziola, S.A., Berdejo, B.D.A., 2003. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and floury mutations. *Eur. J. Biochem.* 270, 4898–4908. doi:10.1111/j.1432-1033.2003.03890.x
- Azevedo, R. a., Damerval, C., Lea, P.J., Landry, J., Bellato, C.M., Meinhardt, L.W., Guilloux, M. Le, Delhay, S., Toro, A. a., Gaziola, S. a., Varisi, V. a., Grato, P.L., 2004a. Genetic control of lysine metabolism in maize endosperm mutants. *Funct. Plant Biol.* 31, 339. doi:10.1071/FP03173
- Azevedo, R. a, Lea, P.J., Damerval, C., Landry, J., Bellato, C.M., Meinhardt, L.W., Le Guilloux, M., Delhay, S., Varisi, V. a, Gaziola, S. a, Grato, P.L., Toro, A. a, 2004b. Regulation of lysine metabolism and endosperm protein synthesis by the opaque-5 and opaque-7 maize mutations. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4865–71. doi:10.1021/jf035422h
- Azevedo, R.A., Lancien, M., Lea, P.J., 2006. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids* 30, 143–162. doi:10.1007/s00726-005-0245-2
- Azevedo, R.A., Arruda, P., 2010. High-lysine maize: The key discoveries that have made it possible. *Amino Acids* 39, 979–989. doi:10.1007/s00726-010-0576-5

- Azevedo, R.A., Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., 2012. What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? *Food Energy Secur.* 1, 133–140. doi:10.1002/fes3.10
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287. doi:10.1016/0003-2697(71)90370-8
- Beevers, L., 1976. *Senescence*. New York.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian J. Plant Physiol.* 17. doi:10.1590/S1677-04202005000100003
- Benbrahim-Tallaa, L., Liu, J., Webber, M.M., Waalkes, M.P., 2007. Estrogen signaling and disruption of androgen metabolism in acquired androgen-independence during cadmium carcinogenesis in human prostate epithelial cells. *Prostate* 67, 135–145. doi:10.1002/pros.20479
- Berdejo, B.D.A., 2010. Caracterização das proteínas de reserva em linhagem QPM e estudo bioquímico da enzima homoserina quinase (HK) em sementes de milho (*Zea mays* L.). Tese - Agron. (Genética e Melhor. Plantas) ESALQ/USP 124 fls.
- Bieleski, R.L., Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17, 278–293. doi:10.1016/0003-2697(66)90206-5
- Black, S.; Wright, N., 1955. Aspartic beta-semialdehyde dehydrogenase and aspartic beta-semialdehyde. *J. Biol. Chem.* 213, 39–50.
- Boussama, N., Ouariti, O., Suzuki, A., Ghorbal, M.H., 1999. Cd-Stress on Nitrogen Assimilation. *J. Plant Physiol.* 155, 310–317. doi:10.1016/S0176-1617(99)80110-2
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cakmak, I., Horst, W.J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83, 463–468. doi:10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x
- Cardoso, P.F., Molina, S.M.G., Pereira, G.J.G., Vitoria, A.P., Azevedo, R.A., 2002. Response of rice inbred lines to cadmium exposure. *J. Plant Nutr.* 25, 927–944. doi:10.1081/PLN-120003929
- Chaudhary, S., Sharma, Y.K., 2009. Interactive studies of potassium and copper with cadmium on seed germination and early seedling growth in maize (*Zea mays* L.). *J. Environ. Biol.* 30, 427–432.
- Chugh, L.K., Sawhney, S.K., 1996. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. *Environ. Pollut.* 92, 1–5. doi:10.1016/0269-7491(95)00093-3
- Dalurzo, H.C., Sandalio, L.M., Gómez, M., Del Río, L.A., 1997. Cadmium Infiltration of Detached Pea Leaves: Effect on its Activated Oxygen Metabolism. *Phyt. - Ann. Rei Bot.* 37, 59–64.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Exp. Bot.* 52, 1101–1109. doi:10.1093/jexbot/52.358.1101
- Dudka, S., Piotrowska, M., Chlopecka, A., 1994. Effect of elevated concentrations of Cd and Zn in soil on spring wheat yield and the metal contents of the plants. *Water, Air, Soil Pollut.* 76, 333–341. doi:10.1007/BF00482710
- El-Beltagi, H.S., Mohamed, A. a., Rashed, M.M., 2010. Response of Antioxidative Enzymes to Cadmium Stress in Leaves and Roots of Radish (*Raphanus sativus* L.). *Not. Sci. Biol.* 2, 76–82.
- Erdal, S., 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. *Plant Physiol. Biochem.* 57, 1–7. doi:10.1016/j.plaphy.2012.04.016

- Fässler, E., Robinson, B.H., Gupta, S.K., Schulin, R., 2010. Uptake and allocation of plant nutrients and Cd in maize, sunflower and tobacco growing on contaminated soil and the effect of soil conditioners under field conditions. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 87, 339–352. doi:10.1007/s10705-009-9342-z
- Favano, A., 1998. Elementos traço na nutrição e saúde humanas, Roca. ed. São Paulo.
- Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Smith, R.J., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 71, 125–131. doi:10.1023/A:1019917705111
- Fujimaki, S., Suzui, N., Ishioka, N.S., Kawachi, N., Ito, S., Chino, M., Nakamura, S., 2010. Tracing cadmium from culture to spikelet: noninvasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport, and accumulation of cadmium in an intact rice plant. *Plant Physiol.* 152, 1796–1806. doi:10.1104/pp.109.151035
- Galili, G., 2011. The aspartate-family pathway of plants: Linking production of essential amino acids with energy and stress regulation. *Plant Signal. Behav.* 6, 192–195. doi:10.4161/psb.6.2.14425
- Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., 1999. Effect of cadmium ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Biol. Plant.* 42, 49–55. doi:10.1023/A:1002159123727
- Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Benavides, M.P., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* doi:10.1016/j.envexpbot.2012.04.006
- Gaziola, S.A., Teixeira, C.M.G., Lugli, J., Sodek, L., Azevedo, R.A., 1997. The enzymology of lysine catabolism in rice seeds Isolation , characterization , and regulatory properties 371, 364–371.
- Gaziola, S.A., Alessi, E.S., Guimaraes, P.E.O., Damerval, C., Azevedo, R.A., 1999. Quality protein maize: A biochemical study of enzymes involved in lysine metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1268–1275. doi:10.1021/jf980940r
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314. doi:10.1104/pp.59.2.309
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2011. Cadmium stress tolerance in crop plants: probing the role of sulfur. *Plant Signal. Behav.* 6, 215–222. doi:10.4161/psb.6.2.14880
- Gomes-Junior, R.A., Moldes, C.A., Delite, F.S., Pompeu, G.B., Gratão, P.L., Mazzafera, P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2006. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65, 1330–1337. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.04.056
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct. Plant Biol.* doi:10.1071/FP05016
- Gratão, P.L., Pompeu, G.B., Capaldi, F.R., Vitorello, V.A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2008. Antioxidant response of *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow 2* cells to cadmium and nickel stress. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 94, 73–83. doi:10.1007/s11240-008-9389-6
- Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Antunes, A.M., Peres, L.E.P., Azevedo, R.A., 2008. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. *Ann. Appl. Biol.* 153, 321–333. doi:10.1111/j.1744-7348.2008.00299.x
- Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Tezotto, T., Carvalho, R.F., Alves, L.R., Peters, L.P., Azevedo, R.A., 2015. Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. *BioMetals* 28, 803–816. doi:10.1007/s10534-015-9867-3

- Groppa, M.D., Benavides, M.P., 2008. Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids* 34, 35–45. doi:10.1007/s00726-007-0501-8
- Guelfi, A., Azevedo, R.A., Lea, P.J., Molina, S.M.G., 2003. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49, 63–73. doi:10.2323/jgam.49.63
- Guimarães, M.D.A., Santana, T.A. De, Silva, E. V, Zenzen, I.L., Loureiro, M.E., 2008. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Rev. Trópica* 1, 58–68.
- Guo, Z., Tan, J., Zhuo, C., Wang, C., Xiang, B., Wang, Z., 2014. Absciscic acid, H₂O₂ and nitric oxide interactions mediated cold-induced S-adenosylmethionine synthetase in *Medicago sativa* subsp. Falcata that confers cold tolerance through up-regulating polyamine oxidation. *Plant Biotechnol. J.* 12, 601–612. doi:10.1111/pbi.12166
- Gupta, K., Dey, A., Gupta, B., 2013. Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiol. Plant.* doi:10.1007/s11738-013-1239-4
- Gwozdz, E. a, Przymusinski, R., Rucinska, R., Deckert, J., 1997. Plant cell responses to heavy metals: molecular and physiological aspects. *Acta Physiol. Plant.* 19, 459–465.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198. doi:10.1016/0003-9861(68)90654-1
- Illingworth, C., Mayer, M.J., Elliott, K., Hanfrey, C., Walton, N.J., Michael, A.J., 2003. The diverse bacterial origins of the *Arabidopsis* polyamine biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* 549, 26–30. doi:10.1016/S0014-5793(03)00756-7
- Kabata-Pendias, A., 2007. Trace Elements from soil to humans. *Geophys. Res. Abstr.* 9, 11054, 2007. doi:10.1007/978-3-540-32714-1
- Kaur, G., Asthir, B., 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol. Plant.* 59, 609–619. doi:10.1007/s10535-015-0549-3
- Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* 88, 424–438. doi:http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.471.372&rep=rep1&type=pdf
- Kurdzial, B.M.; Prasad, M.N.V.; Strzalka, K., 2004. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: *Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems*, 2nd ed. New Delhi.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Landry, J., Delhay, S., Damerval, C., 2000. Improved method for isolating and quantitating α -amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true glutelins in maize endosperm. *Cereal Chem.* 77, 620–626. doi:10.1094/CCHEM.2000.77.5.620
- Lee, D.H., Lee, C.B., 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: In gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159, 75–85. doi:10.1016/S0168-9452(00)00326-5
- Linko, R., Lapveteläinen, A., Laakso, P., Kallio, H., 1989. Protein composition of a high-protein barley flour and barley grain. *Cereal Chem* 478–482.
- Liu, D.L., Zhang, S.P., Chen, Z., Qiu, W.W., 2010. Soil cadmium regulates antioxidases in Sorghum. *Agric. Sci. China* 9, 1475–1480. doi:10.1016/S1671-2927(09)60240-6
- Lösch, R., 2004. Plant mitochondrial respiration under the influence of heavy metals. In: *Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems*, 2nd ed. New Delhi.

- Lugli, J., Campbell, A., Gaziola, S.A., Smith, R.J., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Enzymes of lysine metabolism from *Coix lacryma-jobi* seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 25–32. doi:10.1016/S0981-9428(01)01343-2
- Magalhães, P.C., Durães, F.O.M., 2006. Circular Técnica 76 - Fisiologia da Produção de Milho. *Circ. Técnicas Embrapa* d, 10. doi:ISSN 1679-1150
- Mahmood, T., Gupta, K.J., Kaiser, W.M., 2009. Cadmium stress stimulates nitric oxide production by wheat roots. *Pakistan J. Bot.* 41, 1285–1290.
- Maiale, S., Sánchez, D.H., Guirado, A., Vidal, A., Ruiz, O. a, 2004. Spermine accumulation under salt stress. *J. Plant Physiol.* 161, 35–42. doi:10.1078/0176-1617-01167
- Marco, F., Alcázar, R., Tiburcio, A.F., Carrasco, P., 2011. Interactions between Polyamines and Abiotic Stress Pathway Responses Unraveled by Transcriptome Analysis of Polyamine Overproducers. *Omi. A J. Integr. Biol.* 15, 775–781. doi:10.1089/omi.2011.0084
- Matsuno, H., Uritani, I., 1972. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. *Plant Cell Physiol.* 13, 1091–1101.
- McLaughlin, M.J., Parker, D.R., Clarke, J.M., 1999. Metals and micronutrients - Food safety issues. *F. Crop. Res.* 60, 143–163. doi:10.1016/S0378-4290(98)00137-3
- Mengel, K., Kirkby, E., 1982. Principles of plant nutrition. Worblanfe-Bern: International Potash Institute.
- Mittler, R., Zilinskas, B.A., 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem.* 212, 540–6. doi:10.1006/abio.1993.1366
- Molina, S., Gaziola, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2001. Manipulação de cereais para acúmulo de lisina nas sementes. *Sci. Agrícola, ...* 205–211.
- Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., Gratão, P.L., Carvalho, G., Tezotto, T., Medici, L.O., Peres, L.E.P., Azevedo, R. a., 2011. Biochemical responses of the ethylene-insensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. *Environ. Exp. Bot.* 71, 306–320. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.12.020
- Nations, F. and A.O. of the U., 2013. FAOSTAT. *Crop. Natl. Prod.*
- Nedjimi, B., Daoud, Y., 2009. Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 204, 316–324. doi:10.1016/j.flora.2008.03.004
- Nuss, E.T., Tanumihardjo, S.A., 2010. Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00117.x
- Opdenakker, K., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases in Plant Metal Stress: Regulation and Responses in Comparison to Other Biotic and Abiotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 7828–7853. doi:10.3390/ijms13067828
- Osborne, T.B., Mendel, L.B., Ferry, E.L., Wakeman, a. J., 1924. Nutritive properties of proteins of the maize kernel. *J. Biol. Chem.* 18, 1–16.
- Pan, J., Plant, J.A., Voulvoulis, N., Oates, C.J., Ihlenfeld, C., 2010. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environ. Geochem. Health* 32, 1–12. doi:10.1007/s10653-009-9273-2
- Pandey, R., Agarwal, R.M., Jeevaratnam, K., Sharma, G.L., 2004. Osmotic stress-induced alterations in rice (*Oryza sativa* L.) and recovery on stress release. *Plant Growth Regul.* 42, 79–87. doi:10.1023/B:GROW.0000014893.45112.55
- Pavlík, M., Pavlíková, D., Staszková, L., Neuberg, M., Kaliszová, R., Száková, J., Tlustoš, P., 2010. The effect of arsenic contamination on amino acids metabolism in *Spinacia oleracea* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1309–1313. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.008

- Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant Soil* 239, 123–132. doi:10.1023/A:1014951524286
- Redjala, T., Sterckeman, T., Louis Morel, J., 2010. Determination of the different components of cadmium short-term uptake by roots. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173, 935–945. doi:10.1002/jpln.201000003
- Rognes, S.E., Lea, P.J., Mifflin, B.J., 1980. S-adenosylmethionine--a novel regulator of aspartate kinase. *Nature*. doi:10.1038/287357a0
- Rozpadek, P., Wezowicz, K., Stojakowska, A., Malarz, J., Surówka, E., Sobczyk, T., Anielska, T., Wazny, R., Miszański, Z., Turnau, K., 2014. Mycorrhizal fungi modulate phytochemical production and antioxidant activity of *Cichorium intybus* L. (Asteraceae) under metal toxicity. *Chemosphere* 112, 217–224. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.04.023
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I., 1995. Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol.* 109, 1427–1433. doi:10.1104/pp.109.4.1427
- Schwartz, G.G., Reis, I.M., 2000. Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 139–45
- Shaw, B., Sahu, S., Mishra, R., 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: *Heavy metal stress in plants- from biomolecules to ecosystems.*, 2nd ed. New Delhi.
- Shewry, P.R., Tatham, a S., 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.* 267, 1–12.
- Shi, Y., Huang, Z., Liu, X., Imran, S., Peng, L., Dai, R., Deng, Y., 2015. Environmental materials for remediation of soils contaminated with lead and cadmium using maize (*Zea mays* L.) growth as a bioindicator. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 6168–6178. doi:10.1007/s11356-015-5778-7
- Shtangeeva, I., Steinnes, E., Lierhagen, S., 2012. Uptake of different forms of antimony by wheat and rye seedlings. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 502–509. doi:10.1007/s11356-011-0589-y
- Singh, K., 1999. Biosynthesis of valine, leucine, and isoleucine, in: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. New York, pp. 227–247.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A., 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175, 408–413. doi:10.1016/0003-2697(88)90564-7
- Soudek, P., Petrová, Š., Vaňková, R., Song, J., Vaněk, T., 2014. Accumulation of heavy metals using *Sorghum sp.* *Chemosphere* 104, 15–24. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.09.079
- Stepansky, A., Leustek, T., 2006. Histidine biosynthesis in plants. *Amino Acids*. doi:10.1007/s00726-005-0247-0
- Stritsis, C., Claassen, N., 2013. Cadmium uptake kinetics and plants factors of shoot Cd concentration. *Plant Soil* 367, 591–603. doi:10.1007/s11104-012-1498-7
- Tezotto, T., Favarin, J.L., Azevedo, R.A., Alleoni, L.R.F., Mazzafera, P., 2012. Coffee is highly tolerant to cadmium, nickel and zinc: Plant and soil nutritional status, metal distribution and bean yield. *F. Crop. Res.* 125, 25–34. doi:10.1016/j.fcr.2011.08.012
- Tiryakioglu, M., Eker, S., Ozkutlu, F., Husted, S., Cakmak, I., 2006. Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20, 181–189. doi:10.1016/j.jtemb.2005.12.004
- Varisi, V.A., 2007. Caracterização de enzimas envolvidas na síntese de lisina de milho e quinoa. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.”
- Vitória, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57, 701–710. doi:10.1016/S0031-9422(01)00130-3

- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. doi:10.1016/S0300-483X(03)00305-6
- Weiner, H., Blechschmidtschneider, S., Mohme, H., Eschrich, W., Heldt, H.W., 1991. Phloem Transport of Amino-Acids - Comparison of Amino-Acid Contents of Maize Leaves and of the Sieve Tube Exudate, *Plant Physiology and Biochemistry*.
- White, P.J., Brown, P.H., 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann. Bot.* 105, 1073–1080. doi:10.1093/aob/mcq085
- Xu, J., Sun, J., Du, L., Liu, X., 2012. Comparative transcriptome analysis of cadmium responses in *Solanum nigrum* and *Solanum torvum*. *New Phytol.* 196, 110–124. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04235.x
- Xu, W., Lu, G., Dang, Z., Liao, C., Chen, Q., Yi, X., 2013. Uptake and distribution of Cd in sweet maize grown on contaminated soils: A field-scale study. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2013. doi:10.1155/2013/959764
- Yemm, E.W., Cocking, E.C., Ricketts, R.E., 1955. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst* 80, 209–214. doi:10.1039/an9558000209
- Zemanová, V., Pavlík, M., Pavlíková, D., Tlustoš, P., 2014. The significance of methionine, histidine and tryptophan in plant responses and adaptation to cadmium stress 60, 426–432.
- Zhang, G., Fukami, M., Sekimoto, H., 2002. Influence of cadmium on mineral concentrations and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. *F. Crop. Res.* 77, 93–98. doi:10.1016/S0378-4290(02)00061-8

3. CAPÍTULO 2. METABOLISMO DA LISINA: OUTRO CONTEXTO

Uma vez que no experimento anterior (Capítulo 1) a quantidade de grãos não foi suficiente para termos tratamentos separados e um pool de grãos controle e grãos contaminados foram utilizados, optou-se por um outro experimento utilizando-se um milho comercial que nos garantiria quantidade de grãos suficiente para as análises, apesar de genotipicamente ser bastante distinto da linhagem 161.

Desta maneira, o milho utilizado neste experimento foi o cultivar AL Avaré, que apresenta alta produtividade, baixo acamamento e baixa susceptibilidade a doenças.

3.1. Material e Métodos

3.1.1. Experimento em casa de vegetação

Após o término do experimento anterior (Capítulo 1), todo o solo dos vasos contaminados com Cd foi colocado em uma caixa impermeável para armazenamento. Quando este experimento foi montado, procedeu-se com a mistura deste solo armazenado que então foi analisado para quantificação de Cd presente. O resultado mostrou que o teor de Cd neste solo era de $24,41 \pm 0,46$ mg.kg⁻¹.

Desta maneira, este solo foi utilizado para a montagem do experimento. Vasos com capacidade de 10L foram utilizados (Figura 19). As sementes de milho foram semeadas então já em solo contaminado, ou seja, diferentemente do experimento anterior, onde a germinação e crescimento aconteceram em solo livre de contaminação, uma vez que a mesma ocorreu somente no período pré-florescimento.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, no Departamento de Genética/Esalq-USP. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (6 blocos, com duas plantas por tratamento). As plantas foram mantidas à temperatura ambiente de $25,5 \pm 5,6^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas. A irrigação foi automática, por gotejamento. O controle fitossanitário foi realizado quando necessário. A polinização foi controlada. A coleta dos grãos foi realizada aos 20 DAP e imediatamente após a coleta congelados a -80°C até a análise das enzimas do metabolismo da lisina.

Figura 19. (1) Plantas no estágio V5; (2) Plantas no período pré-florescimento; (3) Polinização controlada

3.1.2. Quantificação de cádmio

As amostras dos diferentes órgãos vegetais e do solo foram secadas e moídas, sendo posteriormente enviadas para o Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e para o Laboratório CBO (Campinas) para a análise do teor de Cd através da espectroscopia de absorção atômica de chama.

3.1.3. Análise das atividades especificadas das enzimas AK, DHDPS, HSDH, LOR e SDH

Todos os procedimentos de extração e determinação das atividades foram exatamente como descrito no capítulo 1. As médias dos tratamentos foram comparadas (N=6) pelo teste t ($P<0,05$).

3.1.4. Separação e quantificação de aminoácidos solúveis pela cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)

Os procedimentos foram exatamente como descrito no capítulo 1, porém as análises foram realizadas em grãos coletados aos 20 DAP.

3.2. Resultados

3.2.1. Quantificação de Cádmio

Como já era esperado, a maior concentração de Cd foi encontrada nas raízes. Pode-se observar o padrão de acúmulo decrescente do solo para as raízes e destas para a parte aérea da planta (Tabela 8). Além disso, podemos notar que no tratamento com Cd, a quantidade de nitrogênio (g.kg^{-1}) foi levemente superior ao controle.

Tabela 8. Teor médio de cádmio no solo e diferentes órgãos vegetais (mg.kg^{-1}) e quantificação de Nitrogênio (g.kg^{-1})

Tratamentos	Solo	Raiz	Colmo	Folha	Espiga	Grão	N
Controle	$0,83 \pm 0,75$	$0,51 \pm 0,14$	$0,36 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,28$	$0,07 \pm 0,006$	-	$19,53 \pm 0,25$
Cádmio	$16,33 \pm 5,16$	$37,04 \pm 11,33$	$2,15 \pm 0,32$	$1,95 \pm 0,93$	$0,82 \pm 0,47$	$0,21 \pm 0,06$	$21,00 \pm 0,62$

(-) não detectável

Resultados expressos por suas respectivas médias $\pm$ desvio padrão

3.2.2. Determinação da atividade específica da AK

Assim como observado para a linhagem 161, no capítulo 1, os tratamentos com os aminoácidos treonina, lisina e treonina+lisina (na concentração de 5 mM) confirmaram a inibição da atividade da AK, sugerindo a presença de isoformas de AK sensíveis para cada um destes aminoácidos. O padrão de inibição encontrado, demonstra que a lisina provocou maior inibição da atividade total da AK (Tabela 9), indicando a predominância da isoforma sensível à lisina. A inibição causada pela presença dos dois aminoácidos juntos (lisina+treonina), da mesma forma, causou um efeito sinérgico.

A atividade específica da AK foi detectada, e os resultados estão apresentados na Figura 20.

Tabela 9. Inibição da atividade da AK pelos aminoácidos lisina, treonina e lisina+treonina na concentração de 5 mM. Porcentagem relativa ao controle do ensaio.

AK	Treonina	Lisina	Treonina+Lisina
Controle	18,22%	52,07%	66,73%
Cádmio	17,09%	49,89%	62,08%

Figura 20. Atividade específica da AK em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína. C (controle); T (treonina); L (lisina) e L+T (lisina+treonina)

3.2.3. Determinação da atividade específica da HSDH

A atividade da HSDH foi detectada e, apesar de não significativa, no tratamento com Cd ela foi maior (Figura 21). Da mesma forma, foi observada a inibição causada pelo aminoácido treonina, na concentração de 5 mM (Tabela 10), sendo que no tratamento com Cd a inibição foi maior. Estes resultados indicam a presença de uma isoforma sensível à inibição por treonina.

Tabela 10. Inibição da atividade da HSDH pelo aminoácido treonina na concentração de 5 mM. Porcentagem relativa ao controle do ensaio.

HSDH	Treonina
Controle	19,40%
Cádmio	28,05%

Figura 21. Atividade específica da HSDH em $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína. C (controle) e T (treonina)

3.2.4. Determinação da atividade específica da DHDPS

A Figura 22 apresenta os resultados da atividade específica da DHDPS, que mostra um padrão similar de atividade entre os tratamentos. Os agentes inibidores utilizados (lisina e AEC) promoveram uma forte inibição da atividade da DHDPS, sendo que no tratamento com Cd a inibição pela AEC foi maior do que no controle (Tabela 11).

Figura 22. Atividade específica da DHDPS em $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína. L (lisina) e AEC (S-aminoetilcisteína)

Tabela 11. Inibição da atividade da DHDPS pelo aminoácido lisina na concentração de 5 mM e seu análogo AEC 5 mM. Porcentagem relativa ao controle do ensaio

DHDPS	Lisina	AEC
Controle	59,51%	36,57%
Cádmio	59,49%	66,59%

3.2.5. Determinação da atividade específica da LOR e SDH

As atividades específicas da LOR e da SDH foram ligeiramente menores nos tratamentos com Cd, entretanto não significativo (Figuras 23a e 23b).

Figura 23. (a) Atividade específica da LOR em nmol NADPH.min⁻¹.mg⁻¹proteína. (b) Atividade específica da SDH em nmol NAD.min⁻¹.mg⁻¹proteína.

3.2.6. Separação e composição dos aminoácidos livres por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)

A figura 24 apresenta os resultados da quantificação dos aminoácidos solúveis presentes nas amostras (em mg.g⁻¹ de proteína). Como pode-se notar, todos os aminoácidos apresentam quantidades semelhantes em ambos tratamentos. Nesta análise não foi possível quantificar a lisina, pois a mesma ficou abaixo do nível de detecção (nas condições utilizadas). Assim como analisamos as porcentagens relativas no capítulo anterior, podemos fazer algumas análises neste caso. Apesar de não serem diferenças estatisticamente significativas, podemos observar que no controle, as porcentagens relativas de serina, glicina, glutamato, treonina, tirosina, isoleucina e fenilalanina foram relativamente maiores do que no tratamento com Cd (Tabela 12). Podemos notar ainda que os outros aminoácidos da via da lisina (aspartato e metionina) tiveram uma maior porcentagem relativa média no tratamento com Cd (Figura 25). Além destes, histidina, alanina, prolina e valina, tiveram uma porcentagem relativa média superior nos tratamentos com Cd. Arginina e leucina apresentaram uma porcentagem relativa média muito próximas nos dois tratamentos.

Figura 24. Quantificação dos aminoácidos solúveis em mg.g⁻¹ proteína. Onde: HIS (histidina), SER (serina), ARG (arginina), GLY (glicina), ASP (aspartato), GLU (glutamato), THR (treonina), ALA (alanina), PRO (prolina), TYR (tirosina), MET (metionina), VAL (valina), ILE (isoleucina), LEU (leucina), PHE (fenilalanina). Para a análise estatística foi realizado o teste t, considerando-se o nível de significância em $P < 0,05$

Tabela 12. Porcentagem relativa dos aminoácidos (mg.g⁻¹ proteína)

Aminoácidos	Controle (% mg.g ⁻¹ proteína)	Cádmio (% mg.g ⁻¹ proteína)
HIS	1,89	2,16
SER	7,83	6,50
ARG	0,40	0,41
GLY	7,03	5,63
ASP	1,30	1,50
GLU	10,84	10,73
THR	3,07	2,75
ALA	35,95	37,89
PRO	14,06	16,38
TYR	2,48	2,27
MET	1,18	1,46
VAL	5,47	5,82
ILE	1,63	1,56
LEU	2,64	2,67
PHE	4,52	2,50

Figura 25. Aspecto geral dos resultados da porcentagem relativa média dos aminoácidos da via do aspartato. Setas à esquerda indicam o controle e as setas à direita indicam o tratamento com Cd (Controle/Cd), mostrando os aminoácidos que tiveram suas porcentagens relativas aumentadas ou diminuídas em ambos tratamentos

3.3. Discussão

Como no experimento anterior (capítulo 1), e como já era esperado, a maior concentração de Cd foi encontrada nas raízes. Entretanto, apesar de seguir o mesmo padrão de acúmulo (raiz>colmo>folha>grão), podemos observar que neste experimento (onde as plantas foram cultivadas desde a sua germinação em solo contaminado), o teor de Cd no colmo e folha foi significativamente superior àquele encontrado no experimento anterior. Por sua vez, nos grãos, a concentração foi semelhante nos dois experimentos.

A partir do solo, o Cd entra nas plantas através do tecido cortical da raiz e alcança o xilema através da via simplástica e/ou apoplástica (Salt et al., 1995). Concentrações de Cd no tecido da planta, superiores a 5 – 10 mg.kg⁻¹ (matéria seca) são tóxicas para a maioria das plantas (White e Brown, 2010). Baseando-se nisto, é possível inferir que os teores de Cd encontrados nos tecidos vegetais da parte aérea das plantas de milho, contaminadas neste estudo, ficaram bem abaixo dos níveis considerados tóxicos. Por outro lado, as concentrações do metal, encontradas nas raízes, podem ser consideradas altamente tóxicas.

As enzimas da biossíntese de lisina (AK e DHDPS) tiveram suas atividades específicas semelhantes nos dois tratamentos. Bem como a enzima HSDH, que também faz parte da via do aspartato e atua na síntese de treonina, isoleucina e metionina, que não teve alteração em sua atividade específica em ambos tratamentos. No entanto, para a AK, o padrão de inibição foi um pouco distinto quando comparados os controles entre os dois genótipos de milho analisados, AL Avaré com a linhagem 161, visto que a inibição da AK pela lisina foi muito parecida com a da treonina na 161, mas maior para o cultivar AL Avaré. Ainda, os níveis de atividades totais foram bastante diferentes nos dois genótipos, ou seja, atividades totais mais elevadas no AL Avaré. Por último, as taxas de inibição por lisina e AEC em AL Avaré foram menores que aquelas observadas para a 161, sugerindo um efeito claramente menor da lisina na inibição geral das enzimas analisadas. Este fato junto a não detecção de lisina solúvel pode sugerir que exista mesmo menos lisina no sistema e por consequência para a inibição das enzimas da via do ácido aspártico.

Uma outra explicação para a baixa lisina, ou não detectável, seria o fato do milho utilizado no primeiro experimento (L161) apresentar níveis mais elevados de glutelina do que de prolaminas. As variedades comerciais de milho (como a utilizada neste segundo experimento), como já foi dito, apresentam em seus grãos maiores porcentagens de prolaminas e estas são desprovidas de lisina em sua composição.

Entretanto, outros aminoácidos da via do aspartato foram quantificados e através de sua porcentagem relativa média podemos observar que os aminoácidos treonina e isoleucina tiveram teores menores no tratamento com Cd. Por sua vez, a metionina apresentou uma porcentagem relativa média superior no tratamento com Cd. Ao compararmos as figuras 18 e 25 (que apresentam um aspecto geral da porcentagem relativa média dos aminoácidos da via do aspartato) nota-se que, em relação somente aos aminoácidos, a única diferença encontrada é entre aspartato e metionina, ou seja, no primeiro experimento estes aminoácidos tiveram porcentagem relativa média inferior no tratamento com Cd, já neste experimento, o inverso ocorreu.

Além disso, notou-se que o aminoácido prolina (que teve seus níveis significativamente maiores, no tratamento com Cd, no primeiro experimento) não diferiu significativamente neste último, apesar de sua porcentagem relativa média ter sido maior neste tratamento. O que nos chamou atenção foi a expressiva quantidade de alanina apresentada, chegando a 35,95 e 37,89% do total de aminoácidos livres presentes nos grãos no controle e tratamento com Cd, respectivamente. Enquanto o segundo maior contribuinte em termos de aminoácidos foi a prolina com 14,06 e 16,38%, respectivamente.

Com base nos resultados das atividades específicas das enzimas da via da lisina e também levando-se em consideração a quantificação e porcentagem relativa média dos aminoácidos presentes nas amostras, observa-se que o metabolismo foi alterado quando se mudou o genótipo (uma vez que o milho utilizado no experimento do capítulo 1 era proveniente de uma linhagem com maiores níveis do aminoácido lisina e já o milho utilizado no experimento deste capítulo 2 é proveniente de uma variedade comercial). Além disso, no primeiro experimento, as sementes foram germinadas e passaram grande parte de seu desenvolvimento em solo não contaminado. Já neste último, as sementes foram germinadas já em solo contaminado, tendo todo o seu desenvolvimento nestas condições. Mais ainda, no primeiro experimento, a quantificação de aminoácidos foi feita sobre os grãos maduros e neste último, a quantificação foi realizada em grãos imaturos (20 DAP). Ou seja, esses motivos podem explicar claramente as diferenças encontradas. Ainda, o material AL Avaré foi classificado como de baixa susceptibilidade a doenças, o que pode também indicar uma maior preparação metabólica deste genótipo para situações de estresse visto que muitas das respostas e mecanismos de defesa a estresses abióticos como bióticos são comuns.

No milho, assim como em outras plantas, o desenvolvimento do grão ocorre em paralelo com a senescência das folhas. As proteínas presentes nas folhas são hidrolisadas e os aminoácidos são transferidos para os grãos em desenvolvimento (Beevers, 1976). Entretanto, a composição de aminoácidos das proteínas das folhas são bem diferentes do “pool” de aminoácidos utilizados para a síntese das proteínas dos grãos. Ou seja, enquanto alguns aminoácidos são sintetizados, outros são catabolizados formando um pool de aminoácidos para a síntese das proteínas dos grãos.

Além disso, sabe-se que durante o desenvolvimento dos grãos, passando por seus vários estágios de maturação, o padrão de aminoácidos vai se alterando. Em trabalhos com milho, Arruda et al. (1978) já mostravam que alguns aminoácidos livres em endosperma, além das frações proteicas globulina e albumina aos 12 e 24 DAP aumentaram seus teores e os diminuíram aos 47 DAP. O teor de zeína aumentou somente após os 24 DAP e aos 47 DAP esta fração foi a maior no endosperma normal.

Um aumento nos teores de alguns aminoácidos tais como, alanina, prolina, isoleucina, leucina, glicina, valina e fenilalanina ocorreu 7 DAP no endosperma do milho. Aos 14 DAP, no milho de endosperma normal, ocorre um acréscimo de leucina e a concentração de lisina, neste estágio, é menor do que aos 7 DAP (Arruda et al., 1982).

No estágio de 20 DAP, os grãos ainda estão na fase de grão leitoso/pastoso, onde está ocorrendo o incremento da matéria seca devido à transformação dos açúcares em amido e também à translocação dos fotoassimilados presentes nas folhas e no colmo para a espiga e grãos em formação (Magalhães e Durães, 2006). Weiner et al. (1991) mostraram que na seiva do floema das folhas de milho, 28% dos aminoácidos presentes é de alanina, ou seja, estes resultados indicaram que aproximadamente $\frac{1}{4}$ do nitrato assimilado é exportado como alanina. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, uma vez que o teor de alanina livre foi o maior encontrado nos grãos.

Vimos neste capítulo um aspecto geral do metabolismo de aminoácidos, chamando atenção para a via metabólica da lisina. Como já foi dito, obtivemos algumas informações sobre a atividade específica de enzimas do anabolismo e catabolismo, além da composição e quantificação de aminoácidos livres presentes nas amostras. Entretanto, este estudo pode servir como o ponto inicial para outros estudos futuros, partindo-se das informações contidas nele.

Obviamente, uma das etapas mais árduas foi a instalação do experimento em casa de vegetação: escolha das doses, do material vegetal, tipo de solo, melhor forma de contaminação do solo etc. Assim, para próximos estudos, esta etapa não será mais um problema.

Com os resultados expostos e analisados, enxergamos a necessidade de continuidade dos estudos acerca deste tema, pois é de extrema relevância, uma vez que se trata de um fato cada vez mais grave, a contaminação de solos por metais pesados, e sua influência sobre o metabolismo de aminoácidos nos grãos de cereais (que são, em muitos países, a principal fonte protéica). Desta maneira, sugere-se que estudos mais aprofundados tais como: análises ao longo de todo o período de cultivo (a fim de se poder entender o real comportamento dos processos fisiológicos), aliado a análises mais detalhadas como a expressão gênica temporal , por exemplo.

REFERÊNCIAS

- Arruda, P., Silva, W.J., Teixeira, P.F., 1978. Protein and Free Amino Acids in a High Double Mutant. *Phytochemistry* 17, 1217–1218.
- Arruda, P., da Silva, W.J., 1982. Protein and amino acid metabolism in normal and *high-lysine sugary opaque-2* maize endosperm during kernel development. *Rev. Bras. Genética* 2, 313–327.
- Beevers, L., 1976. *Senescence*. New York.
- Magalhães, P.C., Durães, F.O.M., 2006. Circular Técnica 76 - Fisiologia da Produção de Milho. *Circ. Técnicas Embrapa* d, 10. doi:ISSN 1679-1150
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I., 1995. Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol.* 109, 1427–1433. doi:10.1104/pp.109.4.1427
- Weiner, H., Blechschmidtschneider, S., Mohme, H., Eschrich, W., Heldt, H.W., 1991. Phloem Transport of Amino-Acids - Comparison of Amino-Acid Contents of Maize Leaves and of the Sieve Tube Exudate, *Plant Physiology and Biochemistry*.
- White, P.J., Brown, P.H., 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann. Bot.* 105, 1073–1080. doi:10.1093/aob/mcq085

4. ESTUDOS COMPLEMENTARES

4.1. Plântulas

4.1.1. Introdução

Este estudo, independente do projeto inicial, foi realizado a fim de se entender a influência do Cd na germinação e desenvolvimento de plantas de milho, avaliando-se tanto peroxidação lipídica como os aminoácidos solúveis totais nas folhas até o estágio V6 (~30 dias após a germinação). Para tanto, foram utilizadas sementes de milho de 3 genótipos distintos sendo um da linhagem 161 endosperma Normal e de 2 linhagens contrastantes para uso eficiente de nitrogênio (que foram cedidas pelo Professor Dr. Roberto Fritsche-Neto, do Departamento de Genética da ESALQ, Piracicaba). Neste estudo foram avaliadas 3 doses crescentes de Cd (0; 3; 6 mg.kg⁻¹) e as sementes foram semeadas já em solo contaminado.

4.1.2. Uso eficiente de nitrogênio

O milho, como já foi dito, é um importante cereal cultivado no mundo. Entretanto, existem dois desafios a serem superados: a) melhorar a produtividade de grãos para atender a crescente necessidade humana e b) aumentar a eficiência no uso de nitrogênio para agricultura sustentável (Zhang et al., 2011).

A disponibilidade de nitrogênio (N) (Glass, 2003) e água (Parry et al., 2005) são consideradas os dois dos maiores fatores limitantes no crescimento das culturas. A maioria das culturas, exceto as leguminosas fixadoras, recebe uma aplicação de nitrogênio, sendo o maior requisito para produção de grãos (Mengel et al., 2006). Entretanto, as plantas são capazes de converter somente de 30 a 40% deste nitrogênio aplicado para ser útil na produção de grãos, por exemplo (Raun e Johnson, 1999).

O nitrogênio que não é utilizado pela planta, é perdido pela lixiviação do nitrato, denitrificação do solo e perda de amônia para a atmosfera, sendo que todos estes processos podem ocasionar efeitos nocivos ao meio ambiente (Glass, 2003).

O uso eficiente de nitrogênio (NUE) foi definido como o rendimento de grãos por unidade de nitrogênio disponível no solo. Esta NUE pode ser dividida em dois processos: eficiência de absorção (a habilidade da planta em remover o N do solo, normalmente presente na forma de nitrato, íons amônio e aminoácidos (Lea e Azevedo, 2006), e a eficiência de utilização (a habilidade da planta em transferir o N para o grão, predominantemente presente como proteína) Moll et al. (1982, 1987).

Partindo-se deste conhecimento, surgiu o interesse em incluir em nossas análises duas linhagens de milho, contrastantes no uso eficiente de nitrogênio, a fim de obtermos respostas mais abrangentes acerca do metabolismo da planta, na presença do estresse abiótico, causado pelo Cd.

4.1.3. Material e Métodos

4.1.3.1. Condução do experimento com plântulas em casa de vegetação

Foram colocados sacos plásticos dentro de vasos com capacidade de 2L e encheu-se com solo que foi posteriormente contaminado com as diferentes concentrações de Cd (0, 3, 6 mg.kg⁻¹), na forma de sulfato de Cd. Após a contaminação, o solo ficou incubado por 15 dias.

As plântulas foram cultivadas em casa de vegetação, no Departamento de Genética/Esalq-USP, mantidas à temperatura ambiente de 26,3±6,0°C com fotoperíodo de 12 horas. A irrigação foi automática por aspersão.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (DBC) com 4 blocos contendo 5 plantas por tratamento (Figura 26). Foram utilizadas sementes de milho de 3 genótipos diferentes: 1 genótipo da Linhagem 161 (endosperma Opaco) + 2 materiais contrastantes para uso eficiente de nitrogênio (cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Roberto Fritsche-Neto, do Departamento de Genética da ESALQ, Piracicaba).

Foram semeadas 4 sementes por vaso e as folhas foram coletadas 30 dias após o plantio (estágio V4-V6 do milho) e armazenadas a -80°C para posterior análise.

Figura 26. Plântulas dos diferentes genótipos mantidas em casa de vegetação durante o experimento

4.1.3.2. Análise do solo

As amostras de solo foram coletadas, secas e posteriormente enviadas para o Departamento de Ciência do Solo/ ESALQ para análise das propriedades químicas, físicas e quantificação de Cd disponível.

4.1.3.3. Análise da peroxidação lipídica

Assim como descrito anteriormente (Capítulo 1, página 19).

4.1.3.4. Aminoácidos totais em folhas

Foi realizado do mesmo modo como descrito no capítulo 1 (página 23), entretanto utilizando-se 150 mg de folhas maceradas e secas.

4.1.4. Resultados

4.1.4.1. Plântulas

A figura 26 mostra como ficou estabelecido o experimento com plântulas em casa de vegetação. Os tratamentos analisados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Tratamentos analisados no experimento com as plântulas de milho e as respectivas doses de Cd (mg.kg⁻¹)

Tratamentos	Doses Cd
Opaco	0
	3
	6
Alto EUN	0
	3
	6
Baixo EUN	0
	3
	6

4.1.4.2. Análise do solo

As propriedades químicas e físicas do solo estão apresentadas nas Tabelas 14 e 15, respectivamente. Os dados da quantificação de Cd presente no solo, estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 14. Propriedades químicas do solo antes da instalação do experimento

pH (H ₂ O)	M.O (g/Kg)	K	Ca	Mg	H+Al (mmolc.dm ⁻³)	SB	CTC	V
6,6	29	5,0	71	27	24	103	127	81

Tabela 15. Propriedades físicas do solo antes da instalação do experimento

AT	738 g.kg ⁻¹
Silte	35 g.kg ⁻¹
Argila (c/ disp)	227 g.kg ⁻¹
Classe de Textura	md-ar

Tabela 16. Quantificação de Cd no solo

	Cd
Amostra 0	<0,5
Amostra 3	2,88
Amostra 6	5,92

Amostra 0 = Cd 0 mg.kg⁻¹; Amostra 3 = Cd 3 mg.kg⁻¹; Amostra 6 = Cd 6 mg.kg⁻¹

4.1.4.3. Peroxidação lipídica

A quantificação da peroxidação lipídica através da análise da formação do malondialdeído (MDA) está apresentada na Figura 27. É possível observar que entre os tratamentos, da mesma linhagem com diferentes doses de Cd, não houve diferença significativa na quantidade de MDA. Entretanto, pode-se observar que entre os tratamentos, de diferentes linhagens com diferentes doses de Cd, houve uma diferença significativa, verificada pela análise de variância ANOVA.

Figura 27. Quantidade de MDA formado (nmol.g⁻¹ tecido fresco) em folhas de plântulas. Onde a, b, c e d diferem significativamente de a'; b', c' e d', respectivamente ($P < 0,05$)

4.1.4.4. Aminoácidos solúveis totais

A Figura 28 mostra o resultado da análise da quantificação de aminoácidos solúveis totais presentes nas folhas de plântulas coletadas 30 dias após o plantio. Nota-se que existe uma diferença significativa (ANOVA) entre as linhagens, e dentro das mesmas, de acordo com a concentração de Cd presente no solo.

Figura 28. Aminoácidos solúveis totais em folhas de plântulas (30 dias após o plantio). Onde a, b, c, d, e são significativamente diferentes de a', b', c', d', e' ($P < 0,05$)

4.1.5. Discussão

De acordo com Chaudhary e Sharma (2009), a emergência e o desenvolvimento de tecidos embriogênicos em milho são sensíveis ao aumento nos níveis de Cd, mas os mecanismos fisiológicos e histológicos de tais alterações são ainda desconhecidos.

Neste estudo realizado com plântulas nós procuramos investigar qual seria o efeito do Cd nos atributos fisiológicos (análise do estresse e aminoácidos solúveis totais) nos 3 diferentes genótipos de milho utilizados. A fim de se obter informações principalmente sobre o comportamento de dose-resposta.

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia mediada por radicais livres que, uma vez iniciada, resulta em uma deterioração oxidativa de lipídios poli-insaturados. Os alvos mais comuns são componentes de membranas biológicas. Quando propagadas nas membranas, estas reações podem ser iniciadas ou aumentadas por um número de produtos tóxicos, incluindo endoperóxidos e aldeídos (Rosenblum et al., 1989). Nos últimos anos, o MDA (malondialdeído) tem sido reconhecido como um importante indicador de peroxidação lipídica.

A análise da peroxidação lipídica mostrou que entre os tratamentos da mesma linhagem e com diferentes doses de Cd, não houve uma diferença significativa na quantidade de MDA formado, podendo-se pressupor, por tais resultados, que no momento da coleta o nível de estresse, dentro dos tratamentos de mesma linhagem estava equivalente. Por outro lado, notou-se uma diferença significativa entre alguns tratamentos pertencentes a linhagens diferentes, por exemplo entre Baixo 3 e Opaco 0 e Baixo 6 e Opaco 3. De maneira geral, podemos notar pela Figura 27, que o genótipo Opaco apresentou maiores taxas de peroxidação lipídica independente do Cd, enquanto que o genótipo alto EUN mostrou aumento da peroxidação lipídica com o aumento do Cd.

Nos resultados de aminoácidos solúveis totais podemos perceber (Figura 28) um discreto aumento nos tratamentos da maior dose de Cd (6 mg.kg⁻¹), sendo que no genótipo Opaco (6 mg.kg⁻¹) podemos observar o maior teor de aminoácidos. Além disso, podemos notar que dentro da mesma linhagem, entre diferentes doses de Cd, existe

uma diferença na quantidade de aminoácidos solúveis totais, como apresentado entre Opaco 0 e Opaco 6. Uma complementação desta análise seria a separação e verificação da composição de aminoácidos presentes dentro de cada genótipo, com as diferentes doses, para verificar se existe um grupo específico ou algum aminoácido que responderia pelas diferenças, podendo desta forma inclusive indicar rotas metabólicas preferenciais envolvidas na resposta.

REFERÊNCIAS

- Chaudhary, S., Sharma, Y.K., 2009. Interactive studies of potassium and copper with cadmium on seed germination and early seedling growth in maize (*Zea mays* L.). J. Environ. Biol. 30, 427–432.
- Glass, A., 2003. Nitrogen Use Efficiency of Crop Plants: Physiological Constraints upon Nitrogen Absorption. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 22, 453–470. doi:10.1080/713989757
- Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2006. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. Ann. Appl. Biol. 149, 243–247. doi:10.1111/j.1744-7348.2006.00101.x
- Mengel, K., Hütsch, B., Kane, Y., 2006. Nitrogen fertilizer application rates on cereal crops according to available mineral and organic soil nitrogen. Eur. J. Agron. 24, 343–348. doi:10.1016/j.eja.2005.12.001
- Moll, R.H., Kamprath, E.J., Jackson, W.A., 1987. Development of Nitrogen-Efficient Prolific Hybrids of Maize1. Crop Sci. 27, 181. doi:10.2135/cropsci1987.0011183X002700020007x
- Moll, R.H., Kamprath, E.J., Jackson, W.A., 1982. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. Agron. J. 74, 562. doi:10.2134/agronj1982.00021962007400030037x
- Parry, M.A.J., Flexas, J., Medrano, H., 2005. Prospects for crop production under drought: Research priorities and future directions. Ann. Appl. Biol. doi:10.1111/j.1744-7348.2005.00032.x
- Raun, W.R., Johnson, G.V., 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. Agron. J. 91, 357–363. doi:10.2134/agronj1999.00021962009100030001x
- Rosenblum, E.R., Gavalier, J.S., Van Thiel, D.H., 1989. Lipid peroxidation: A mechanism for alcohol-induced testicular injury. Free Radic. Biol. Med. 7, 569–577. doi:10.1016/0891-5849(89)90034-8
- Zhang, F., Cui, Z., Fan, M., Zhang, W., Chen, X., Jiang, R., 2011. Integrated soil-crop system management: reducing environmental risk while increasing crop productivity and improving nutrient use efficiency in China. J. Environ. Qual. 40, 1051–7. doi:10.2134/jeq2010.0292

4.2. Embriões imaturos e Ensaio do cometa

Uma outra abordagem que queríamos levar em consideração era analisar se existe alguma alteração no padrão de resposta antioxidante em radículas e coleótilos/folhas de milho germinado a partir de embriões imaturos (sem a presença do endosperma), na presença de Cd. Além disso, tornou-se relevante a avaliação da genotoxicidade causada pelo Cd sobre as radículas em formação.

4.2.1. Introdução

4.2.1.1. Efeito do Cd em radículas/coleótilos de embriões imaturos (20 DAP)

O conhecimento sobre as funções do endosperma têm sido um alvo atrativo para o melhoramento genético e biotecnologia. Em particular, desde que o endosperma em cereais age como um órgão de fonte primária para a semente, ele pode ser modificado ou manipulado para acumular vários metabólitos ou proteínas (Wang et al., 2013, Tuncel et al., 2014). Além disso, o endosperma expressa genes únicos que se especializaram em funções de tolerância ao estresse. Tais proteínas do endosperma tem sido sugeridas na tolerância ao estresse quando expressas em um organismo heterólogo (Amara et al., 2012).

Em cereais, o papel do endosperma na germinação da semente é bem documentado. O escutelo do embrião sintetiza e secreta giberelina para a camada de aleurona do endosperma. A giberelina induz a síntese de α -amilase na camada de aleurona, a qual secreta tais enzimas de hidrólise do endosperma amiláceo. O embrião utiliza açúcares liberados pela degradação do amido para seu crescimento (Yan et al., 2014).

Existem duas classes de reguladores de endosperma durante a germinação. A primeira inclui aqueles que são expressos durante o desenvolvimento da semente e a germinação, enquanto a segunda inclui aqueles que são expressos somente durante a germinação. Os reguladores de maturação da semente possivelmente funcionam no endosperma para controlar a germinação, direta ou indiretamente (Yan et al., 2014).

As células do endosperma são capazes de sentir as mudanças ambientais e gerar sinais com a finalidade de regular o crescimento do embrião. Assim, a comunicação e interação entre o embrião e o endosperma é bidirecional (Yan et al., 2014).

Desta forma, levando-se em consideração a fina sintonia existente entre endosperma e embrião, para que ocorra a sua germinação e crescimento, tornou-se válida a proposta de analisar quais seriam as alterações existentes no padrão de resposta ao estresse, em radículas e coleótilos/folhas provenientes de embriões germinados na presença de Cd (sem endosperma).

4.2.1.2. Avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa

No intuito de conseguir respostas mais completas acerca do que ocorre com a planta em uma situação de estresse, achamos por bem, que seria relevante avaliarmos, em radículas e coleótilos/folhas, provenientes de grãos germinados na presença de Cd, quais são os efeitos desta contaminação sobre o DNA, avaliando-se assim, a genotoxicidade causada pelo Cd.

Para tanto, um ensaio que tem sido aplicado, em estudos acerca do impacto sobre as plantas, da radiação, agentes químicos (incluindo pesticidas), metais pesados e nanopartículas, é o ensaio do Cometa. Nos últimos anos, um

crescente interesse por este ensaio, em plantas, tem ocorrido, uma vez que são 136 artigos publicados entre 2010 e Março de 2015 versus 89 artigos entre 1995 e 2009 (Santos et al., 2015).

O Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) ou ensaio do cometa, tem se tornado uma das mais promissoras técnicas utilizadas no campo da genética toxicológica devido à sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade, rapidez e economia (Collins, 2004, Jha, 2008).

O ensaio do cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Uma vez que danos no DNA são frequentemente célula e tecido-específicos, uma metodologia como o teste do cometa que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e consequentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para avaliação de compostos genotóxicos (Gontijo e Tice, 2003).

O ensaio tradicionalmente utiliza uma suspensão celular, embebida em agarose sobre uma lâmina de microscopia, que é então exposta à lise por detergentes e soluções salinas. A lise permite a remoção da membrana e componentes celulares solúveis, deixando o DNA. Este então é submetido à eletroforese, em condições alcalinas, que irá permitir que fragmentos de DNA migrem formando um típico cometa com uma “cabeça” e “cauda”, daí o nome do teste. Assim, a “quantidade” de DNA na cauda, em relação à cabeça, é proporcional à quantidade de quebra na fita de DNA (Figura 29). Entretanto, em plantas, a presença da parede celular exige mudanças na execução da técnica.

Figura 29. Classes do cometa de acordo com os danos ao DNA, onde: 0 (Classe 0 = nenhum dano); 1 (Classe 1 = poucos danos); 2 (Classe 2 = danos moderados); 3 (Classe 3 = danos expressivos, com a cauda chegando a mais de 3 vezes o tamanho da cabeça do cometa); 4 (Classe 4 = célula em estado de apoptose) (Fonte: Güez et al., 2012)

Koppen e Verschaeve (1996) realizaram a primeira avaliação de genotoxicidade, causada pelo Cd, utilizando o ensaio do cometa, na versão alcalina. Na ocasião, eles estudaram a genotoxicidade do cromo e Cd sobre plantas de *Vicia faba* e mostraram que existe um aumento dose-dependente nos danos sobre o DNA.

Outros trabalhos recentes também observaram a degradação do DNA induzida pelo Cd, por exemplo: Bhat et al. (2011), em *Trifolium repens* (trevo-branco); Monteiro et al. (2012) em *Lactuca sativa* (alface); Arasimowicz-Jelonek et al. (2012) em *Lupinus luteus* (tremoço-amarelo); Amirthalingam et al. (2013) em *Vigna unguiculata* (feijão-caupi); Tkalec et al. (2014) em *Nicotiana tabacum* (tabaco); Arya e Mukherjee (2014) em *Vicia faba* e *Allium cepa* (fava e cebola).

Entretanto, diferentemente daquele primeiro estudo de Koppen e Verschaeve (1996), estes últimos não apresentaram claramente uma resposta de degradação dose-dependente. Isto pode ser explicado pelo fato de que estes autores conduziram estudos com hidroponia e usaram concentrações de Cd muito altas (Santos et al., 2015). O único estudo que utilizou solo contaminado com concentrações realistas de Cd demonstrou um aumento de danos no DNA, dose-dependente, em *Pisum sativum* (ervilha) (Hattab et al., 2009).

Estes últimos dados indicam que o ensaio do cometa, apesar de ser uma técnica relativamente simples e robusta, pode ser uma poderosa ferramenta para complementar o monitoramento de poluição ambiental. Ainda mais, novos campos de pesquisa utilizando o ensaio do cometa estão abertos, não somente em estudos ambientais, mas também em fisiologia de plantas, como esta técnica pode ajudar a elucidar vias envolvidas no desenvolvimento da planta, ciclo celular/morte celular programada, ou até na resistência das plantas a doenças (Santos et al., 2015).

4.2.2. Material e Métodos

4.2.2.1. Germinação de embriões imaturos

Para a realização deste experimento, foi utilizado um material de milho que já estava em produção no campo do Departamento de Genética da Esalq (Milho 30F35HR-Pioneer, Figura 30). As espigas foram coletadas no estágio de grão pastoso (aproximadamente 20 DAP). Posteriormente elas foram esterilizadas superficialmente em hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos. Lavou-se 3 vezes com água destilada esterilizada. Então, os embriões com tamanho de 3-4 mm (Figura 31) foram removidos assepticamente das sementes e inoculadas em Placas de Petri, contendo 20 ml de meio Murashige e Skoog (1962) (acrescido de vitaminas, sacarose, ágar e 2,4D) na presença de CdSO_4 em diferentes doses (0, 25, 75 e 225 μmol).

Foram inoculados cerca de 20 embriões por placa (Figura 32) e estas foram mantidas em câmara de germinação com temperatura de $32\pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após este período, as radículas e coleótilos/folhas foram excisados e armazenados a -80°C para as futuras análises.

Figura 30. Plantação de milho 30F35HR (Pioneer) na área de campo do Departamento de Genética/Esalq

Figura 31. Embrião retirado do grão de milho

Figura 32. Embriões germinados na presença de 0, 25, 75 e 225 μmol de Cd

4.2.2.1.1. Análise das enzimas catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase em PAGE não-desnaturante

A metodologia utilizada foi exatamente como descrito no item material e métodos do capítulo 1 desta tese.

4.2.2.2. Ensaio do Cometa

Como já foi dito, a utilização do ensaio do cometa, em plantas, é relativamente recente e, com isso, a técnica ainda não está bem estabelecida de maneira uniforme.

De acordo com Pourrut et al. (2015), como o passo do isolamento do núcleo é claramente dependente de quem está operando a técnica e, como os parâmetros do ensaio podem ser planta/órgão-dependentes, é sugerido que os laboratórios devam realizar seus próprios testes a fim de se obter as condições ótimas para a análise. Mais ainda, os pesquisadores devem sempre especificar os seus parâmetros utilizados no ensaio (método de extração do núcleo, estágio da planta, temperatura do ambiente etc.).

Desta maneira, num primeiro momento, nosso ensaio foi baseado no protocolo padrão Gichner et al. (2004).

4.2.2.2.1. Germinação em papel filtro

As sementes de milho (AL Avarê) foram germinadas em gerbox, com papel filtro em rolo, na temperatura de aproximadamente 35°C em estufa de germinação. Foram realizados testes com 3 tratamentos diferentes: (1) os papéis filtro foram imersos em uma solução com água autoclavada, (2) com solução de Cd (CdSO_4 , 1000 μmol) e (3) com solução de etilmetanosulfonato (EMS, 1000 μmol). O EMS é um conhecido composto genotóxico, sendo utilizado desta maneira como controle positivo nos ensaios.

Após 7 dias (Figura 34), as sementes germinadas tiveram as radículas lavadas com água destilada. Posteriormente, as mesmas foram excisadas e passaram então para o passo seguinte, que é a técnica do ensaio do cometa propriamente dita.

4.2.2.2.2. Preparação das lâminas

Após o tratamento das plântulas, as pontas das radículas foram colocadas em placas de Petri, mantidas sobre gelo, e espalhadas em 500 μl de 400 mM Tampão Tris (gelado), (pH 7,5).

Utilizando uma lâmina de barbear, as raízes foram picotadas. A placa foi mantida inclinada no gelo de maneira que os núcleos isolados das raízes pudessem se acumular no tampão (toda operação foi realizada sob luz fraca ou amarela, para evitar danos adicionais ao DNA). As lâminas de microscopia foram mergulhadas dentro de uma solução de agarose de ponto de fusão normal (1%) preparada com água a 50°C, secas overnight à temperatura ambiente e armazenadas secas até o uso. Em um tubo eppendorf foi colocado 50 µl da suspensão nuclear + 150 µl de agarose baixo ponto de fusão (preparada com solução salina tampão fosfato a 40°C). Gentilmente foi misturada com a ponta da pipeta, colocou-se 100 µl sobre a lâmina e cobriu-se com uma lamínula. Deixa-se em repouso no refrigerador por 10 minutos. A lamínula foi removida e as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo Tampão (1 mM Na₂EDTA (sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético) e 300 mM NaOH, pH 13). As lâminas foram incubadas por 15 minutos para permitir ao DNA um relaxamento antes da eletroforese (0,72 V cm⁻¹; 26 V, 300 mA) por 30 minutos a 4°C).

Após a corrida, as lâminas foram neutralizadas com o 400 mM Tampão Tris (pH 7,5), sendo imersas por 15 minutos seguido por cobertura das lâminas por duas vezes de 5 minutos cada. Lavou-se as lâminas três vezes com água destilada e deixou-as inclinadas para secarem por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas passaram por um processo de desidratação, sendo cobertas com etanol P.A. por 5 minutos e deixadas secar à temperatura ambiente por cerca de 1 hora.

O próximo passo foi a fixação, onde as lâminas foram cobertas com solução de fixação (ácido tricloroacético, sulfato de zinco e glicerol) por 10 minutos. Seguindo-se, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e deixadas para secar overnight.

Assim, prosseguiu-se com o processo de coloração que consistiu em uma reidratação das lâminas (5 minutos em água destilada); e então colocaram-se as lâminas na solução de coloração (Solução de carbonato de sódio 5%, + Solução de nitrato de prata 0,02% (constituída de nitrato de amônio 0,02%, nitrato de prata 0,02%, ácido tungstosilício 0,1% e formaldeído 0,05%)), por 30 minutos ou até que as lâminas escurecessem. Após isso, as lâminas foram colocadas em uma solução STOP (ácido acético 1%), lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente e observadas ao microscópio óptico.

4.2.3. Resultados

A figura 33 apresenta, respectivamente, os géis para atividade de CAT (a), APX (b) e SOD (c). Observa-se que no gel da CAT, o padrão das bandas é semelhante. Já no gel de APX, nota-se que nas amostras de 25 e 75 µmol de Cd, há um nítido aumento na concentração das bandas. Já no gel de SOD, apesar de também o padrão das bandas ser semelhante, há um discreto aumento de intensidade nas bandas dos tratamentos de 25 e 75 e 225 µmol de Cd.

Figura 33. PAGE não-desnaturante para atividade de (a) CAT, em duas amostras distintas do mesmo tratamento; (2) APX e (3) SOD, em duas amostras distintas do mesmo tratamento. P (padrão). 0, 25, 75 e 225 (0, 25, 75 e 225 μmol de Cd), 225G (germinação embrião com endosperma)

Como já foi dito anteriormente, estas análises não faziam parte do projeto original deste estudo. Assim, não foi possível nos aprofundarmos e dar continuidade a outros experimentos. Há um leque de possibilidades para se trabalhar acerca deste tema.

Mais uma vez, o que foi realizado aqui pode vir a ser o ponto de partida para estudos mais elaborados e que sejam focados no assunto específico. Questões como: existe diferença no padrão de resposta frente ao estresse causado pelo metal, nos tecidos germinados a partir de embriões sem endosperma e na presença do endosperma? Mais ainda, a composição de aminoácidos nestes tecidos é semelhante, ou seja, qual é a influência do endosperma sobre o metabolismo de resposta ao estresse durante a germinação?

Apesar de ser apenas um experimento preliminar, o modelo é bastante interessante e ao relatar tal ideia outros poderão fazer o uso da mesma. Convém lembrar que em condições normais, as plantas entraram em contato com o metal via solo e as sementes em sistemas produtivos terão este contato inicial, motivo pelo qual é importante entender a fisiologia desta interação da semente com o solo e seus elementos, porém, também entender a participação específica de cada componente da semente, seja o embrião, o escutelo e o endosperma.

Figura 34. Sementes germinadas nas soluções com Cd (1000 μ mol) ao centro; e EMS (1000 μ mol) à direita, além do controle (à esquerda)

Como podemos observar na figura 34, o Cd altera, de maneira significativa a estrutura das raízes, de maneira mais proeminente do que o próprio genotóxico EMS. Entretanto, este já é um assunto bem estabelecido na literatura. O foco neste caso era avaliar a genotoxicidade do Cd, observando-se os danos causados ao DNA.

No entanto, como na própria parte introdutória cita, esta é uma técnica que deve ser bem estabelecida em cada laboratório em que for executada. Muitos fatores tem de ser testados a fim de que se consiga lâminas passíveis de serem analisadas.

Foram realizados vários testes e, por fim, o método que obteve mais sucesso foi este citado acima. Entretanto, o tempo não foi suficiente para que conseguíssemos chegar a um score médio de danos, ou seja, não puderam ser produzidas lâminas o suficiente para garantir uma contagem de danos celulares.

O que pudemos notar foi que, nas condições utilizadas e com o pouco de lâminas que foram produzidas, foi nos tratamentos com Cd que há um predomínio de cometas classe 1 (Figura 35).

Assim como já deixamos manifestado nos capítulos anteriores, este experimento pode servir como início de um outro trabalho mais detalhado e específico. Os resultados que vierem deste tipo de estudo podem nos trazer informações importantes também no aspecto da interação física e química do metal com a estrutura do DNA e seu efeito.

Figura 35. Fotos de algumas células mostrando os tipos de classes do cometa. Classe 0 (ausência de cauda); Classe 1 (cauda com até o diâmetro da cabeça do cometa); Classe 3 (tamanho médio da cauda superior a duas vezes o diâmetro da cabeça); Célula apoptótica (núcleo totalmente fragmentado)

REFERÊNCIAS

- Amara, I., Odena, A., Oliveira, E., Moreno, A., Masmoudi, K., Pags, M., Goday, A., 2012. Insights into maize LEA proteins: From proteomics to functional approaches. *Plant Cell Physiol.* 53, 312–329. doi:10.1093/pcp/pcr183
- Amirthalingam, T., Velusamy, G., Pandian, R., 2013. Cadmium-induced changes in mitotic index and genotoxicity on *Vigna unguiculata* (Linn.) Walp 5, 57–62. doi:10.5897/JECE11.008
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Deckert, J., Rucińska-Sobkowiak, R., Gzyl, J., Pawlak-Sprada, S., Abramowski, D., Jelonek, T., Gwóźdź, E.A., 2012. Nitric oxide implication in cadmium-induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. *Plant Physiol. Biochem.* 58, 124–134. doi:10.1016/j.plaphy.2012.06.018
- Arya, S., Mukherjee, A., 2014. Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity. *J. soil Sci. plant Nutr.* 14, 447–458. doi:10.4067/S0718-95162014005000035
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287. doi:10.1016/0003-2697(71)90370-8
- Collins, A.R., 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Mol. Biotechnol.* 26, 249–261. doi:10.1385/MB:26:3:249
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., Demnerová, K., 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 559, 49–57. doi:10.1016/j.mrgentox.2003.12.008
- Gontijo, AMMC.; Tice, R., 2003. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas, in: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D.D M. F.; Marques, E.K. (Ed.), *Mutagênese Ambiental*. pp. 247–279.
- Güez, C.M., Waczuk, E.P., Pereira, K.B., Querol, M.V.M., Rocha, J.B.T. da, Oliveira, L.F.S. de, 2012. In vivo and in vitro genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 48, 461–467. doi:10.1590/S1984-82502012000300013
- Hattab, S., Chouba, L., Ben Kheder, M., Mahouachi, T., Boussetta, H., 2009. Cadmium - and copper - induced DNA damage in *Pisum sativum* roots and leaves as determined by the Comet assay. *Plant Biosyst. - An Int. J. Deal. with all Asp. Plant Biol.* 143, S6–S11. doi:10.1080/11263500903187035
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* doi:10.1093/mutage/gen014
- Koppen, G., Verschaeve, L., 1996. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat. Res. - Environ. Mutagen. Relat. Subj.* 360, 193–200. doi:10.1016/S0165-1161(96)90017-5
- Lee, D.H., Lee, C.B., 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: In gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159, 75–85. doi:10.1016/S0168-9452(00)00326-5
- Mohsin Bhat, T., Ansari, M.Y.K., Choudhary, S., Aslam, R., Alka, 2011. Synergistic Cytotoxic Stress and DNA Damage in Clover (*Trifolium repens*) Exposed to Heavy Metal Soil from Automobile Refining Shops in Kashmir-Himalaya. *ISRN Toxicol.* 2011, 1–7. doi:10.5402/2011/109092

- Monteiro, C., Santos, C., Pinho, S., Oliveira, H., Pedrosa, T., Dias, M.C., 2012. Cadmium-induced cyto- and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1423–1434. doi:10.1021/tx300039t
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Pourrut, B., Pinelli, E., Mendiola, V.C., Silvestre, J., Douay, F., 2015. Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. *Mutagenesis* 30, 37–43. doi:10.1093/mutage/geu075
- Santos, C.L. V, Pourrut, B., Ferreira de Oliveira, J.M.P., 2015. The use of comet assay in plant toxicology: Recent advances. *Front. Genet.* 6. doi:10.3389/fgene.2015.00216
- Tkalec, M., Malarić, K., Pavlica, M., Pevalek-Kozlina, B., Vidaković-Cifrek, Ž., 2009. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 672, 76–81. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.022
- Tuncel, A., Kawaguchi, J., Ihara, Y., Matsusaka, H., Nishi, A., Nakamura, T., Kuhara, S., Hirakawa, H., Nakamura, Y., Cakir, B., Nagamine, A., Okita, T.W., Hwang, S.K., Satoh, H., 2014. The rice endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit is essential for optimal catalysis and allosteric regulation of the heterotetrameric enzyme. *Plant Cell Physiol.* 55, 1169–1183. doi:10.1093/pcp/pcu057
- Wang, S., Takahashi, H., Kajiura, H., Kawakatsu, T., Fujiyama, K., Takaiwa, F., 2013. Transgenic rice seeds accumulating recombinant hypoallergenic birch pollen allergen bet v 1 generate giant protein bodies. *Plant Cell Physiol.* 54, 917–933. doi:10.1093/pcp/pct043
- Yan, D., Duermeyer, L., Leoveanu, C., Nambara, E., 2014. The functions of the endosperm during seed germination. *Plant Cell Physiol.* 55, 1521–1533. doi:10.1093/pcp/pcu089

5. CONCLUSÕES

Apesar de os dados dos indicadores de estresse utilizados não terem sido conclusivos no sentido de que o Cd gerou um estresse oxidativo e por consequência uma resposta antioxidante significativa, pode-se dizer que os resultados, de maneira geral, indicam uma alteração nos processos bioquímicos e fisiológicos das plantas contaminadas pelo metal.

Após as diversas análises realizadas neste estudo, podemos destacar os seguintes pontos:

- houve uma diferença na distribuição das frações proteicas das proteínas de reserva dos grãos no tratamento com Cd;
- a distribuição das isoenzimas de AK sensíveis à lisina foi diferenciada no tratamento com Cd;
- percebeu-se um menor acúmulo de lisina livre nos grãos contaminados com Cd;
- nos grãos das plantas contaminadas existe uma maior porcentagem relativa de aminoácidos relacionados à respostas ao estresse, como por exemplo histidina, arginina e prolina;
- o acúmulo de metal nos grãos das plantas contaminadas tardiamente (no período de pré-florescimento) e naquelas cultivadas durante todo o seu ciclo na presença do metal não foi diferente;
- apesar de o Cd ficar em sua maior parte retido nas raízes, houve o transporte para a parte aérea e o acúmulo nos grãos, mesmo que em baixa quantidade, desencadeou alterações no metabolismo de aminoácidos.