



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**



**SUSANA SILVA CONCEIÇÃO**

**FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO POR *Khaya ivorensis* A. Chev. MITIGAÇÃO DO ESTRESSE POR SILÍCIO NAS MODULAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E ANATÔMICAS.**

**BELÉM  
2020**

**SUSANA SILVA CONCEIÇÃO**

**FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO POR *Khaya ivorensis* A. Chev. MITIGAÇÃO DO ESTRESSE POR SILÍCIO NAS MODULAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E ANATÔMICAS.**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Florestais. Área de concentração: Ecofisiologia de plantas arbóreas.

Orientador: Prof. Dr. Cândido F. de Oliveira Neto.  
Coorientador: Prof. Dr. Flávio José Rodrigues Cruz.

**BELÉM**  
**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo (a) autor(a)

---

- S586f Silva Conceição, Susana  
Fitorremediação de cádmio por *Khaya ivorensis* A. chev. Mitigação do estresse por silício nas modulações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas / Susana Silva Conceição. - 2020.  
105 f.: il. color.
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais (PPGCF), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2020.  
Orientador: Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto  
Coorientador: Prof. Dr. Flávio José Rodrigues Cruz.
1. Metal pesado. 2. Antioxidantes. 3. Sílica. 4. Fluorescência da clorofila *a*. 5. Espessuras epidérmicas. I. Ferreira de Oliveira Neto, Cândido, *orient.* II. Título

CDD 634.92

---

**SUSANA SILVA CONCEIÇÃO**

**FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO POR *Khaya ivorensis* A. Chev. MITIGAÇÃO DO ESTRESSE POR SILÍCIO NAS MODULAÇÕES FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E ANATÔMICAS.**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Florestais. Área de concentração: Ecofisiologia de plantas arbóreas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Cândido F. de Oliveira Neto (Orientador).  
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA.

---

Dr. Jessivaldo Rodrigues Galvão  
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA.

---

Dra. Cristine Bastos do Amarante.  
Museu Paraense Emílio Goeldi.

---

Dr. Antonio Vinicius Correa Barbosa.  
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA.

---

Dr. Sebastião da Cunha Lopes.  
Universidade do Estado do Pará-UEPA.

*Ao meu pai **Pedro**, in memoriam, à  
minha Mãe **Antonia**, ao meu irmão  
**Salatiel**, aos meus queridos parceiros  
de todas as horas: **Edson, Vittorio,  
Flávio, Roxo e Gilberto** e à minha  
**Família**.*

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela bolsa de Pós-Graduação concedida a autora deste trabalho, através do financiamento do projeto, mediante o convênio com o Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais, da Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA.

À Universidade Federal Rural da Amazônia, pela concessão de recursos humanos e materiais imprescindíveis para a concretização desta tese.

Ao Laboratório de Estudos da Biodiversidade de Plantas Superiores (EBPS), e ao Departamento de Ciências Agrárias, (ICA), pertencentes à, UFRA, em cujos laboratórios esta pesquisa foi realizada.

À EMBRAPA, Amazônia Oriental, pela concessão de equipamentos e reagentes laboratoriais utilizados nas análises bioquímicas e fisiológicas desta tese.

Ao Museu Paraense Emílio Goeldi, através do laboratório de análises químicas (LAQGoeldi) pela realização das análises mineralógicas, presentes nesta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus, que na sua infinita misericórdia me ofereceu juntamente com as dificuldades a força para superá-las.

Aos meus pais, Antonia Sena Silva Conceição e Pedro Ferreira Conceição (*in memoriam*) a quem dedico este trabalho e, um agradecimento especial à minha mãe pelo apoio incondicional, companheirismo e amor dedicado a mim ao longo dos anos de convívio, e que foram de extrema valia para a concretização desse trabalho, os quais são a minha força, o meu norte, e o motivo desta caminhada. Meu amor, carinho e gratidão eternos.

Aos meus irmãos Davi, Nelson, Salatiel, Samuel, Sara, Semiramis, Suzete, que sempre torceram e oraram incessantemente por mim para que eu tivesse êxito em todos os âmbitos da vida.

Aos demais familiares Bernardo Almeida, Cecília Silva, Daniel Raiol Júnior, Daniel Raiol, Edson de Jesus, Elaine Conceição, Eliza Sena Silva, Elizeu Conceição, Ester Silva, Franklin Silva, João Pai, João-Filho, Jéssica Conceição, Márcia Conceição, Max Rodrigues, Natália Silva, Natasha Sena, Nonato Sena, Pedro Lucas, Rosana Silva, Rosiel Silva, Shayene Conceição, Silma Sena, que compartilharam dessa trajetória, estendendo-me em algum momento a mão para que eu continuasse.

À família que carinhosamente me recebeu e me acolheu como sua. Francisco Lima, Maria do Socorro Ugulino Lima e, em especial, ao Edson Ugulino Lima e Vittorio Ugulino Lima, que foram dois anjos que o Senhor trouxe para me alegrar, apoiar e motivar nos meus momentos difíceis ao longo da jornada para a concretização desse trabalho, bem como, para ser a minha base após o falecimento de meu pai.

Aos amigos que fiz ao longo dessa caminhada, Ivonete Gonçalves, Tiago Yakuwa e Leonardo Brandão que estiveram comigo na condução do experimento, o que sem eles, não seria possível. O meu mais sincero agradecimento, respeito e carinho eternos.

Aos amigos Gilberto Filho e Henrique Tobias Godoy anjos que surgiram na minha vida, e que me fizeram acreditar todos os dias que a realização de sonhos é possível, e que a solidariedade humana e o despreendimento de bens materiais, devem fazer parte de nossa essência como veículo para o crescimento pessoal.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), na pessoa do professor Dr. Antonio Vinicius Correa Barbosa pelo exemplo de profissionalismo, pela grande colaboração para o desenvolvimento desse trabalho e pela disponibilidade em participar na elaboração das análises estatísticas imprescindíveis para a concretização dessa pesquisa.

Ao Dr. Jessivaldo Galvão, da UFRA, pelas horas de dedicação a mim dispensadas, por ter sido um conselheiro e amigo, e pelas valiosas sugestões para a melhoria desse trabalho.

Ao Dr. Flávio José Rodrigues Cruz, meu coorientador, pela grande ajuda na idealização e concretização desse projeto, me auxiliando com a parte técnica do mesmo de forma magistral. Agradeço por me fazer perceber que poderia ir além do que eu imaginava.

Às professoras Dra. Cristine Amarante, Dra. Alba Lins pela grande contribuição nas análises químicas e anatômicas presentes nesta pesquisa.

À professora Dra. Dêmora Araújo e aos professores Dr. Cândido Neto, meu orientador, ao Dr. Hugo Pinheiro da UFRA, pela concessão do uso dos equipamentos dos laboratórios de Tecnologia de Sementes, de Fisiologia Vegetal e de Biotecnologia e Bioquímica, respectivamente, da referida instituição o que foi fundamental para o término dessa pesquisa em tempo hábil.

Ao professor Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa, da UFRA, a quem aprendi a admirar ao longo do convívio acadêmico durante a monitoria em fisiologia vegetal, em que fui sua orientada, e a quem tenho a mais alta estima e respeito pela sua sabedoria e competência profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da UFRA, especialmente, à professora Izildinha de Souza Miranda que, tornou-se para mim, exemplo de profissional a ser seguida, pela sua cobrança para o “fazer pensar” de cada aluno, pela sua integridade, ética e senso de justiça latente. Agradeço também aos demais professores deste programa de quem tive a oportunidade de ser aluna, pelas experiências e ensinamentos compartilhados comigo, bem como, aos demais membros do Departamento de Ciências Agrárias.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da UFRA, Lina Bufalino, pela dedicação aos alunos no que confere ao melhor desenvolvimento da pesquisa-tese. Meus sinceros agradecimentos.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da UFRA, Andreza pela maneira de conduzir seu trabalho que, em muito me ajudou, não apenas na parte burocrática da documentação da tese, mas também, pelo humanitarismo e solidariedade à mim prestados ao longo do doutorado, meus sinceros e eternos agradecimentos.

Às integrantes do EBPS, Jéssica Suellem e Diana pela contribuição na condução do experimento e nas análises bioquímicas e fisiológicas.

Ao doutorando Breno Serrão da Silva, pelo empenho nas análises anatômicas abordadas na tese.

Ao apoio incondicional dos funcionários da UFRA, Dona Custódia, Seu Dico, Amarildo, Rivaldo, Zezinho e seu Vavá e, em especial, ao amigo, conselheiro, pai de coração, Carlos Alberto (Seu Roxo), que durante a trajetória desta pesquisa se fez presente em todos os sentidos, me apoiando e dando palavras de incentivo e, em muitos momentos, me reabasteceu de força e de alegria quando eu mais precisava. Minha eterna gratidão ao senhor.

Aos tratoristas da UFRA, em especial, ao Geraldo Wanziler pelo grande auxílio na condução deste experimento, pelo apoio na logística de transporte da solução nutritiva até à casa de vegetação do ICA. Sem o auxílio destes profissionais, a metodologia do trabalho ficaria prejudicada.

À bibliotecária Letícia Lima de Sousa, pela disponibilidade com a documentação cadastral da tese.

À todas as pessoas que de qualquer forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que não foram supracitadas, o meu sincero agradecimento.

*“Talvez, não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos se... mas Graças à Deus, não somos o que éramos”*

**(Martin Luther King)**

## RESUMO

Dentre os metais pesados (MPs), o cádmio (Cd), representa uma das maiores ameaças ao meio ambiente em escala global, em virtude do seu elevado potencial ecotoxicológico e dos índices crescentes no solo, o que contribui em larga escala para a perda da produtividade e da biodiversidade dos ecossistemas. Plantas lenhosas de rápido crescimento representam ferramentas eficazes para extração Cd em solos contaminados. Nesse sentido, o mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev), uma espécie arbórea pertence à família Meliaceae apresenta características satisfatórias à remediação dado ao crescimento acelerado, sistema radicular axial e alta produção de biomassa. No entanto, as estratégias fitorremediadoras e mecanismos de tolerância ao Cd implementados por essa espécie, associados à melhoria do estado nutricional, não estão claros. Diante do exposto, essa pesquisa visa identificar as modulações do silício (Si), um micronutriente benéfico, na fisiologia, na bioquímica, no sistema antioxidante e na anatomia de mudas de mogno africano, submetidas à níveis tóxicos de Cd e correlacionar esses processos com o aumento do potencial fitorremediador ao MP. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4 com cinco repetições, e os fatores constituídos por níveis crescentes do MP (Cd 0, 25, 50 e 75 mg L<sup>-1</sup>) e doses de silício (Si 0, 100, 150 e 300 mg L<sup>-1</sup>). Realizou-se a análise de regressão polinomial, superfície de resposta. As concentrações de Cd 50 e 75 mg L<sup>-1</sup> foram tóxicas, e causaram alterações nos processos bioquímicos com repercussões fisiológicas e anatômicas negativas em *K. ivorensis*. Houve danos fotoinibitórios ao PSII, em que as variáveis da fluorescência da clorofila *a*, (ΦPSII), (qP) e (ETR), da fotossíntese (*A*), de trocas gasosas (gs), (Ci/Ca) e dos pigmentos fotossintéticos, especialmente, clorofila *b*, foram as mais afetadas pelo maior nível do metal e apresentaram pontos mínimos respectivos pelo ajuste da regressão de 0,05; 0,07; 0,15 μmol CO<sub>2</sub> molar<sup>-1</sup>; 3,2 mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 0,1 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 0,06 μmol CO<sub>2</sub> molar<sup>-1</sup> e 0,18 mg g<sup>-1</sup> e foram 78%, 82%, 75%, 83%, 96%, 93% e 95% inferiores ao controle. A desorganização no metabolismo citosólico, causou a peroxidação lipídica. O conteúdo de malonoaldeído foi aumentado em 69% e 63% em folhas e raízes, o que foi acompanhado por reduções nas atividades das enzimas antioxidantes, sobre tudo, a CAT teve sua expressão diminuída em de 69% no sistema radicular. Ocorreram alterações anatômicas nos tecidos com diminuições acentuadas nas espessuras epidérmicas. O parênquima paliçádico e o córtex radicular foram 84% e 72% menos espessos sob aquele nível tóxico de Cd. No entanto, o Si atenuou o estresse promovido pelo íon e modulou uma sobreexpressão naquelas variáveis, o que assegurou o crescimento e o desenvolvimento de *K. ivorensis* em condições de contaminação pelo MP. O metabolismo normal das plantas foi retomado apenas naquelas submetidas ao tratamento com Cd 50 mg L<sup>-1</sup> e nutridas com Si 150 mg L<sup>-1</sup>. A análise canônica mostrou que a combinação de Cd 45 mg L<sup>-1</sup> e Si 160 mg L<sup>-1</sup>, resultou nos pontos máximos daqueles parâmetros em que os valores chegaram próximos ao controle. A modulação do Si no metabolismo antioxidante ficou confirmada pelo incremento de 31% na atividade da SOD. Esses padrões de respostas estiveram relacionados à redução da translocação de Cd às partes aéreas decorrente do seu aprisionamento no sistema radicular induzido pelo Si. Assim, o micronutriente elevou a tolerância e o potencial fitorremediador de *K. ivorensis* ao Cd mediante a fitoestabilização do MP, o que foi resultante de mecanismos de complexação do Si ao Cd, bem como, às restrições ao íon impostas pelas estrias de caspary, mediadas pelo mineral benéfico. A tolerância ao Cd decorreu da melhoria nas relações hídricas.

**Palavras-chave:** Metal pesado. Sílica. Fluorescência da clorofila *a*. Antioxidantes. Espessuras epidérmicas.

## ABSTRACT

Among the heavy metals (MPs), cadmium (Cd) represents one of the biggest threats to the environment on a global scale, due to its high ecotoxicological potential and increasing soil indices, which contributes to the loss of carbon dioxide productivity and biodiversity of ecosystems. Fast-growing woody plants represent effective tools for Cd extraction in contaminated soil. In this sense, African mahogany (*Khaya ivorensis* A. Chev), a tree species belonging to the Meliaceae family, presents satisfactory characteristics for remediation given its accelerated growth, axial root system and high biomass production. However, the phytoremediation strategies and Cd tolerance mechanisms implemented by this species, associated with the improvement of nutritional status, are not clear. Given the above, this research aims to identify the modulations of silicon (Si), a beneficial micronutrient, in the physiology, biochemistry, antioxidant system and anatomy of African mahogany seedlings submitted to toxic levels of Cd and correlate these processes with increased phytoremediation potential to MP. The experimental design was a randomized block design in a 4x4 factorial scheme with five replications, and the factors constituted by increasing levels of MP (Cd 0, 25, 50 and 75 mg L<sup>-1</sup>) and silicon doses (Si 0, 100, 150 and 300 mg L<sup>-1</sup>). Polynomial regression analysis, response surface was performed. Cd 50 and 75 mg L<sup>-1</sup> concentrations were toxic and caused changes in biochemical processes with negative physiological and anatomical repercussions on *K. ivorensis*. There was photoinhibitory damage to PSII, where the variables of chlorophyll a, (ΦPSII), (qP) and (ETR) fluorescence, photosynthesis (A), gas exchange (gs), (Ci/Ca) and photosynthetic pigments, especially chlorophyll b, were the most affected by the highest level of the metal and presented respective minimum points by the regression adjustment of 0.05; 0.07; 0.15 μmol molar CO<sub>2</sub><sup>-1</sup>; 3.2 mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 0.1 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; 0.06 μmol molar CO<sub>2</sub> and 0.18 mg g<sup>-1</sup> and were 78%, 82%, 75%, 83%, 96%, 93% and 95% lower than the control. Disorganization in cytosolic metabolism caused lipid peroxidation. Malonaldehyde content was increased by 69% and 63% in leaves and roots, which was accompanied by reductions in antioxidant enzyme activities. Above all, CAT had its expression decreased by 69% in the root system. Anatomical changes occurred in the tissues with marked decreases in epidermal thickness. The palisade parenchyma and root cortex were 84% and 72% less thick under that toxic Cd level. However, Si attenuated the stress promoted by the ion and modulated overexpression in those variables, which ensured the growth and development of *K. ivorensis* under conditions of MP contamination. Normal plant metabolism was resumed only in those submitted to treatment with Cd 50 mg L<sup>-1</sup> and nourished with Si 150 mg L<sup>-1</sup>. Canonical analysis showed that the combination of Cd 45 mg L<sup>-1</sup> and Si 160 mg L<sup>-1</sup> resulted in the maximum points of those parameters where the values came close to the control. Si modulation in antioxidant metabolism was confirmed by a 31% increase in SOD activity. These response patterns were related to the reduction of Cd translocation to the aerial parts due to its entrapment in the Si-induced root system. Thus, the micronutrient increased *K. ivorensis* tolerance and phytoremediation potential to Cd by MP phytostabilization which resulted from mechanisms of Si complexation to Cd, as well as ion restrictions imposed by the caspary striations, mediated by the beneficial mineral. Tolerance to Cd was due to improved water relations.

**Keywords:** Heavy metal. Sílica. Chlorophyll fluorescence *a*. Antioxidants. Epidermal thickness.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Localização geográfica do sítio experimental da UFRA.....39
- Figura 2.2.** Alterações no teor de clorofilas: (Chla; a), (Chlb; b); clorofila total (c) e carotenóides (d); nas folhas de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....45
- Figura 2.3.** Alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: no rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm; a); rendimento quântico efetivo do fotossistema II ( $\Phi$ PSII; b); no coeficiente de dissipação fotoquímica (qP; c); no coeficiente de extinção não fotoquímica (NPq; d); na taxa de transporte de elétrons (ETR;e) nas folhas de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....47
- Figura 2.4.** Alterações no potencial hídrico ( $\Psi_w$ ; a) nas folhas de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....48
- Figura 2.5.** Curva diurna em plantas de mogno (*Khaya ivorensis* A. Chev).....49
- Figura 2.6.** Alterações nos parâmetros de trocas gasosas: fotossíntese (A;a), condutância estomática (gs;b), transpiração (E;c), concentração de CO<sub>2</sub> intercelular (Ci;d); relação Ci/Ca (e) eficiência do uso da água (A/E; f) nas folhas de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....50
- Figura 2.7.** Alterações nos parâmetros de crescimento altura (H;a), diâmetro do caule (DC; b), área foliar (AF; c), Comprimento da raiz (CR; d) de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....52
- Figura 2.8.** Fator de bioacumulação (FB) de cádmio (Cd) nas raízes: (FB, a), nos caules (FB, b) e nas folhas (FB, c) de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....53

<b>Figura 2.9.</b> Fator de translocação (FT, a) e índice de tolerância (IT, b) ao Cd em plantas mogno africano ( <i>Khaya ivorensis</i> A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....	55
<b>Figura 2.10.</b> Concentrações de Silício (Si): em folha (Si, a), em caule (Si,b) e raízes (Si,c) de plantas mogno africano ( <i>Khaya ivorensis</i> A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....	56
<b>Figura 3.1.</b> Altura (H;a), matéria seca da parte aérea (MSPA; b), matéria seca das raízes (MSR; c) e matéria seca total (MST; d) de plantas mogno africano ( <i>Khaya ivorensis</i> A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....	73
<b>Figura 3.2.</b> Peroxidação lipídica avaliada como malondialdeído (MDA,) em folhas (a) e raízes (b) de plantas mogno africano ( <i>Khaya ivorensis</i> A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....	74
<b>Figura 3.3.</b> Atividade da dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT) em folhas (a, c, e) e raízes (b, d, f) de plantas mogno africano ( <i>Khaya ivorensis</i> A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....	76
<b>Figura 4.1.</b> Seções transversais, espessuras: da epiderme abaxial (EEAB;a); da epiderme adaxial (EEAD;b); do parênquima paliçádico (EPP;c); do parênquima esponjoso (EPE;d) e a relação do parênquima paliçádico e esponjoso (EPP/EPE; e) em folhas de plantas mogno africano ( <i>Khaya ivorensis</i> A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....	94
<b>Figura 4.2.</b> Seções transversais: diâmetro da raiz (DR; a) espessura do cortéx da raiz (ECR; b); diâmetro do cilindro vascular da raiz (DCV;c); diâmetro do maior elemento do vaso da raiz (DEV;d) em tecidos radiculares de plantas mogno africano ( <i>Khaya ivorensis</i> A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....	95

**Figura 4.3.** Seções transversais em folhas (a) e raízes (b) em plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).....97

## SUMÁRIO

<b>1.CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	19
<b>1.1. A Tese</b> .....	23
1.1.1. Justificativa.....	24
1.1.2. Questões e Hipóteses.....	25
<b>1.2. Objetivos</b> .....	26
1.2.1 <i>Objetivo geral</i> .....	26
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	26
<b>1.3. Referências</b> .....	28
<b>2.A FITORREMEDIAÇÃO AO CD POR <i>Khaya ivorenses</i> A. chev COM BASE NOS PARÂMETROS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA, NAS TROCAS GASOSAS E A MODULAÇÃO DO SI NA MITIGAÇÃO DO ESTRESSE</b> .....	35
<b>2.1. Introdução</b> .....	37
<b>2.2. Material e métodos</b> .....	39
2.2.1. <i>Material vegetal e condições de crescimento</i> .....	39
2.2.2. <i>Solução nutritiva</i> .....	40
2.2.3. <i>Concentrações de Cádmio e de silício</i> .....	40
2.2.4. <i>Potencial hídrico foliar, curva diurna, trocas gasosas</i> .....	40
2.2.5. <i>Teor de pigmentos fotossintéticos</i> .....	41
2.2.6. <i>Fluorescência da clorofila a</i> .....	41
2.2.7. <i>Análise biométrica e Coleta do material</i> .....	42
2.2.8. <i>Análise de cádmio</i> .....	43
2.2.8.1. <i>Fator de bioacumulação e fator de translocação de Cd nas plantas</i> .....	43

2.2.8.2.Índice de tolerância (IT) para Cd.....	43
2.2.9.Análise da concentração de Silício (Si).....	44
2.2.10.Delineamento experimental e análise estatística.....	44
<b>2.3. Resultados.....</b>	<b>44</b>
<b>2.4. Discussão.....</b>	<b>56</b>
<b>2.5. Conclusão.....</b>	<b>61</b>
<b>2.6. Referências.....</b>	<b>62</b>
<b>3.FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO POR <i>Khaya ivorensis</i> A. Chev. MITIGAÇÃO DO ESTRESSE POR SILÍCIO NO SISTEMA ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>67</b>
<b>3.1. Introdução.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2. Material e métodos.....</b>	<b>71</b>
3.2.1. <i>Material vegetal e condições de crescimento.....</i>	71
3.2.2. <i>Coleta das plantas e determinações biométricas e da massa seca.....</i>	71
3.2.3. <i>Enzimas antioxidantes.....</i>	71
3.2.4. <i>Peroxidação lipídica, (MDA).....</i>	72
3.2.5. <i>Determinação da concentração de cádmio.....</i>	72
3.2.5.1.Índice de tolerância (IT) para Cd.....	72
3.2.5.2. <i>Fatores de bioacumulação e de translocação de Cd nas plantas.....</i>	72
3.2.6. Análise da concentração de Silício.....	72
<b>3.3. Resultados.....</b>	<b>73</b>
<b>3.4. Discussão.....</b>	<b>77</b>
<b>3.5. Conclusão.....</b>	<b>81</b>
<b>3.6. Referências.....</b>	<b>82</b>

<b>4.FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO POR <i>Khaya ivorensis</i> A. Chev. MODULAÇÕES DO SILÍCIO NAS RESPOSTAS ANATÔMICAS.....</b>	<b>88</b>
<b>4.1. Introdução.....</b>	<b>90</b>
<b>4.2. Material e métodos.....</b>	<b>92</b>
<i>4.2.1. Material vegetal e condições de crescimento e delineamento experimental.....</i>	<i>92</i>
<i>4.2.2. Determinação da concentração de cádmio.....</i>	<i>92</i>
<i>4.2.2.1. Índice de tolerância (IT) para Cd.....</i>	<i>92</i>
<i>4.2.2.2. Fatores de bioacumulação e translocação de Cd nas plantas.....</i>	<i>92</i>
<i>4.2.3. Análise da concentração de Silício (Si).....</i>	<i>92</i>
<i>4.2.4. Análise anatômica.....</i>	<i>92</i>
<b>4.3. Resultados.....</b>	<b>93</b>
<b>4.4. Discussão.....</b>	<b>98</b>
<b>4.5. Conclusão.....</b>	<b>100</b>
<b>4.6. Referências.....</b>	<b>101</b>
<b>5.CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>105</b>

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A atividade humana ao longo dos tempos tem aumentado a liberação de poluentes na biosfera, sobretudo, após a revolução industrial onde houve a intensificação no uso de tecnologias com potencial impacto negativo sobre o meio ambiente, pelo fato de liberar poluentes no ar, água e solo (BHARGAVA 2012; ALI, et al., 2013 CHMIELOWSKA-BAK et al., 2014; FROHNE et al., 2015).

As atividades antrópicas que mais contribuem para o aumento de substâncias tóxicas nos ecossistemas são a mineração, a metalurgia, as práticas agrícolas, principalmente, àquelas decorrentes do uso de fertilizantes químicos, sobre tudo, os fosfatados tendo em vista liberarem altas concentrações de rejeitos orgânicos como os hidrocarbonetos e inorgânicos como os metais pesados na biogeocenose (TIRADO & ALLSO, 2012; Agronoticias América Latina y el Caribe, 2013; ADREES et al. 2015; REHMAN et al. 2015; RIZWAN et al. 2016).

Dentre os poluentes que tem contribuído em larga escala para o aumento de degradação do solo e contaminação dos recursos hídricos em âmbito mundial destacam-se, os metais pesados (MPs), que constituem um grupo de metais com densidade atômica maior do que  $5 \text{ g cm}^{-3}$  e, como características, são bioacumulativos e altamente reativos (ALI, et al., 2013; ALI et al., 2015; Li et al., 2015; MAHAR et al., 2015; XIAO et al., 2015; RIZWAN et al., 2016).

Embora sejam constituintes naturais de solos e ocorram espontaneamente no ambiente, formam um grupo de poluentes de grande importância, em virtude de seus aspectos toxicológicos às plantas e à saúde humana (GUERRA et al., 2012; KHAN et al., 2013; TYAGI et al., 2014). Em concentrações acima daqueles valores limites, modificam as características naturais do solo, produzindo impactos negativos, limitando seus usos levando a perda da biodiversidade e produtividade dos ecossistemas (LIMA et al., 2013; MAYOR et al., 2013; ROY E MC DONALD, 2015).

São exemplos de metais com potencial danoso a biogeocenose o As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Mo, Zn, Tl, Sb entre outros (GAUTAM et al., 2016; IVANOV et al., 2016; MATHUR et al., 2016). Alguns desses, mesmo em baixas concentrações, são nocivos ao crescimento e desenvolvimento de plantas, pois dependendo do estado de especiação, podem ser altamente reativos, desencadeando a toxicidade celular em muitas vias (BIELEN et al., 2013; FARID et al., 2013; EMAMVERDIAN et al., 2015). Nesse contexto, inclui-se o cádmio (Cd), um elemento do grupo 2B da tabela periódica, com número atômico igual a 48 e densidade de  $8,6 \text{ g cm}^{-3}$  que apresenta similaridades químicas com outros elementos desse

grupo como, por exemplo, o Zn um micronutriente que exerce funções fisiológicas importantes em plantas (HASAN et al., 2009).

A comunidade científica tem apontado a contaminação dos solos por Cd, como um dos mais graves problemas ambientais nas últimas décadas, tendo em vista os aumentos expressivos da sua concentração nos solos (CHOPPALA et al. 2014; DU et al. 2014). No cenário global atual, estima-se que cerca de 30.000 toneladas desse metal são lançadas anualmente no ambiente e, das quais, 13.000 tons resultam das atividades humanas, principalmente aquelas decorrentes da mineração (GALLEGO et al., 2012; SABEEN et al., 2013). Ressalta-se ainda que aproximadamente 58% do Cd encontrado no meio ambiente advem de práticas agrícolas pela utilização do fosfato mineral (TIRADO & ALLSO, 2012).

Outro aspecto preocupante apontado pelos pesquisadores, é que esse MP é altamente tóxico aos organismos vivos. Segundo a ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), o Cd ocupa a 7ª posição na lista entre as 20 substâncias com maior potencial ecotoxicológico do mundo (ATSDR 2011).

Nas plantas, os cloroplastos são os principais alvos da toxicidade por Cd não só pela inibição da biossíntese de clorofila e pelas diminuições drásticas no teor de pigmentos clorofilianos, mas também, pela redução na atividade da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/Oxigenase (RuBisCo) envolvida na fixação de CO<sub>2</sub> no ciclo de calvim em espécies C3 e C4 (TRAN e POPOVA 2013; CHOPALLA et al., 2014; WANG et al., 2014; AHMAD et al., 2015; LIU et al., 2015 ;RUI et al., 2016; RIZWAN et al. 2016; MATRASZEK et al. 2016).

Em adição, plano celular e molecular, a toxicidade por Cd resulta em alterações de diferentes processos bioquímicos com repercussões fisiológicas negativas, incluindo a redução do potencial osmótico, com conseqüentes decréscimos nos parâmetros de trocas gasosas, na eficiência fotossintética e da fluorescência da clorofila *a*, inativação e desnaturação de enzimas e proteínas em uma variedade de espécies de plantas (LI et al., 2015; LYSENKO et al., 2015; RUI et al., 2016; TAUQEER et al., 2016; PEREIRA ET AL., 2017).

Além disso, no espaço intracelular, o Cd, determina o bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, promove o deslocamento e substituição de íons de biomoléculas e unidades celulares funcionais, causa modificações conformacionais; a peroxidação lipídica e a ruptura da integridade de membranas, desencadeia alterações nas H<sup>+</sup>ATPases de membrana (LIU et al., 2015 ;RUI et al., 2016; RIZWAN et al. 2016; MATRASZEK et al. 2016).

Como conseqüência das alterações promovidas pelo metal no metabolismo bioquímico das plantas ocorrem anormalidades, em geral, expressas através da redução do crescimento da

parte aérea, diminuição da elongação radicular, modificações na anatomia e morfologia das espécies vegetais, enrolamento e clorose foliar (MARQUES et al., 2011; VACULÍK et al., 2012; TRAN & POPOVA, 2013). Vários estudos evidenciam o impacto negativo do Cd sobre o crescimento e atividade fotossintética de plantas (XUE et al., 2013; CHOPALLA et al., 2014; WANG et al., 2014; RUI et al., 2016; RIZWAN et al., 2016).

Por exemplo, para Dias et al., (2013), a redução da fotossíntese líquida em plantas de alface submetidas a doses de Cd foi associada à diminuição da atividade da Rubisco através da substituição do  $Mg^{2+}$  por Cd, como cofator de ativação enzimática, bem como, da redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II, em parte, resultante da degradação de clorofila e redução da absorção de Fe, evidenciando o amplo espectro de ação do Cd sobre o metabolismo vegetal.

Para garantir a sua sobrevivência em ambientes contaminados por Cd, plantas desenvolveram uma gama de sistemas de defesa natural contra o stress provocado pelo metal, compreendendo processos de acumulação de osmólitos compatíveis, dentre eles, os aminoácidos como a prolina e a glicina, N-aminossulúveis, síntese de solutos orgânicos como os carboidratos e sacarose que aumentam a habilidade das células em reter a água sem afetar o metabolismo normal (ADREES et al., 2015; KHAN et al., 2015; NAEEM et al., 2016). No entanto, Artiushenko et al. (2014), afirmam que a tolerância das plantas à MPs varia de acordo com a espécie vegetal, ao tipo e o tempo de exposição ao contaminante.

Outros mecanismos de tolerância ao Cd envolvem processos complexos de transporte iônico, síntese molecular; aumento na expressão de quelantes específicos de baixo peso molecular como, as fitoalexinas e as metaloproteínas, envolvidas no seqüestro e desintoxicação de íons tóxicos; aumento na taxa de transporte daquele MP para as partes aéreas das plantas, lignificação; alterações na estrutura das membranas; modificações nas vias relacionadas à fotossíntese líquida; indução do balanço hormonal e enzimático em um vasto número de espécies vegetais (NIKOLIK et al., 2014; FASAHAHAT et al., 2015; LIU et al., 2015; KUPPER & ANDRESSEN, 2016; WANG et al., 2016).

Os mecanismos enzimáticos envolvem a remoção das espécies reativas de oxigênio (ROS) como: o radical superóxido ( $\dot{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $\dot{O}H$ ). Esses compostos são subprodutos do metabolismo celular aeróbico e dos processos fotooxidativos, que se acumulam nas células vegetais em condições de estresse por Cd promovendo danos ao DNA, às proteínas, aos lipídios de membrana causando inativação de diversas enzimas (ANJUM et al., 2016; NANDA & AGRAWAL, 2016; RUI et al., 2016; TAUQEER et al., 2016).

As principais enzimas envolvidas no mecanismo de defesa antioxidante são a dismutase do superóxido (SOD; E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6), a peroxidase do ascorbato (APX; E.C. 1.11.1.11). Muito embora, outras enzimas também contribuam para a eliminação das ROS, ainda que de forma indireta como a redutase da glutathione (GR; E.C. 1.8.1.7) que juntamente com a APX, compõem o ciclo ascorbato-glutathione (ASC-GSH) (FOYER; NOCTOR, 2005; GILL; TUTEJA, 2010; FAROOQ et al., 2013; DAUD et al., 2013). Esses compostos reduzem, assim, o estresse oxidativo de grande magnitude, com implicações negativas sobre o metabolismo fotossintético.

Plantas tolerantes a MPs têm a habilidade de crescerem ambientes contaminados sem, no entanto, desenvolver sintomas de toxicidade, utilizando além dos supramencionados, outros mecanismos que consistem na remoção (fitoextração e fitovolatilização) ou contenção (fitoimobilização e fitoestabilização) de MPs (ALI et al., 2013; ANTOSIEWICZ et al., 2014). A compreensão desses mecanismos tem sido objeto de estudo para a descontaminação dessas áreas.

Nesse sentido, a fitorremediação, é uma tecnologia biológica recente, de baixo custo que visa à recuperação de solos contaminados por MPs utilizando, para tanto, plantas, sobretudo, às hiperacumuladoras por apresentarem capacidade superior para extrair acumular e tolerar altos níveis de metais pesados em seus tecidos, que são tóxicos para os organismos vivos (ALI et al., 2013; VIEIRA et al., 2015).

Desse modo, as hiperacumuladoras (fitoextratoras), são utilizadas para absorver, translocar e sequestrar MPs na parte aérea e/ou raízes sendo, por isso, adotadas em programas de remediação de ambientes contaminados por MPs (PADM AVATHIAMMA & LI., 2007; FAN et al., 2011; CLEMENS et al., 2013). O sucesso da fitoextração depende da utilização de espécies vegetais com elevado potencial de absorção de MPs e alta produção de biomassa (ALI et al., 2013).

Vários estudos mostram o potencial fitorremediador ao Cd para inúmeras espécies herbáceas (KRAMER, 2010; CLEMENS et al., 2013; AURANGZEB et al. 2014; CAPPA & PILON-SMITS, 2014; BOKHARI et al., 2016). Porém, pesquisas com espécies arbóreas visando seu uso em programas de fitorremediação ainda são restritas.

Do total de espécies identificadas como hiperacumuladoras, até o presente momento, apenas algumas arbóreas como o álamo (*Populus nigra*), pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e o salgueiro (*Salix humboldtiana*) podem concentrar altos níveis de Cd em seus tecidos (Li et al., 2010; ABHILASH et al., 2012; RENNENBERG, 2015). E em função disso, um número

limitado de espécies de árvores tropicais para fitorremediação de solos contaminados com Cd foram investigadas.

Por exemplo, Li et al. (2010), comprovaram que a carambola (*Averrhoa carambola*), pode tolerar elevadas concentrações de Cd em seus tecidos. Fan et al., (2011), atribuíram ao mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla*) um caráter potencialmente fitorremediador devido apresentar satisfatório crescimento em condições simuladas de contaminação por Cd equivalentes a 2,5 (7,5 mg kg<sup>-1</sup>) e 5 (15 mg kg<sup>-1</sup>) vezes o valor de intervenção (VI) para cenários de exposição agrícola em áreas de proteção máxima (APMax) conforme os valores orientadores de qualidade do solo dispostos na resolução n°420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2009). Além disso, e conforme o mesmo estudo, a redução da biomassa total das plantas do tratamento de 7,5 mg kg<sup>-1</sup> Cd foi inferior a 30% em relação às plantas controle, após 30 dias de exposição ao metal.

No entanto, até então, o diminuto número de estudos esclarecedores das estratégias fitorremediadoras e mecanismos de tolerância ao Cd implementadas por plantas de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev), uma espécie arbórea pertence à família Meliaceae fornecedora de uma das madeiras tropicais mais importantes e amplamente comercializados no mundo (DEGEN et al., 2013).

Um vasto número de pesquisas aponta o silício (Si) como atenuante do estresse causado por Cd o que, em partes, é atribuído ao seu envolvimento na regulação de processos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos (HUSSAIN et al., 2015; LI et al., 2015; WU et al., 2016; YU et al. 2016; RAHMAN et al., 2017).

Em resposta ao Cd, o silício parece modular o metabolismo antioxidante das plantas promovendo uma sobreexpressão de enzimas CAT, APX, e SOD, envolvidas na eliminação de radicais livres dos compartimentos celulares e, além disso, o nutriente induz mudanças radiculares tendo em vista o aumento na suberização e lignificação desse órgão, o que restringe a entrada e transporte apoplástico de Cd às partes aéreas das plantas prevenindo danos celulares (CARNEIRO et al., 2017; RAHMAN et al., 2017).

### **1.1. A Tese**

Apesar dos avanços feitos na elucidação da importância do Si no aumento da tolerância ao estresse por Cd para um vasto número de espécies herbáceas, pouca informação está disponível sobre os mecanismos diretos e indiretos do mineral na atenuação da fitotoxicidade por aquele íon tóxico para espécies arbóreas, sobre tudo, do envolvimento do Si

nos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos que potencializam o caráter fitorremediador de *K. ivorensis* ao Cd.

Diante do exposto, objetivou-se a partir dessa pesquisa, identificar as modulações do silício na fisiologia, na bioquímica, na anatomia de plantas de mogno africano, submetidas à níveis tóxicos de Cd, tendo em vista a elucidação dos mecanismos que regulam a menor absorção daquele elemento-traço induzida pelo Si para espécie em estudo e correlacionar esses processos com o aumento do potencial fitorremediador de *K. ivorensis* ao Cd, os quais assegurem o crescimento e desenvolvimento dessa espécie em solos contaminados por aquele MP.

### ***1.1.1. Justificativa***

Por ser um elemento de alta mobilidade e toxicidade, o Cd apresenta elevado potencial de risco ambiental o que justifica esse estudo que visa contribuir para o desenvolvimento de técnicas voltadas a recuperação de áreas contaminadas por esse elemento traço, dentre elas, a fitorremediação aparece como tecnologia emergente de baixo custo voltada a descontaminação de solos por MPs.

As estratégias fitorremediadoras implementadas por *K. ivorensis* ainda não são claras e carecem de uma abordagem que integre os metabolismos, bioquímico e fisiológico, e anatômico a fim de elucidar os mecanismos adotados por esta espécie os quais lhe permitam crescer em concentrações de Cd acima do valor de intervenção (VI) para áreas de proteção máxima (APMax), conforme proposto por BRASIL (2009).

Nesse sentido, criar-se-á um referencial de natureza anatômica, nutricional, fisiológica e bioquímica para o mogno africano tendo em vista a utilização dessa espécie em programas de fitorremediação visando a restauração de áreas degradadas, sobretudo, naquelas onde a exploração mineral é constante e que potencialmente contribui para a poluição do solo, bem como, reinsere economicamente áreas com níveis preocupantes de contaminação por Cd através de atividades agrofloretais durante e após a implementação de futuros programas institucionais de fitorremediação pelo uso de plantas de *K. ivorensis*.

Somado a isso, e diante das dificuldades para a identificação de espécies arbóreas potenciais hiperacumuladoras ao Cd, é fundamental a utilização de técnicas eficientes, e acessíveis que aumentem a tolerância das plantas àquele MP e que potencialize o caráter fitorremediador de espécies lenhosas. Nesse sentido, a elucidação do papel do silício no metabolismo celular de *K. ivorensis* para o aumento do potencial fitorremediador dessa espécie

ao Cd, é uma ferramenta iminente a ser utilizada em programas de remediação de áreas degradadas por MPs.

### 1.1.2. Questões e Hipóteses:

Tendo em vista a necessidade de se apontar espécies arbóreas com potencial fitorremediador para áreas contaminadas por cádmio (Cd), a presente pesquisa visa responder algumas questões e, dentre elas:

**Q1:** *K. ivorensis* A. Chev. é potencial fitorremediadora ao cádmio?

**H1:** A hipótese testada é a de que sim. O mogno africano tem potencial fitorremediador ao Cd o que é potencializado pela nutrição com silício, sobre tudo, quando utilizada a dosagem máxima estabelecida desse nutriente. Logo, esta espécie poderá ser empregada para remediação de locais contaminados por Cd, quando realizada a nutrição silicatada na dosagem ótima desse micronutriente.

**Q2:** Outro aspecto relevante que aparece como instrumento de investigação nessa pesquisa é se a fitoextração de Cd por *K. ivorensis*, implicará em redução no crescimento, nas modulações fisiológicas e bioquímicas dessa espécie, quando utilizada a dosagem máxima do metal? O silício aparecerá como atenuador do estresse por Cd?

**H2:** Acredita-se que o crescimento do mogno africano em condições de toxicidade por Cd é garantido, em parte, pela manutenção da integridade do aparato fotossintético responsável pela síntese e alocação de trioses fosfatadas à parte aérea e raiz bem como, pela estrita regulação dos sistemas antioxidativos.

**H2.1:** Somado a isso, pressupõe-se que o Si apresenta potencial mitigador do estresse por Cd em *K. ivorenses* por promover alterações no sistema radicular (estrias de Caspary) decorrentes da deposição do nutriente nos tecidos da raiz, a ponto de constituir uma barreira mecânica ao influxo de cádmio. Ou ainda, a mitigação da toxicidade de cádmio pelo silício ocorre paralelamente à maior absorção e translocação do MP por plantas de mogno africano.

**Q3:** Outra questão levantada nesse estudo é a de que as concentrações crescentes de silício induzem a uma maior síntese de proteínas em *K. ivorenses*?

**H3:** A hipótese é a de que sim. As concentrações crescentes desse nutriente no meio induzem a uma maior síntese de proteínas, tendo em vista a afinidade do Si com o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )

estimulando a absorção desse nutriente pelas plantas e, indiretamente, ativando a redutase do nitrato (RN), enzima de conversão do nitrato em compostos orgânicos (proteínas), o que auxilia no crescimento das plantas em condição de estresse pelo MP. Mas por outro lado, acredita-se também que a presença do Si no meio de cultivo, induza não a síntese, mas sim a uma regulação na sinalização celular de proteínas antioxidativas envolvidas na eliminação de radicais livres.

## **1.2. Objetivos:**

### ***1.2.1 Objetivo geral:***

Este estudo tem como finalidade avaliar o papel potencialmente fitorremediador de plantas jovens de *K. ivorenses* cultivadas na presença de cádmio e silício como agente mitigador de estresse em condições controladas de casa de vegetação através de uma análise conjunta do metabolismo fotossintético, bioquímico, anatômico, nutricional e antioxidativo a fim de confirmar se plantas de mogno africano, com potencial caráter fitorremediador, são capazes de manter um crescimento satisfatório, baseado na manutenção da integridade do aparato fotossintético sustentado pelo metabolismo antioxidativo atuante, frente às concentrações de Cd adotadas neste estudo, em que o silício aparece como agente potencializador dos mecanismos de fitoextração e tolerância dessa espécie ao metal.

### ***1.2.2. Objetivos específicos:***

Analisar a toxicidade de concentrações crescentes de Cd ( $\text{CdCl}_2$ ) e a mitigação do estresse por silício na forma de metassilicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) em *K. ivorenses*.

- Nas respostas de crescimento: Por meio da altura, (H): diâmetro caulinar (DC), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), área foliar (AF);
- Na atividade das enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) nos tecidos radiculares e foliares de plantas expostas a níveis tóxicos por Cd e doses crescentes de Si;
- Na concentração de malonaldeído em folhas e raízes de plantas de mogno submetidas às concentrações crescentes de Cd e de Si.

- Nas variáveis ecofisiológicas: por meio das tocas gasosas, condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), concentração de  $CO_2$  interno ( $C_i$ ) e externo, razão entre concentração de  $CO_2$  no ar e na folha ( $C_i/C_a$ ); potencial hídrico ( $\psi_w$ ); fotossíntese líquida ( $A$ ); eficiência no uso da água ( $A/E$ )
- Nos danos provocados pelas altas concentrações de Cd sobre o fotossistema II por meio da observação das características de fluorescência da clorofila  $a$ ,
- Avaliar o potencial fitorremediador do cádmio em mogno africano com base em fator de biodisponibilidade (FB) e translocação (FT) de cádmio, bem como, no índice de tolerância (IT) ao MP.
- Através das alterações na anatomia do vegetal nos diversos órgãos das plantas (folhas e raízes), daquelas submetidas às concentrações de Cd, e avaliar a mitigação do estresse por silício nesses órgãos;
- Na anatomia radicular com o objetivo de verificar se as estrias de Caspary apresentam alterações decorrentes da deposição de silício, a ponto de constituírem barreira mecânica ao influxo de cádmio. Em adição, analisar as alterações causadas por Cd na espessura dos tecidos foliares e radiculares e às modulações benéficas do Si sobre essas variáveis.

### 1.3. Referências

ABHILASH, P. C., POWELL, J. R., SINGH, H. B., & SINGH, B. K. Plant–microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies. **Trends in biotechnology**, v.30, n.8, p.416-420, 2012

ADREES, M., ALI, S., RIZWAN, M., ZIA-UR-REHMAN, M., IBRAHIM, M., ABBAS, F., & IRSHAD, M. K. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.119, p.186-197, 2015.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Cercla prioritylistofhazardoussubstances. Atlanta, 2011. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>>. Acesso em: 2 fevereiro. 2018.

Agronoticias América Latina y el Caribe. Investigan La contaminación por cadmio y arsénico en la producción de soja em Argentina, 2013. (For more information: Latin American and Caribbean Agronews: Cadmium and arsenic contamination in Argentine soybean was investigated). Disponível em:< <http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/c/209282/>> Acesso em: 15 dezembro. 2017.

AHMAD, P., SARWAT, M., BHAT, N. A., WANI, M. R., KAZI, A. G., & TRAN, L. S. P. Alleviation of cadmium toxicity in *Brassica juncea* L.(Czern. & Coss.) by calcium application involves various physiological and biochemical strategies. **PloS one**, v.10, n.1, p.0114571, 2015.

ALI, S., BHARWANA, S. A., RIZWAN, M., FARID, M., KANWAL, S., ALI, Q., & KHAN, M. D. Fulvic acid mediates chromium (Cr) tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) through lowering of Cr uptake and improved antioxidant defense system. **Environmental science and pollution research**, v.22,n.14,p.10601-10609, 2015.

ALI, H., KHAN, E., SAJAD, M.A.. Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, p.869–881, 2013.

ANJUM, S. A., TANVEER, M., HUSSAIN, S., SHAHZAD, B., ASHRAF, U., FAHAD, S., & BAJWA, A. A. Osmoregulation and antioxidant production in maize under combined cadmium and arsenic stress. **Environ Science and Pollution Reserch**. v. 23 p. 11864–11875, 2016.

ARTIUSHENKO, T., SYSHCHYKOV, D., GRYSHKO, V., ČIAMPOROVÁ, M., FIALA, R., REPKA, V., & PAVLOVKIN, J. Metal uptake, antioxidant status and membrane potential in maize roots exposed to cadmium and nickel. **Biologia**, v.69, n.9, p.1142-1147, 2014.

AURANGZEB, N., NISA, S., BIBI, Y., JAVED, F., & HUSSAIN, F. Phytoremediation potential of aquatic herbs from steel foundry effluent. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.31, n.4, p.881-886, 2014.

BHARGAVA, A., CARMONA, F. F., BHARGAVA, M., & SRIVASTAVA, S. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Journal of Environmental Management**, v.105, p.103-120, 2012.

BIELLEN, A., REMANS, T., VANGRONSVELD, J., & CUYPERS, A. The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14 n.3, p. 6382-6413, 2013.

BOKHARI, S. H., AHMAD, I., MAHMOOD-UL-HASSAN, M., & MOHAMMAD, A. Phytoremediation potential of *Lemna minor* L. for heavy metals. **International journal of phytoremediation**, v.18,n.1, p.25-32, 2016.

BOLAN, N., KUNHIKRISHNAN, A., THANGARAJAN, R., KUMPIENE, J., PARK, J., MAKINO, T., & SCHECKEL, K. Remediation of heavy metal (loid) s contaminated soils—to mobilize or to immobilize?. **Journal of Hazardous Materials**, v.266, p.141-166, 2014.

BOWLER C, VANMONTAGU M, INZÉ D. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Review of **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 43:83-116, 1992.

BRASIL. Ministério do meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – Resolução nº420 de 28 de Dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de Dezembro. 2009.

CAPPA, J. J., & PILON-SMITS, E. A. Evolutionary aspects of elemental hyperaccumulation. **Planta**, v.239, n.2, p.267-275, 2014.

CARNEIRO, J. M., CHACÓN-MADRID, K., GALAZZI, R. M., CAMPOS, B. K., ARRUDA, S. C., AZEVEDO, R. A., & ARRUDA, M. A. Evaluation of silicon influence on the mitigation of cadmium-stress in the development of *Arabidopsis thaliana* through total metal content, proteomic and enzymatic approaches. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.44, p.50-58, 2017.

CHMIELOWSKA-BAK, J., GZYL, J., RUCIŃSKA-SOBKOWIAK, R., ARASIMOWICZ-JELONEK, M., & DECKERT, J. The new insights into cadmium sensing. **Frontiers in plant science**, v.5, p.245. 2014.

CHOPPALA, G., SAIFULLAH, BOLAN, N., BIBI, S., IQBAL, M., RENGEL, Z., & OK, Y. S. Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. **Critical reviews in plant sciences**, v.33 n.5,p. 374-391, 2014.

CLEMENS, S., AARTS, M., THOMINE VERBRUGGEN, N. The key to preventing slow cadmium poisoning. **Trends Plant science**, v.18, p.92-99, 2013.

DAUD, M.K.; ALI, S.; VARIATH, M.T.; ZHU, S.J. Differential physiological, ultramorphological and metabolic responses of cotton cultivars under cadmium stress. **Chemosphere**, v.93, n.10, p.2593-2602, 2013.

DIAS, M.C.; MONTEIRO, C.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; CORREIA, C.; GONÇALVES, B.; SANTOS, C. Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, n.4, p.1281-1289, 2013.

DU, Y. L., HE, M. M., XU, M., YAN, Z. G., ZHOU, Y. Y., GUO, G. L., & LI, F. S. Interactive effects between earthworms and maize plants on the accumulation and toxicity of soil cadmium. **Soil Biology and Biochemistry**, v.72, p.193-202, 2014.

EMAMVERDIAN, A., DING, Y., MOKHBERDORAN, F., & XIE, Y. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 18, 2015.

FAN, K.C.; HIS, H.C.; CHEN, C.W.; LEE, H.L.; HSEU, Z.Y. Cadmium accumulation and tolerance of mahogany (*Swietenia macrophylla*) seedlings for phytoextraction applications. **Journal of Environmental Management**, v.92, n.10, p.2818-2822, 2011.

FARID, M., SHAKOOR, M. B., EHSAN, S., ALI, S., ZUBAIR, M., & HANIF, M. S. Morphological, physiological and biochemical responses of different plant species to Cd stress. **Int J Chem Biochem Sci**, v. 3, p. 53-60, 2013.

FAROOQ, M.A.; ALI, S.; HAMEED, A.; MAHMOOD, K.; IQBAL, Z. Alleviation of cadmium toxicity by silicon is related to elevated photosynthesis, antioxidante enzymes; suppressed cadmium uptake and oxidative stress in cotton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.96, p.242-249, 2013.

FASAHAT, P. Recent progress in understanding cadmium toxicity and tolerance in rice. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.27, n.1,p. 94, 2015.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.1637-1661, 2012.

FROHNE, T., DIAZ-BONE, R.A., DU LAING, G., RINKLEBE, J. Impact of systematic change of redox potential on the leaching of Ba, Cr, Sr, and V from a riverine soil into water. **Journal Soils Sed.** v.15, p.623–633, 2015.

GALLEGO, S.M., PENA, L.B., BARCIA, R.A., AZPILICUETA, C.E., LANNONE, M.F., ROSALES, E.P., ZAWOZNIK, M.S., GROPPA, M.D., BENAVIDES, M.P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**. v.83, p.33–46, 2012.

GAUTAM S, ANJANI K AND SRIVASTAVA N. In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.22, n.1, p.121-129, 2016.

GUERRA, F.; TREVIZAN, A. R.; MURAOKA, T.; MARCANTE, N.C.; CANNIATTI-BRAZACAS, S. G. Heavy metals in vegetables and potential risk for human health. **Scientia Agricola**, v.69, n.1, p.54-60, 2012.

GILL, S. S., & TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v.48, n.12, p. 909-930, 2010.

HUSSAIN, I., ASHRAF, M. A., RASHEED, R., ASGHAR, A., SAJID, M. A., & IQBAL, M. Exogenous application of silicon at the boot stage decreases accumulation of cadmium in wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. **Brazilian Journal of Botany**, v.38, n.2, p.223-234, 2015.

IVANOV YV, KARTASHOV AV, IVANOVA AI, SAVOCHKIN YV AND KUZNETSOV VV. Effects of zinc on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings grown in hydroculture. *Plant Physiol Biochem*, v. 102, p.1-9, 2016.

KHAN, M. D., MEI, L., ALI, B., CHEN, Y., CHENG, X., & ZHU, S. J. Cadmium-induced upregulation of lipid peroxidation and reactive oxygen species caused physiological, biochemical, and ultrastructural changes in upland cotton seedlings. **BioMed research international**, v.2013, 2013.

KHAN, M.U.; MALIK, R.N.; MUHAMMAD, S. Human health risk from Heavy metal via food crops consumption with wastewater irrigation practices in Pakistan. **Chemosphere**, v.93, n.10, p.2230-2238, 2013.

KRÄMER, U. Metal hyperaccumulation in plants. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 517-534, 2010.

KÜPPER, H & ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metallomics**, v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016.

LI, N., LI, R., FENG, J., ZHANG, Z., & SHEN, F. Remediation effects of heavy metals contaminated farmland using fly ash based on bioavailability test. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v.31, n.16, p.213-219, 2015.

LI, J. T., LIAO, B., LAN, C. Y., YE, Z. H., BAKER, A. J. M., & SHU, W. S. Cadmium tolerance and accumulation in cultivars of a high-biomass tropical tree (*Averrhoa carambola*) and its potential for phytoextraction. **Journal of environmental quality**, v.39, n.4, p.1262-1268, 2010.

LIMA, F. D. S., ACCIOLY, A. D. A., do NASCIMENTO, C. W. A., & CUNHA FILHO, F. F. Bioconcentração de chumbo e micronutrientes em hortaliças cultivadas em solo contaminado. **Ciência. Agrônômica**, v. 44, n. 2, p.234-241, 2013.

LYSENKO, E. A., KLAUS, A. A., PSYBYTKO, N. L., & KUSNETSOV, V. V. Cadmium accumulation in chloroplasts and its impact on chloroplastic processes in barley and maize. **Photosynthesis research**, v.125, n.1-2, p.291-303, 2015.

MAHAR, A., PING, W. A. N. G., RONGHUA, L. I., & ZHANG, Z. Immobilization of lead and cadmium in contaminated soil using amendments: a review. **Pedosphere**, v.25, n.4,p.555-568, 2015.

\_\_\_\_\_,WANG, P., ALI, A., AWASTHI, M. K., LAHORI, A. H., WANG, Q., & ZHANG, Z. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.126, p.111-121, 2016.

MARQUES, M., CHAFIM AGUIAR, C. R., & SOARES DA SILVA, J. J. L. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v.35, n.1, p.2011, 2011.

MATHUR S, KALAJIHMAND JAJOO A. Investigation of deleterious effects of chromium phytotoxicity and photosynthesis in wheat plant. **Photosynthetica**, v.54, p.1-9, 2016.

MATRASZEK R, HAWRYLAK-NOWAK B, CHWIL S, CHWIL M. Macroelemental composition of cadmium stressed lettuce plants grown under conditions of intensive Sulphur nutrition. **Journal of environmental management**,v.180, p.24–34, 2016.

MAYOR, D.J., GRAY, N.B., ELVER-EVANS, J., MIDWOOD, A.J., THORNTON, B. Metal-macrofauna interactions determine microbial community structure and function in copper contaminated sediments. **PLoS One** v.8,n.5, p.64940, 2013.

NAEEM, A., SAIFULLAH, REHMAN, M. Z. U., AKHTAR, T., OK, Y. S., & RENGEL, Z. GENETIC variation in cadmium accumulation and tolerance among wheat cultivars at the seedling stage. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.47, n.5, p.554-562, 2016.

NANDA, R., & AGRAWAL, V. Elucidation of zinc and copper induced oxidative stress, DNA damage and activation of defence system during seed germination in *Cassia angustifolia* Vahl. **Environmental and Experimental Botany**, v.125, p. 31-41, 2016.

NIKOLIC, N., BORIŠEV, M., PAJEVIĆ, S., ŽUPUNSKI, M.,TOPIĆ, M.,ARSENOV, D. Responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants to cadmium toxicity in relation to magnesium nutrition. **Acta Botanica Croatica**, v. 73, n.2, p.359-373, 2014.

PADMAVATHIAMMA, P.K.; LI, L.Y. Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. **Water air soil pollution**, v.184, n.1-4, p.105-126, 2007.

PEREIRA, A. S., CORTEZ, P. A., DE ALMEIDA, A. A. F., PRASAD, M. N. V., FRANÇA, M. G. C., DA CUNHA, M., & MANGABEIRA, P. A. O. Morphology, ultrastructure, and element uptake in *Calophyllum brasiliense* Cambess.(*Calophyllaceae* J. Agardh) seedlings under cadmium exposure. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.18, p.15576-15588, 2017.

REHMAN, M. Z. U., RIZWAN, M., GHAFOR, A., NAEEM, A., ALI, S., SABIR, M., & QAYYUM, M. F. Effect of inorganic amendments for in situ stabilization of cadmium in contaminated soils and its phyto-availability to wheat and rice under rotation. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, n.21, p.16897-16906, 2015.

RIZWAN, M., ALI, S., QAYYUM, M. F., IBRAHIM, M., ZIA-UR-REHMAN, M., ABBAS, T., & OK, Y. S. Mechanisms of biochar-mediated alleviation of toxicity of trace elements in plants: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, n.3, p.2230-2248, 2016.

\_\_\_\_\_, MEUNIER, J. D., DAVIDIAN, J. C., POKROVSKY, O. S., BOVET, N., & KELLER, C. Silicon alleviates Cd stress of wheat seedlings (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio) grown in hydroponics. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23,n.2, p.1414-1427, 2016.

ROY M AND MCDONALD LM. Metal uptake in plants and health risk assessments in metal-contaminated smelter soils, **Land degradation & development** v.26, p.785-792, 2015.

RUI, H., CHEN, C., ZHANG, X., SHEN, Z., & ZHANG, F. Cd-induced oxidative stress and lignification in the roots of two *Vicia sativa* L. varieties with different Cd tolerances. **Journal of hazardous materials**, v.301, p. 304-313, 2016.

SABEEN, M., MAHMOOD, Q., IRSHAD, M., FAREED, I., KHAN, A., ULLAH, F., & TABASSUM, S. Cadmium phytoremediation by *Arundo donax* L. from contaminated soil and water. **BioMed research international**, v.2013, p. 9, 2013.

TAUQEER, H. M., ALI, S., RIZWAN, M., ALI, Q., SAEED, R., IFTIKHAR, U., & ABBASI, G. H. Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: growth and physiological response. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.126, p. 138-146, 2016.

TIRADO, R., & ALLSOPP, M. Phosphorus in agriculture: problems and solutions. **Greenpeace Research Laboratories Technical Report** (Review), v.2, 2012.

TRAN, T. A., & POPOVA, L. P. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, n.1, p.1-13, 2013.

TYAGI, R.; RANA, P.; GUPTA, M.; BHATNAGAR, D.; SRIVASTAVA, S.; ROY, R.; KHUSHU, S. <sup>1</sup>H NMR spectroscopic analysis detects metabolic disturbances in rat urine on acute exposure to heavy metal tungsten alloy based metals salt. **Chemico-Biological Interactions**, v.211, p.20-28, 2014.

VACULÍK, M., KONLECHNER, C., LANGER, I., ADLASSNIG, W., PUSCHENREITER, M., LUX, A., & HAUSER, M. T. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. **Environmental Pollution**, Barking, v. 163, p. 117-126, 2012.

VIEIRA, L. R., CORRÊA, E. S., MORAES, B. S., ROSSATO, M. V., & VESTENA, S. Cadmium toxicity in plants. *Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)*, v.19, n.2, p.1574-1588, 2015.

WANG, A., WANG, M., LIAO, Q., & HE, X. Characterization of Cd translocation and accumulation in 19 maize cultivars grown on Cd-contaminated soil: implication of maize cultivar selection for minimal risk to human health and for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, v.23, n.6, p.5410-5419, 2016.

WANG, Q., ZHANG, J., ZHAO, B., XIN, X., ZHANG, C., & ZHANG, H. The influence of long-term fertilization on cadmium (Cd) accumulation in soil and its uptake by crops. *Environmental Science and Pollution Research*, v.21 n.17, p.10377-10385, 2014.

WU, J., GEILFUS, C. M., PITANN, B., & MÜHLING, K. H. Silicon-enhanced oxalate exudation contributes to alleviation of cadmium toxicity in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, v.131, p.10-18, 2016.

XIAO, R., SUN, X., WANG, J., FENG, J., LI, R., ZHANG, Z., & AMJAD, A. Characteristics and phytotoxicity assay of biochars derived from a Zn-rich antibiotic residue. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v.113, p.575-583, 2015.

XUE, Z.C.; GAO, H.Y.; ZHANG, L.T.; Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate, and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. *Biologia Plantarum*, v.57, n.3, p.587-590, 2013.

YU, H. Y., DING, X., LI, F., WANG, X., ZHANG, S., YI, J., & WANG, Q. The availabilities of arsenic and cadmium in rice paddy fields from a mining area: the role of soil extractable and plant silicon. *Environmental Pollution*, v.215, p.258-265, 2016.

## 2. A FITORREMEDIAÇÃO AO CD POR *Khaya ivorenses* A. chev. COM BASE NOS PARÂMETROS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA, NAS TROCAS GASOSAS E A MODULAÇÃO DO SI NA MITIGAÇÃO DO ESTRESSE.

### Resumo

Dentre os metais pesados (MPs), o cádmio (Cd), apresenta alto risco ecotoxicológico e contribui em larga escala para a degradação dos solos. Um diminuto número de estudos comprova o potencial fitorremediador àquele íon tóxico para espécies arbóreas, no entanto, não há correlação com o aspecto nutricional das plantas. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar as respostas fisiológicas, a capacidade de fitoextração e a tolerância ao Cd em mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) e correlacioná-las às modulações do silício (Si), um micronutriente benéfico, na atenuação do estresse induzido pelo MP, bem como, para a ampliação do caráter fitorremediador da espécie investigada. Para isso, plantas de *K. ivorensis* foram cultivadas em solução nutritiva de Sarruge (1975) e submetidas aos tratamentos de toxidez por Cd e nutricional por Si. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4 com cinco repetições, e os fatores constituídos por níveis crescentes do MP (Cd a 0, 25, 50 e 75 mg L<sup>-1</sup>) e doses de Si (Si a 0, 100, 150 e 300 mg L<sup>-1</sup>). Realizou-se a análise de regressão polinomial, superfície de resposta. O tratamento com Cd 75 mg L<sup>-1</sup>, reduziu drasticamente todos os parâmetros fisiológicos analisados e causou danos fotoinibitórios ao PSII. As variáveis de fotossíntese (*A*), trocas gasosas (*g<sub>s</sub>*), (*C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>*), e da fluorescência da clorofila *a*, o ( $\Phi$ PSII) e o (*qP*), foram as mais afetadas e apresentaram pontos mínimos de 3.2 mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 0,12 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 0,06 μmol CO<sub>2</sub> molar<sup>-1</sup>, 0,05 e 0,07, respectivamente. Os danos foram restaurados pela nutrição silicatada, havendo aumentos graduais nas respostas fisiológicas de plantas estressadas por Cd e submetidas à dose de Si 150 mg L<sup>-1</sup>. O ponto ótimo da interação que induziu em aumentos expressivos nos parâmetros estudados correspondeu à Cd 40 mg L<sup>-1</sup> x Si 165 mg L<sup>-1</sup>, obtendo-se valores das variáveis da fluorescência da clorofila *a*, da fotossíntese líquida e de crescimento similares aos observados no controle. Àquela interação contribuiu, ainda, para a menor translocação de Cd das raízes para as partes aéreas e para o aumento de 68% no índice de tolerância do mogno africano ao íon tóxico. Confirmamos que *K. ivorensis* é fitorremediadora ao Cd, o que é otimizado pela regulação positiva do Si no metabolismo fisiológico e bioquímico das plantas.

**Palavras-chave:** Fitorremediação. *Khaya ivorensis* A. Chev. Cd, Estresse. Silício. Metabolismo fisiológico.

## Abstract

Among heavy metals (PMs), cadmium (Cd) has a high ecotoxicological risk and contributes on a large scale to soil degradation. A small number of studies prove the phytoremediation potential of that toxic ion for tree species, however, there is no correlation with the nutritional aspect of plants. This research aims to evaluate the physiological responses, the phytoextraction capacity and the tolerance to Cd in african mahogany (*Khaya ivorensis* A. Chev) and correlate them to the modulations of silicon (Si), a beneficial micronutrient, in the attenuation of induced stress by the MP, as well as for the expansion of the phytoremediation character of the investigated species. For that, *K. ivorensis* plants were grown in a nutritive solution by Sarruge (1975) and submitted to toxicity treatments by Cd and nutritional by Si. The experimental design used was in randomized blocks, in a 4x4 factorial scheme with five replications, and the factors consisting of increasing levels of MP (Cd at 0, 25, 50 and 75 mg L<sup>-1</sup>) and Si doses (Si at 0, 100, 150 and 300 mg L<sup>-1</sup>). Polynomial regression analysis, response surface, was performed. Treatment with Cd 75 mg L<sup>-1</sup>, drastically reduced all the physiological parameters analyzed and caused photoinhibitory damage to the PSII. The variables of photosynthesis (*A*), gas exchange (*g<sub>s</sub>*), (*C<sub>i</sub>* / *C<sub>a</sub>*), and fluorescence of chlorophyll *a*, *o* ( $\Phi$ PSII) and *o* (*qP*), were the most affected and presented minimum points of 3.2 mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 0.12 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and 0.06 μmol CO<sub>2</sub> molar<sup>-1</sup>, 0.05 and 0.07, respectively. The damage was restored by silicate nutrition, with gradual increases in the physiological responses of plants stressed by Cd and subjected to the dose of Si 150 mg L<sup>-1</sup>. The optimal point of the interaction that induced significant increases in the studied parameters corresponded to Cd 40 mg L<sup>-1</sup> x Si 165 mg L<sup>-1</sup>, obtaining values of the chlorophyll *a* fluorescence variables, liquid photosynthesis and growth similar to those observed in control. That interaction also contributed to the lower translocation of Cd from the roots to the aerial parts and to the 68% increase in the tolerance index of african mahogany to the toxic ion. We confirm that *K. ivorensis* is a phytoremediation agent for Cd, which is optimized by the positive regulation of Si in the physiological and biochemical metabolism of plants.

**Keywords:** Phytoremediation. *Khaya ivorensis* A. Chev. Cd. Stress. Silicon. Physiological metabolism.

## 2.1. Introdução

A poluição por metais pesados (MPs) tornou-se nas últimas décadas um dos mais graves problemas ambientais em escala global, em virtude da elevada persistência desses contaminantes na biogeocenose pelo fato de não serem biodegradáveis (FROHNE et al., 2015; ANJUM et al., 2016). O Cd é o MP que apresenta os mais altos índices de acumulação nos solos. Somente no período de 2006-2012 a carga anual do íon descarregada do Rio das Pérolas para o sul da China foi de 43,9 t em que, deste total, cerca de 30.000 t lançadas anualmente no meio ambiente resultam das atividades antropogênicas, sobre tudo, àquelas voltadas à utilização de fertilizantes fosfatados e à mineração (GALLEGO et al., 2012; ZHEN et al. 2016).

Nesse aspecto, a degradação dos solos por Cd, desperta preocupação pela comunidade científica. Esse MP é mais prontamente biodisponível quando comparado à outros íons, o que é resultado de sua alta mobilidade nos solos. Aliado a isso, o íon ocupa a 7ª posição na lista entre as 20 substâncias com maior potencial ecotoxicológico do mundo (ATSDR, 2011; DEDE & OZDEMIR, 2016).

Para o metabolismo vegetal, o Cd, é altamente reativo e pode desencadear distúrbios celulares em muitas vias (EMAMVERDIAN et al., 2015). Os cloroplastos são um dos maiores sítios de ação dos estresses abióticos, em que se inclui a toxicidade por Cd (CHOPALLA et al., 2014; ANJUM et al., 2016). Os alvos do metal nesse compartimento celular são as enzimas envolvidas no processo de fixação do CO<sub>2</sub>, essencial à fotossíntese: a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/Oxigenase (RuBisCo), no ciclo de Calvin (CHOPALLA et al., 2014; RIZWAN et al. 2016; RAHMAN et al., 2017).

A atividade fotossintética é inibida pelo Cd, por reduzir a atividade do fotossistema II, que eventualmente suprime a produção quântica e o transporte de elétrons (CHOPALLA et al., 2014; LUO et al., 2016). No plano celular e molecular, a toxicidade pelo MP resulta em alterações de diferentes processos bioquímicos com repercussões fisiológicas negativas, incluindo a redução do potencial osmótico, com implicações sobre os parâmetros de trocas gasosas, resultando em decréscimo no crescimento e na produção de biomassa vegetal (CHOPALLA et al., 2014; RUI et al., 2016; TAUQEER et al., 2016; PEREIRA et al., 2017; RAHMAN et al., 2017).

Na fitorremediação, plantas tolerantes a MPs, hiperacumuladoras, têm a habilidade de crescerem ambientes contaminados sem, no entanto, desenvolver sintomas de toxicidade, utilizando mecanismos que consistem na remoção (fitoextração e fitovolatilização) ou

contenção (fitoimobilização e fitoestabilização) de MPs (ALI et al., 2013; PARROTTA et al., 2015). A compreensão desses mecanismos tem sido objeto de estudo para a despoluição dessas áreas.

Do total de espécies identificadas como hiperacumuladoras, até o presente momento, apenas algumas arbóreas como o álamo (*Populus nigra*), pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e o salgueiro (*Salix humboldtiana*) podem concentrar altos níveis de Cd em seus tecidos (ABHILASH et al., 2012; HE, 2015; Li et al., 2015). E em função disso, muitas espécies de árvores tropicais para fitorremediação de solos contaminados com Cd foram investigadas. Por exemplo. Fan et al., (2011), atribuíram ao mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla*) um caráter potencialmente fitorremediador devido apresentar satisfatório crescimento em condições simuladas de contaminação por Cd equivalentes a 2,5 (7,5 mg kg<sup>-1</sup>) e 5 (15 mg kg<sup>-1</sup>) vezes o valor de intervenção (VI) segundo orientações do CONAMA (BRASIL, 2009).

No entanto, até então, o diminuto número de estudos esclarecedores das estratégias fitorremediadoras e mecanismos de tolerância ao Cd implementadas por plantas de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev), uma espécie arbórea pertence à família Meliaceae fornecedora de uma das madeiras tropicais mais importantes e amplamente comercializados no mundo (DEGEN et al., 2013).

Autores como Cui et al.,(2017), apontam o Silício (Si) como um nutriente benéfico atenuador do estresse provocado por Cd. O papel chave desse mineral parece envolver a regulação dos processos de desintoxicação e sequestro do Cd em tecidos menos metabolicamente ativos, entre eles, vacúolos e parede celulares, bem como, sua complexação ao íon tóxico, o que reduz a captação daquele MP nas células vegetais, prevenindo danos metabólicos (MA et al., 2016; CUI et al.,2017; TRIPATHI et al., 2017). Porém, essas pesquisas são restritas à espécies herbáceas.

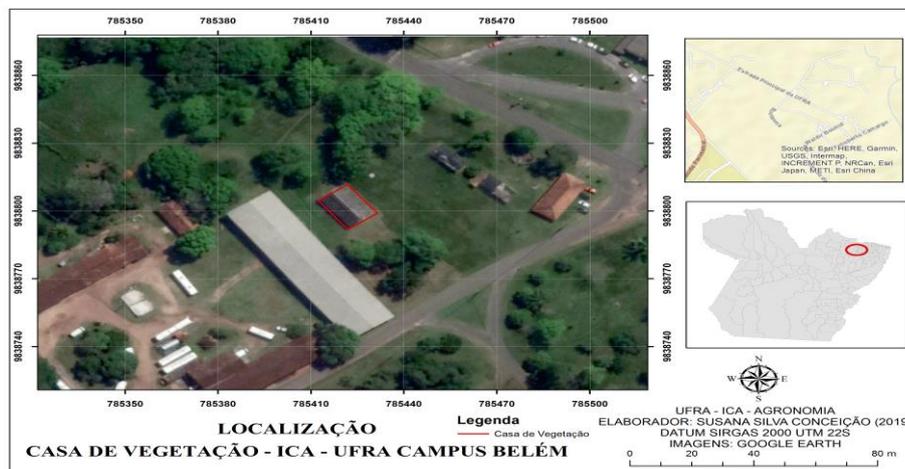
Desse modo, o objetivo dessa pesquisa consiste em elucidar, as estratégias adotadas por *K. ivorensis* que lhes permitam crescer em condições de concentrações de Cd acima do valor de intervenção conforme proposto por BRASIL (2009). Para isso, tomou-se como base os parâmetros fotossintéticos representados pelas trocas gasosas, na eficiência da clorofila *a*, bem como, no teor de pigmentos clorofilianos e variáveis de crescimento. Em adição, buscou-se investigar as modulações do Si no metabolismo fisiológico e bioquímico do mogno africano, que potencialize sua capacidade fitorremediadora ao Cd, tendo em vista a recomendação dessa espécie em áreas com potenciais riscos de contaminação pelo metal visando sua recuperação.

## 2.2. Material e métodos

### 2.2.1. Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi conduzido no período de fevereiro a dezembro de 2017, em casa de vegetação situada à 01°28'03"S; 48°29'18" W (Figura 2.1), sendo as análises bioquímicas e fisiológicas realizadas no Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS), ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). As determinações mineralógicas, elaboradas no laboratório de análises químicas (LAQGoeldi) pertencente ao Museu paraense Emilio Goeldi, campus Belém, Pará, Brasil. O clima local é Af, de acordo com a classificação de Köppen. Durante o período experimental, foram registradas no interior da casa de vegetação médias de temperatura diurna, noturna e da umidade relativa do ar de  $36 \pm 2$  °C,  $34 \pm 2$  °C e  $90 \pm 3\%$  respectivamente.

Figura 2.1. Localização geográfica do sítio experimental da UFRA



Fonte: O autor

No presente trabalho, foi utilizado o genótipo de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev). As mudas foram produzidas no viveiro São Francisco, localizado no município de Ananindeua, Pará a partir de sementes provenientes de três matrizes localizadas na EMBRAPA, Amazônia Oriental, selecionadas para a coleta, árvores que distavam 100 metros entre si, conforme descrito por Brasil (2004).

Mudas com 90 dias de idade (DAS), cultivadas em sacos de polietileno de 20 cm diâmetro x 30 cm de altura e 0,02 mm de espessura, contendo uma mistura de terra preta com esterco bem curtido, na proporção volumétrica de 4 para 1 foram mantidas em casa de vegetação por 30 dias para aclimação e, neste período, realizadas regas diárias mantendo-se

a capacidade de campo do solo. Pelo método gravimétrico, foi obtido o volume de água no interior de cada recipiente, conforme descrito por (KLAR et al., 1966).

### **2.2.2. Solução nutritiva**

Aos 120 dias após a semeadura (DAS), plantas de mogno, medindo aproximadamente 60cm de altura, foram transferidas para vasos de Leonard com capacidade de 5 L, contendo 4,5L de solução nutritiva de Sarruge (1975) constituída por N 120 mg L<sup>-1</sup>; P 31 mg L<sup>-1</sup>; K 234 mg L<sup>-1</sup>; Ca 200 mg L<sup>-1</sup>; Mg 48 mg L<sup>-1</sup>; S 64 mg L<sup>-1</sup>; B 0,5 mg L<sup>-1</sup>; Cu 0,02 mg L<sup>-1</sup>; Fe 5,0 mg L<sup>-1</sup>; Mn 0,5 mg L<sup>-1</sup>; Zn 0,05 mg L<sup>-1</sup> e Mo 0,01 mg L<sup>-1</sup> com ¼ de força iônica. A solução nutritiva foi trocada a cada sete dias ou quando a condutividade elétrica atingiu 70% do seu valor inicial. O pH da solução foi verificado diariamente e mantido em 5,8 ± 0,2. As plantas permaneceram sob essas condições por 60 dias. Após esse período, a solução nutritiva foi modificada para 65% da sua concentração original, e as plantas mantidas sob esse tratamento por mais 60 dias para aclimatação e desenvolvimento das raízes.

### **2.2.3. Tratamentos com concentrações de cádmio e de silício**

Aos 240 DAS, as plantas foram submetidas aos tratamentos de toxidez por metal pesado (MP) e nutricional que consistiram, respectivamente, em concentrações crescentes de cádmio (0; 25; 50 e 75 mg L<sup>-1</sup> Cd), usando como fonte o cloreto de cádmio (CdCl<sub>2</sub>. 2,5H<sub>2</sub>O) (Sigma Aldrich) e, para isso, tomou-se como base a Resolução 420 do Conselho Nacional de Meio Ambiente-CONAMA, Brasil, (2009), e concentrações de silício (Si) (0; 100; 150 e 300 mg L<sup>-1</sup>Si) na forma de metassilicato de sódio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>). As concentrações do MP e do nutriente foram adicionadas aos vasos contendo solução nutritiva e, cada uma delas correspondeu a um tratamento e, cada um deles, foi composto de cinco repetições. As plantas foram mantidas por 60 dias sob exposição ao Cd e às dosagens de Si.

### **2.2.4. Potencial hídrico foliar, curva diurna, trocas gasosas**

O potencial hídrico foliar ( $\Delta p_d$ ) foi determinado no período da manhã entre 04:30h e 05:30 h, mediante uma bomba de pressão tipo Scholander, (Modelo 670; PMS Instrument Co., Albany, OR, EUA) conforme descrito por Pinheiro et al., (2008). Como amostra, o primeiro par de folhas completamente expandido a partir do ápice foi selecionado de cada uma das repetições. Curvas diurnas (Figura 2.5) foram realizadas antes do início das análises de trocas gasosas e ocorreu ao longo de um dia, no intervalo entre 7 às 16h. Para isso, usou-se a concentração de CO<sub>2</sub> igual 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  conforme a metodologia descrita por

Blomm et al., (1980), com modificações. As medidas de trocas gasosas foram realizadas durante cinco dias, em que o último dia coincidiu com a retirada do experimento e ocorreu no intervalo entre 09:00 e 11:00 h, período que favorece taxas de fotossíntese ( $A$ ) máximas e quase constantes para as plantas controle conforme definido pela curva diurna de trocas gasosas foliar. O primeiro par de folhas completamente expandido (folha+1) foi selecionado de todas as repetições de cada tratamento usando-se um bloco de plantas por vez escolhido ao acaso. Para tanto, foi utilizado um medidor de fotossíntese, modelo LI- 6400XT da LI-COR, Inc. Lincoln, EUA acoplado com um fluorômetro portátil de luz de frequência modulado e câmara foliar 2 x 3 cm (Li6400-40) em concentração de  $\text{CO}_2$  de  $400 \mu\text{mol}^{-1}$  com fonte de luz artificial de fluxo de  $1000 \mu\text{mol} \text{ fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Determinou-se: a taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ) ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $C_i$ ) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ molar}^{-1}$ ). A eficiência instantânea do uso da água ( $A/E$ ) foi obtida por meio da razão entre a taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) e a taxa de transpiração ( $E$ ) e utilizado como parâmetro fisiológico que expressou quantitativamente o comportamento momentâneo das trocas gasosas.

#### **2.2.5. Teor de pigmentos fotossintéticos**

A partir do segundo par de folhas totalmente expandidas, foram retiradas amostras para a determinação da concentração de clorofila ( $Chl a$ ), clorofila b ( $Chl b$ ) e carotenóides ( $Car$ ), conforme descrito por ARNON (1949). Os extratos obtidos foram submetidos à leitura das absorbâncias por meio de espectrofotômetro nos comprimentos de onda 663, 537 e 652 nm para as clorofilas  $a$ ,  $b$  e total, respectivamente, e 470 nm para os carotenóides. Para os cálculos dos teores dos pigmentos fotossintéticos, foram utilizadas as equações descritas por Lichtenthaler (1987) e os resultados expressos em  $\text{mg g}^{-1}$ .

#### **2.2.6. Fluorescência da clorofila a**

As avaliações da fluorescência da clorofila  $a$  ocorreram logo após as medições de trocas gasosas utilizando-se as mesmas folhas em que foram mensuradas àquelas variáveis fisiológicas. Para tanto, foi usado um fluorômetro modelo (IG 6400 40; LI-COR Inc., Lincoln, EUA). As análises seguiram a metodologia proposta por Bilger et al., (1995) e Rascher et al., (2000) com modificações. Inicialmente, as folhas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos e, após este período, os tecidos foliares foram expostos a um pulso fraco de luz vermelha ( $0,03 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) obtendo a fluorescência inicial ( $F_0$ ). Seguiu-se a aplicação de um pulso de 0,8s de luz actínia saturante ( $>6000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e determinada a fluorescência máxima

(Fm). A fluorescência variável (Fv) foi expressa por meio da diferença entre Fm e F0. Com estes dados, estimou-se o rendimento quântico potencial do fotossistema II (PSII) mediante a equação  $Fv/Fm = (Fm-F0)/Fm$ . O rendimento quântico efetivo do PSII foi determinado conforme descrito por Genty et al., (1989) por meio da sobreposição de um pulso de saturação em folhas previamente adaptadas à luz ambiente, sendo calculado como:  $FSII [\Delta F/Fm' = (Fm'-Fs)/Fm']$ , em que Fs é o rendimento da fluorescência máxima durante o pulso de saturação. O  $\Delta F/Fm'$  foi empregado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de acordo com Bilger et al., (1995), por meio da equação  $[ETR = (\Delta F/Fm' \times DFF \times 0,5 \times 0,84)]$  onde: DFF é a densidade de fluxo de fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) incidente sobre a folha; 0,5 é o valor correspondente à fração da energia de excitação distribuída para o FSII Laisk e Loreto, (1996) e 0,84 é o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (EHLEINGER, 1981). O coeficiente de dissipação fotoquímica qP e coeficiente de extinção não fotoquímica NPQ de Stern-Volmer foi calculado segundo descrito por Bilger & Bjorkman, (1990). O Fm, F0 e Fv representam a fluorescência máxima, mínima e variável, respectivamente, após adaptação das folhas ao escuro, e aquelas de Fm', Fo' e Fs representam a fluorescência máxima, mínima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz, respectivamente.

### ***2.2.7. Análise biométrica e Coleta do material***

A coleta das plantas ocorreu aos 300 DAS às 05:30h e, nesse momento, mensuradas as variáveis biométricas: altura da planta (H) e comprimento radicular (CR), obtidas com o auxílio de régua centimétrica, o diâmetro do caule (DC) por meio de paquímetro digital modelo ZAAS precision; e a área foliar (AF), mensurada em scanner por meio da análise de imagens, utilizando software ImageJ. O número de folhas (NF), expresso por contagem manual, sendo estabelecido como critério para a quantificação àquelas com tamanho mínimo de 5cm de comprimento. Amostras de raízes, caules e folhas de cada tratamento, foram reservadas separadamente em sacos de papel e levadas a estufa de ventilação de ar forçada, mantendo-se a temperatura de 65°C por 72h até atingirem a massa constante. O material seco foi pesado e moído em moinho tipo Wiley equipado com peneira de 0,038mm, até a obtenção de um pó fino e, devidamente armazenado em tubos de falcon, até a sua utilização nos ensaios para a determinação das concentrações de cádmio e de silício.

### **2.2.8. Análise de cádmio**

A análise de cádmio foi processada em triplicata segundo a metodologia descrita por Miyazawa et al., (2009), com modificações. A matéria seca (0,5 g) de cada amostra foi digerida em um tubo digestor com 8 mL de solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) + ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) (3: 1). Após o resfriamento, a solução no tubo foi filtrada diluída com água desionizada até um volume final de 50 mL. O conteúdo de cádmio foi determinado nesta solução por espectrometria de absorção atômica (Thermo Scientific ICE 3000).

#### **2.2.8.1. Fator de bioacumulação e fator de translocação de Cd nas plantas**

Em plantas mantidas sob estresse por metal pesado, foram determinados os fatores de bioacumulação (FB) e de translocação (FT) de Cd conforme a metodologia descrita por Zhang et al, (2014), com modificações. Para isso, tomou-se como base as concentrações do metal pesado encontradas na planta em relação àquelas presentes na solução e determinado o (FB). Por meio da correlação entre a concentração do mineral na parte aérea pela concentração de Cd encontrada nas raízes foi estimado o (FT), conforme descrito nas equações 1e 2 abaixo. Os resultados foram expressos nas equações em mg L<sup>-1</sup> e mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### **Equação 1:**

$$FB = \frac{[Cd] \text{ na planta}}{[Cd] \text{ na solução}}$$

#### **Equação 2:**

$$FT = \frac{[Cd] \text{ na parte aérea}}{[Cd] \text{ na raiz}}$$

#### **2.2.8.2. Índice de tolerância (IT) para Cd**

O índice de tolerância (IT) ao Cd foi determinado segundo o método descrito por Wilkins (1978). O cálculo foi obtido por meio da correlação entre a concentração do metal pesado encontrado na matéria seca dos diferentes tecidos do vegetal de plantas cultivadas em solução com Cd, pela matéria seca de plantas cultivadas na ausência do microelemento (plantas controle), conforme descrito na equação 3. Os valores de IT podem variar de 0 a 1, indicando a máxima sensibilidade e máxima tolerância, respectivamente. Os resultados foram estimados em mg kg<sup>-1</sup> Cd.

### Equação 3

$$IT = \frac{(\text{massa seca da planta na solução com Cd})}{(\text{massa seca da planta controle})} \times 100$$

#### 2.2.9. Análise da concentração de Silício (Si)

A determinação da concentração de silício (Si) em folhas, caules e raízes ocorreu pelo método da digestão úmida conforme descrito por Kraska e Breitenbeck (2010). Para tanto, foram pesadas 0,1g da amostra do tecido vegetal seco e adicionado 2mL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 30% e acrescentados 0,1M de hidróxido de sódio (NaOH) com a reação induzida em estufa à 95°C, durante quatro horas. Após esse período, foram adicionados 5mM de fluoreto de amônio (NH<sub>4</sub>F) para facilitar a formação de ácido monossilícico. Os níveis de Si foram obtidos em espectrofotômetro com leitura de absorvância à 630nm, pelo método de colorimetria azul de molibdênio, segundo descrito por Hallmark et al., (1982). Cada extrato e suas repetições foram dosados em triplicata, sendo os resultados expressos em mg L<sup>-1</sup>.

#### 2.2.10. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x4 com cinco repetições, sendo os fatores constituídos por níveis crescentes do metal pesado (Cd a 0, 25, 50 e 75 mgL<sup>-1</sup>) e doses de silício (Si a 0, 100, 150 e 300 mgL<sup>-1</sup>). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o aplicativo “Statistical Analysis System” (SAS INSTITUTE, 2000) e o modelo da equação de regressão  $Y(X_1, X_2) = B_0 + B_1X_1 + B_2X_1^2 + B_3X_2 + B_4X_2^2 + B_5X_1 \cdot X_2$  foi gerado pelo procedimento PROC Rs reg. Realizou-se o teste F e para os casos de significância ( $p < 0,05$ ) da interação entre as concentrações de Cd e doses de silício e determinada a correlação. Efetuou-se a análise de regressão polinomial (superfície de resposta). Os gráficos foram gerados pelo programa SCILAB 5.5.0.

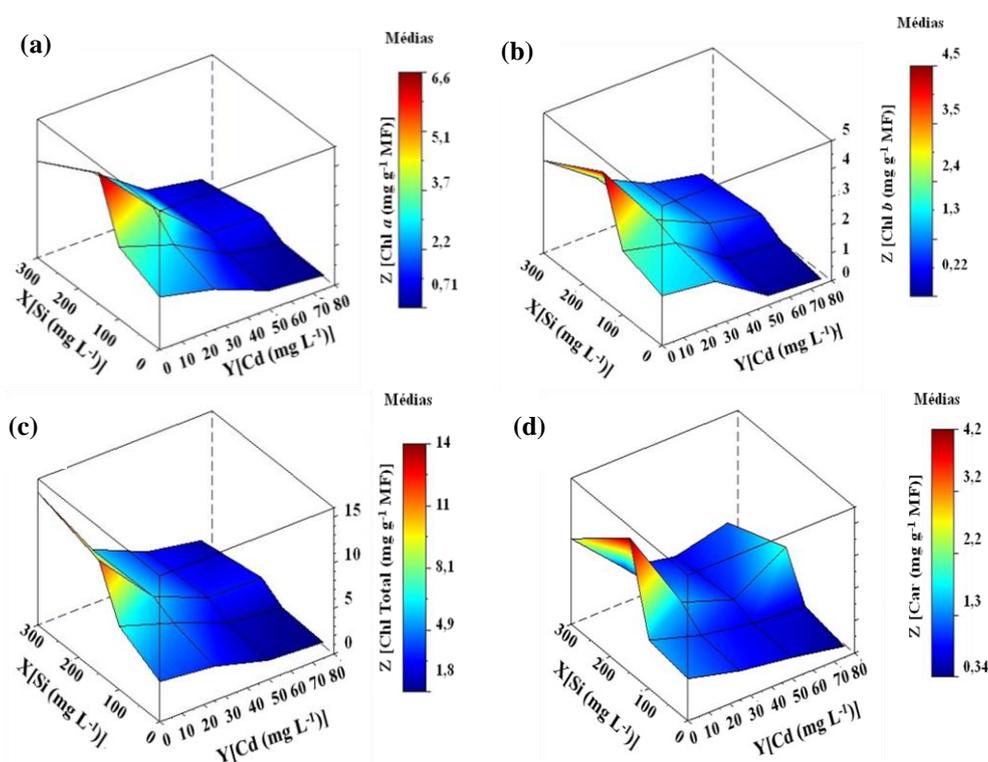
### 2.3. Resultados

#### 2.3.1. Teor de Pigmentos fotossintéticos

A análise bivariada da regressão comprova que houve redução significativa ( $p < 0,01$ ) no teor de pigmentos fotossintéticos em mudas de *Khaya ivorensis* submetidas às

concentrações Cd 50 mg L<sup>-1</sup> e Cd 75 mg L<sup>-1</sup> e aumentos graduais nessas variáveis no momento em que os níveis de silício foram elevados no meio de cultivo (Figura 2.2).

Figura 2.2. Alterações no teor de clorofilas: (Chl<sub>a</sub>; a), (Chl<sub>b</sub>; b); clorofila total (c) e carotenóides (d); nas folhas de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{Chl a} = 3.012^{**} - 0,0645Y^{**} + 0,01812X^{**} + 0,00041Y^2 - 0,000105XY^{**} - 0,000033X^2 (R^2 = 0,86)$$

$$Z_{Chl b} = 2.085^{**} - 0,0493Y^{**} + 0,011075X^{**} + 0,00031Y^2 - 0,00005XY^{**} - 0,000020411X^2 (R^2 = 0,83)$$

$$Z_{Chl Total} = 5.063^{**} - 0,136845Y^{**} + 0,0395X^{**} + 0,001332Y^2 - 0,00042XY^{**} - 0,000034413X^2 (R^2 = 0,87)$$

$$Z_{Car} = 1.53^{**} - 0,054325Y^{**} + 0,011X^{**} + 0,00055Y^2 - 0,0000301XY^{NS} - 0,0000227X^2 (R^2 = 0,72)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  e <sup>NS</sup>  $p > 0,05$ ).

A clorofila *b* e os carotenoides, (Figura 2.2 b,d), foram os mais afetados pela concentração de Cd 75 mg L<sup>-1</sup>. Sob efeito desse tratamento, exibiram pontos mínimos equivalentes de 0,19 mg g<sup>-1</sup>, o que foi 95% inferior àquele observado no controle. A clorofila *a* (Figura 2.2 a), foi ligeiramente sensível a dose de Cd 25 mg L<sup>-1</sup> ocorrendo diminuição de 6% no teor do pigmento o que, no entanto, não implicou no surgimento de manchas cloróticas.

Pela interação significativa ( $p < 0,01$ ) entre os fatores concentrações de Cd e dosagens de Si, houve incrementos nos teores dos pigmentos fotossintéticos na medida em que a

concentração de Si foi aumentada na solução até a dose de Si a 150 mg L<sup>-1</sup>, indicando que o nutriente reverteu a toxicidade do metal.

A análise canônica da combinação entre as concentrações (Cd 41 mg L<sup>-1</sup> X Si 145 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 33 mg L<sup>-1</sup> X Si 155 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 41 mg L<sup>-1</sup> X Si 142 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 30 mg L<sup>-1</sup> X Si 160 mg L<sup>-1</sup>) resultou nos pontos ótimos e respectivos para o teor de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides. Essas interações, promoveram a máxima expressão dos pigmentos com incrementos concomitantes de 80%, 90%, 77% e 89%, em relação aos das plantas tratadas com Cd 75 mg L<sup>-1</sup> (Figura 2.2).

### 2.3.2. *Fluorescência da clorofila a.*

Pela análise de superfície de resposta, fica evidente que a concentração de Cd 25 mg L<sup>-1</sup> não afetou de maneira significativa ( $p > 0,05$ ) as variáveis da fluorescência da clorofila *a* (Figura 2.3). Plantas de *K. ivorensis* mantidas sob a concentração de Cd 25mg L<sup>-1</sup>, exibiram valores respectivos do rendimento quântico potencial (Fv/Fm) e efetivo ( $\Phi$ PSII), do fotossistema II, e do coeficiente de dissipação fotoquímica (qP) de, 0,79 e 0,40 e 0,45, similares àquelas cultivadas na ausência de Cd e na presença de Si 100 mg L<sup>-1</sup> (Figura 2.3 a,b,c).

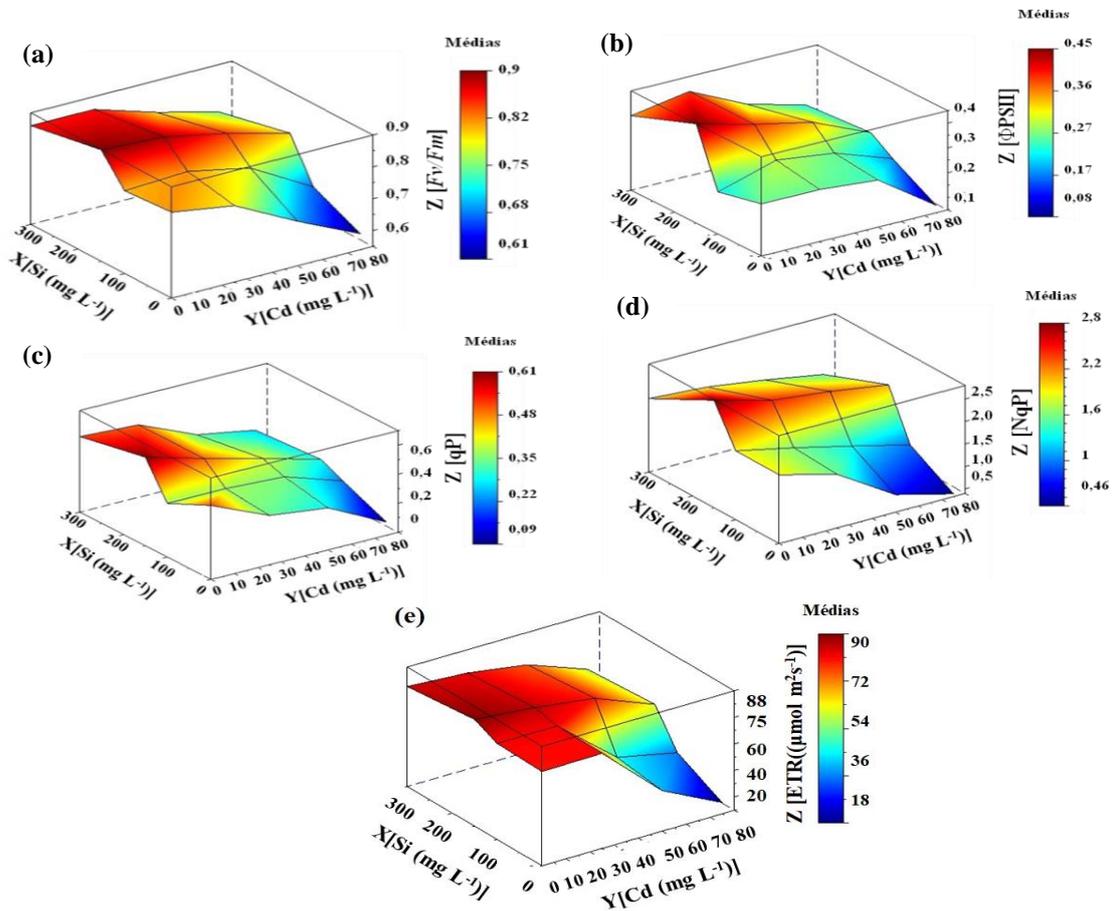
Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as doses de Cd 25mg L<sup>-1</sup> e Cd 50mg L<sup>-1</sup> para o Fv/Fm e o NPq (Figura 2.3 a,d), indicando que a concentração intermediária do metal, não afetou aquelas variáveis e induziu valores concomitantes de 0,76 e 1,5 e correspondentes aos encontrados nas mudas de *K. ivorensis* tratadas com Cd 25mg L<sup>-1</sup>.

Na análise bivariada da regressão, fica evidente que a maior concentração de Cd 75 mg L<sup>-1</sup>, interferiu de maneira significativa ( $p < 0,01$ ) em todos os parâmetros analisados e causou decréscimos acentuados na fluorescência da clorofila *a*. O  $\Phi$ PSII e o qP (Figura 2.3 b,c), foram as variáveis mais afetadas, por esse tratamento, apresentando pontos mínimos pelo ajuste da equação de regressão de 0,05 e 0,07, o que foi 83% e 85%, respectivamente, inferiores ao controle.

A nutrição com Si promoveu melhorias nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* analisados, sobre tudo, quando utilizada a concentração intermediária do nutriente (150 mg L<sup>-1</sup>). A interação entre as doses de Cd 50 mg L<sup>-1</sup> e Si 150 mg L<sup>-1</sup>, promoveu acréscimos nessas variáveis e induziu na correlação positiva ( $r=0,81$ ) entre os fatores ETR e qP, que passaram a exibir valores simultâneos de 87 $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 0,69, sendo 79% e 68% superiores aos das plantas mantidas em tratamento com Cd 50 mg L<sup>-1</sup>. Esses aumentos foram acompanhados

pelos incrementos de 20% no Fv/Fm e, neste momento, as variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram similares ao controle.

Figura 2.3. Alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: no rendimento quântico potencial do fotossistema II (Fv/Fm; a); rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ΦPSII; b); no coeficiente de dissipação fotoquímica (qP; c); no coeficiente de extinção não fotoquímica (NPq; d); na taxa de transporte de elétrons (ETR;e) nas folhas de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{Fv/Fm} = 0,807^{**} - 0,00054Y^{NS} + 0,00097X^{**} + 0,0000271Y^{2**} + 0,0000044XY^{**} - 0,000003X^{2**} \quad (R^2 = 0,87)$$

$$Z_{\Phi PSII} = 0,24^{**} + 0,0018Y^{*} + 0,0011X^{**} - 0,00005Y^{2*} - 0,0000006XY^{NS} - 0,0000022X^{2**} \quad (R^2 = 0,78)$$

$$Z_{qP} = 0,43341^{**} - 0,0021Y^{*} + 0,000952X^{**} - 0,00003Y^{2*} + 0,0000024XY^{NS} - 0,00000221X^{2**} \quad (R^2 = 0,81)$$

$$Z_{NPq} = 1,7841^{**} - 0,0173Y^{**} + 0,0084X^{**} - 0,000013Y^{2NS} + 0,0000445XY^{**} - 0,00003X^{2**} \quad (R^2 = 0,77)$$

$$Z_{ETR} = 0,828728^{**} + 0,1332^{**}X + 0,5040Y + 0,0004920X^2 + 0,000017661Y \cdot X - 0,038731Y^{2**} \quad (R^2 = 0,80)$$

Legenda: Os asterísticos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  e  $^{NS} p > 0,05$ ).

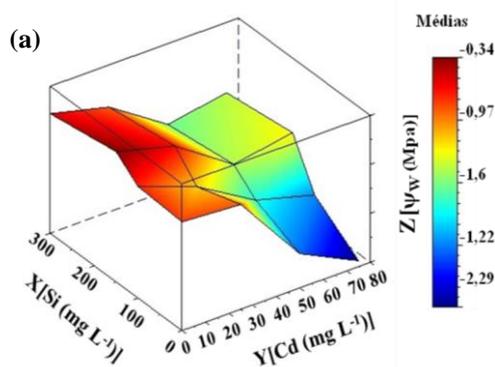
A análise canônica mostra os pontos ótimos das doses combinadas de Cd e de Si (Cd 43 mg L<sup>-1</sup> X Si 131 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 34 mg L<sup>-1</sup> X Si 160 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 44 mg L<sup>-1</sup> X Si 144 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 40 mg L<sup>-1</sup> X Si 139 mg L<sup>-1</sup>), que resultaram, na máxima expressão do Fv/Fm, ΦPSII, qP e NPq, com incrementos de 80%, 90%, 77% e 89%, concomitantemente, em relação às

plantas mantidas sob tratamento isolado com Cd 75 mg L<sup>-1</sup>, evidenciando que a nutrição silicatada restaurou os danos provocados por Cd às variáveis de fluorescência da clorofila *a*, sobre tudo, pelos aumentos expressivos do ΦPSII e do NPq. No entanto, na maior dosagem do metal pesado, as concentrações de Si não promoveram a restauração dessas variáveis.

### 2.3.3. Potencial hídrico (Ψ<sub>w</sub>).

Pela análise de superfície de resposta fica evidente que plantas de *K. ivorensis* submetidas ao tratamento com Cd 25 mg L<sup>-1</sup> não apresentaram redução no potencial hídrico (Ψ<sub>w</sub>), (Figura 2.4) e, nestas condições, mantiveram valores similares ao tratamento com Si à 100 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, na medida em que as concentrações do metal pesado foram aumentadas, houve decréscimos graduais no Ψ<sub>w</sub>.

Figura 2.4. Alterações no potencial hídrico (Ψ<sub>w</sub>; a) nas folhas de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{\Psi_w} = -0,683^{**} - 0,032Y^{**} + 0,0041X^{*} + 0,00006Y^2 + 0,00006XY^{**} - 0,000013X^2^{**} \quad (R^2 = 0,83)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*p<0,001; \*\*p<0,05).

A análise de regressão mostra que o ponto mínimo do Ψ<sub>w</sub> (-2,5Mpa) ocorreu com o tratamento Cd 75 mg L<sup>-1</sup>, o que foi 73% menor ao das plantas controle e 90% inferior àquele observado em *K. ivorensis*, tratadas com concentração intermediária de Si (150 mg L<sup>-1</sup>).

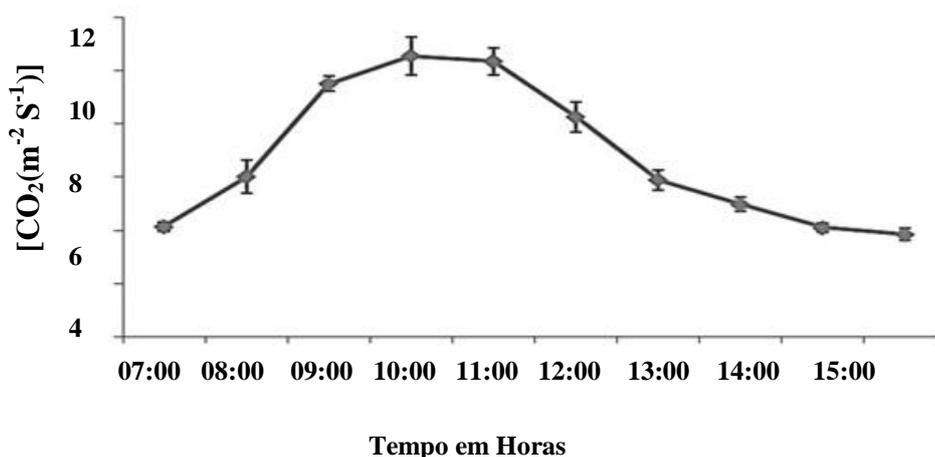
A nutrição com Si 150 mg L<sup>-1</sup>, resultou nos maiores valores do Ψ<sub>w</sub> de *K. ivorensis*, com ponto máximo de (-0,28 Mpa), 16% maior que o controle e 86% superior ao Ψ<sub>w</sub> das plantas mantidas sob tratamento com a dosagem máxima do metal, Cd 75 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, a máxima dosagem do nutriente (Si 300 mg L<sup>-1</sup>), promoveu decréscimos de 8% no Ψ<sub>w</sub> das plantas em relação ao tratamento com Si 150 mg L<sup>-1</sup>.

A interação significativa ( $p < 0,01$ ) para o tratamento combinado entre as concentrações medianas de Cd ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) e de de Si ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ) mostra que, plantas sob estresse por Cd e suplementadas com Si, tiveram aumentos expressivos no  $\Psi_w$ . Conforme a análise canônica dos dados, o tratamento combinado ( $\text{Cd } 30 \text{ mg L}^{-1} \times \text{Si } 159 \text{ mg L}^{-1}$ ) representou o ponto ótimo da concentração do metal e do nutriente que expressou o máximo  $\Psi_w$  das plantas. Sob efeito desse tratamento, houve acréscimos de 70% no  $\Psi_w$  de *K. ivorensis* submetidas à concentração de Cd  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . No tratamento combinado, o  $\Psi_w$  das plantas foi equivalente àqueles encontrados no controle.

#### 2.3.4. Curva diurna de trocas gasosas.

Pela análise da curva diurna de trocas gasosas, no intervalo entre 09:00 e 11:00 h, ocorreram as melhores respostas fotossintéticas de *K. ivorensis* e, nesse momento, observadas taxas de fotossíntese ( $A_{\text{máximas}}$ ) de  $10 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e quase constantes para as plantas controle (Figura 2.5).

Figura 2.5. Curva diurna em plantas de mogno (*Khaya ivorensis* A. Chev)

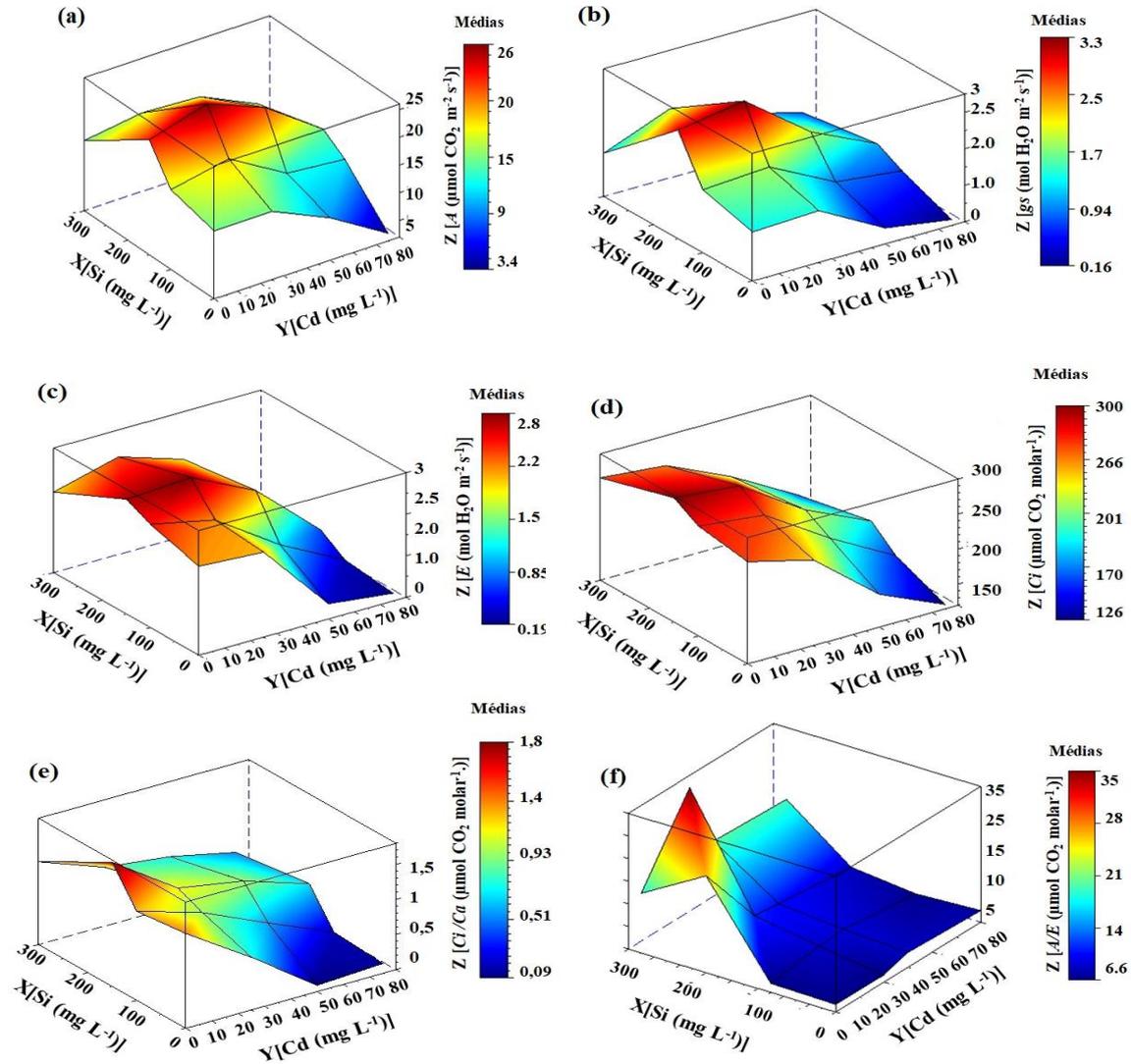


Nota-se que a diminuição da eficiência dos fotossistemas, ocorreu inicialmente às 12h e atingiu os menores picos às 15h. Nesse período, a taxa fotossintética foi de  $4 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2}$ , 60% inferior ao observado no intervalo da manhã.

#### 2.3.5. Fotossíntese e trocas gasosas.

Apenas a concentração de Cd  $25 \text{ mg L}^{-1}$  não reduziu significativamente ( $p > 0,05$ ) as variáveis de fotossíntese e de trocas gasosas o que é evidenciado na análise de superfície de resposta (Figura 2.6).

Figura 2.6. Alterações nos parâmetros de trocas gasosas: fotossíntese (A;a), condutância estomática ( $g_s$ ;b), transpiração (E;c), concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $C_i$ ;d); relação  $C_i/C_a$  (e) eficiência do uso da água (A/E; f) nas folhas de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_A = 13,521106^{**} + 0,091914^{**}X + 0,53989^{*}Y - 0,000291^{*}X^2 + 0,000306^{*}Y.X - 0,002615^{*}Y^2 \quad (R^2 = 0,81)$$

$$Z_{G_s} = 1,377318^{**} + 0,012657^{***}X + 0,0627^{*}Y - 0,000039798^{**}X^2 + 0,000032365^{*}Y.X - 0,000299^{**}Y^2 \quad (R^2 = 0,73)$$

$$Z_E = 2,109356^{**} + 0,006804^{**}X - 0,04243^{*}Y - 0,000021508^{*}X^2 + 0,000041274^{*}Y.X - 0,000373^{*}Y^2 \quad (R^2 = 0,88)$$

$$Z_{C_i} = 261,499271^{**} - 0,881171^{**}X + 0,423420^{*}Y - 0,013705^{**}X^2 + 0,001797^{**}XY - 0,001318^{**}Y^2 \quad (R^2 = 0,86)$$

$$Z_{C_i/C_a} = 1,256060^{**} - 0,024180^{**}X + 0,003807^{*}Y + 0,000091574X^2 + 0,000029012^{**}XY - 0,000012929Y^2 \quad (R^2 = 0,88)$$

$$Z_{A/E} = 7,057217^{**} + 0,05727^{*}X + 0,13807^{*}Y - 0,023099^{*}X^2 - 0,000374^{*}Y.X + 0,003349^{*}Y^2 \quad (R^2 = 0,70)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  e  $^{NS} p > 0,05$ ).

No entanto, o aumento gradual nos níveis do metal, acima de  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , incorreu em decréscimos simultâneos naquelas variáveis, o que é evidenciado pela equação de regressão das variáveis fisiológicas ( $Z_A$ ,  $Z_{g_s}$ ;  $Z_E$ ;  $Z_{C_i}$ ;  $Z_{C_i/C_a}$ ;  $Z_{A/E}$ ) (Figura 2.6).

As maiores reduções nos parâmetros fotossintéticos e de trocas gasosas ocorreram sob efeito da maior concentração do metal pesado Cd 75 mg L<sup>-1</sup>. A *gs* e o Ci/Ca (Figura 2.6 b, d), foram as variáveis mais afetadas por àquela dosagem do íon tóxico atingindo nestas condições pontos mínimos respectivos de 0,12 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 0,06 μmol CO<sub>2</sub> molar<sup>-1</sup> conforme o ajuste da regressão com decréscimos acentuados e equivalentes de 95% em relação ao controle.

O silício no meio de cultivo promoveu aumentos graduais em todas as variáveis analisadas na medida em que os níveis desse nutriente foram aumentados até a concentração de Si 150 mg L<sup>-1</sup>, ocorrendo reduções concomitantes nelas, no momento em que as concentrações do nutriente e do MP foram aumentadas no meio de cultivo.

A máxima expressão das variáveis fotossintéticas e de trocas gasosas atingiu pontos ótimos como evidenciados pela análise canônica mediante o tratamento combinado da concentração de Cd e de Si na ordem de (Cd 31 mg L<sup>-1</sup> x Si 162 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 37 mg L<sup>-1</sup> x Si 154 mg L<sup>-1</sup>); (Cd 30 mg L<sup>-1</sup> x Si 152 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 34 mg L<sup>-1</sup> x Si 155 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 45 mg L<sup>-1</sup> x Si 141 mg L<sup>-1</sup>), (Cd 30 mg L<sup>-1</sup> x Si 159 mg L<sup>-1</sup>) para A, *gs*; E; Ci; Ci/Ca; A/E, respectivamente. A interação significativa (p<0,01), entre essas concentrações resultou em incrementos mais expressivos na A, *gs* e no Ci/Ca (Figura 2.6 a, b, d) e foram 60%, 68% e 64%, concomitantemente, superiores àqueles observados nas plantas mantidas em tratamento isolado com Cd à 50 mg L<sup>-1</sup>.

### **2.3.6. Parâmetros de Crescimento.**

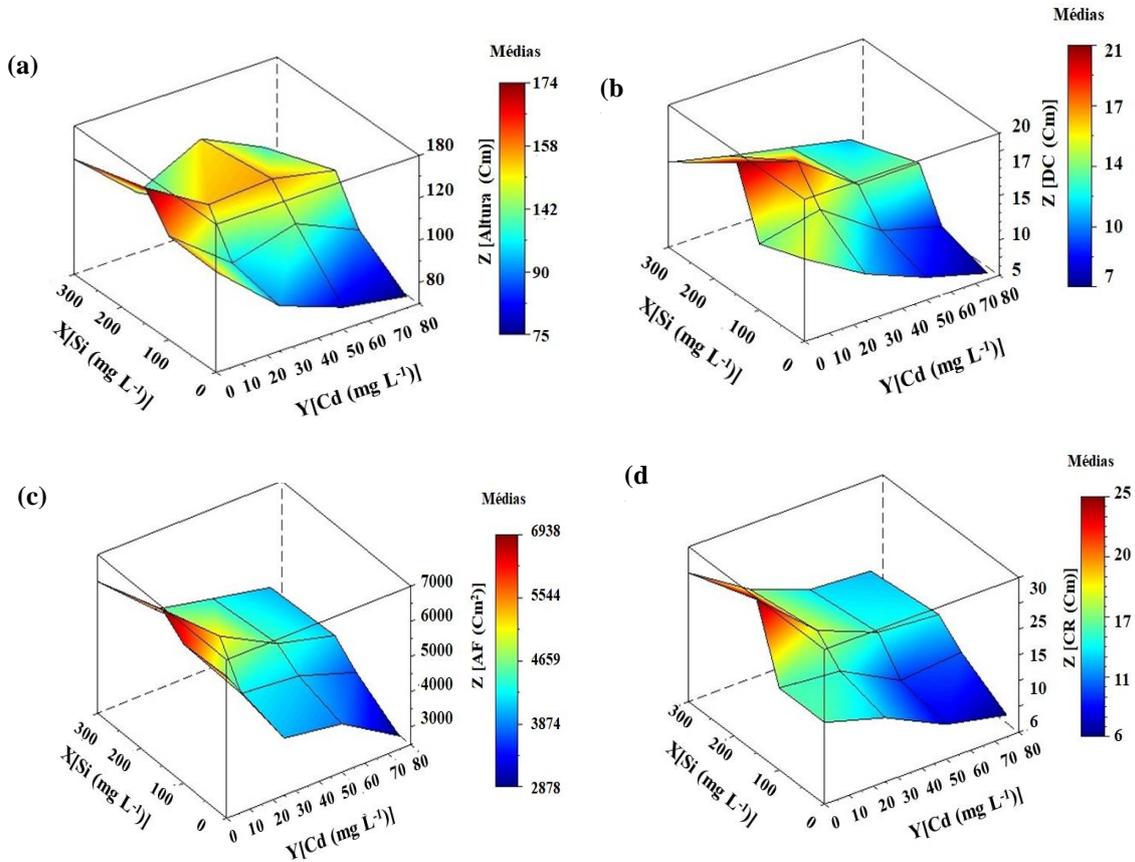
De modo geral, as variações ocorridas nas variáveis de biométricas (Figura 2.7), foram semelhantes, ocorrendo reduções nelas na medida que a concentração de Cd foi aumentada, e concomitante acréscimo nesses valores, quando a dose de Si foi elevada no meio de cultivo (Figura 2.7). A altura (H) e a área foliar (AF) (Figura 2.7 a, c), sofreram os maiores decréscimos em função dos tratamentos com Cd a 75 mg L<sup>-1</sup>, com reduções respectivas de 49% e 60% em relação ao controle.

Pela análise bivariada, fica claro que os maiores valores da H, DC, AF e CR foram observados na ausência de Cd e na concentração intermediária de Si, ocasião em que o aumento induzido pelo nutriente foi máximo conforme o ajuste da regressão.

O tratamento com Si a 150 mg L<sup>-1</sup> induziu em acréscimos em todos os parâmetros de crescimento, e os efeitos mais expressivos ocorreram para o DC e o CR (Figura 2.7 a, b,d). Mediante essa concentração do nutriente, obtiveram-se os pontos máximos, 24 cm e 20cm,

para àquelas variáveis, sendo 67% e 76%, paralelamente, superiores aos de plantas mantidas em condições de estresse por Cd 50 mg L<sup>-1</sup>.

Figura 2.7. Alterações nos parâmetros de crescimento altura (H;a), diâmetro do caule (DC; b), área foliar (AF; c), Comprimento da raiz (CR; d) de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_H = 110,274695^{**} - 0,837162Y^{**} + 0,219755X^{**} + 0,004980 Y^2 + 0,000952XY^{**} - 0,000626X^2 (R^2 = 0,77)$$

$$Z_{DC} = 14,137379^{**} - 0,114311 Y^{**} + 0,045906 X^{**} + 0,000067143Y^{2NS} + 0,000157XY^{**} - 0,000132X^2 (R^2 = 0,76)$$

$$Z_{AF} = 6189,174856^{**} - 78,168473 Y^{**} + 6,580981 X^{**} + 0,474230 Y^2 + 0,051977XY^{**} - 0,020762X^2 (R^2 = 0,91)$$

$$Z_{CR} = 15,656913^{**} - 0,269919 Y^{**} + 0,076262 X^{**} + 0,001686 Y^2 - 0,000107XY^{NS} - 0,000149 X^2 (R^2 = 0,82)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\*p<0,001; \*p<0,05 e <sup>NS</sup> p >0,05).

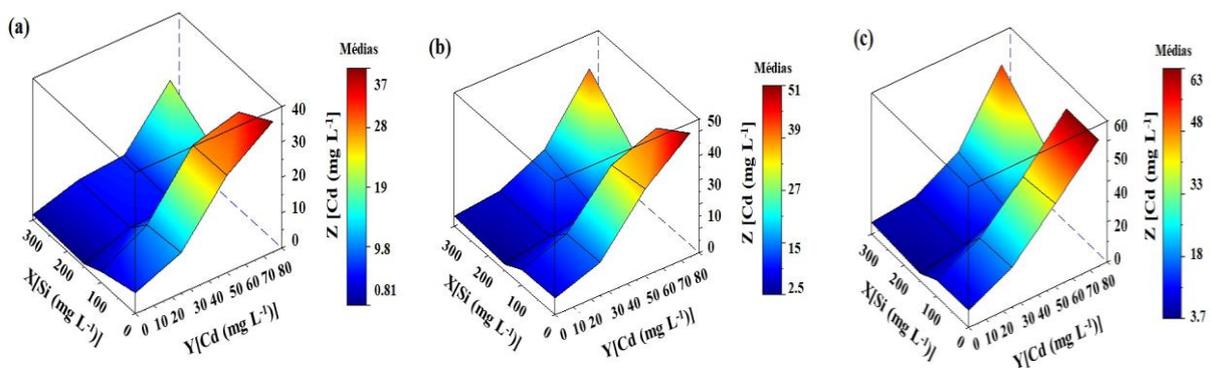
A interação significativa ( $p < 0,01$ ), entre as concentrações de Cd e de silício mostra que a adição de Si na solução nutritiva promoveu aumentos nos parâmetros de crescimento. A análise canônica indica que os níveis ótimos do tratamento interação (Cd 41 mg L<sup>-1</sup> x Si 145 mg L<sup>-1</sup>) resultaram em respostas similares à todas as variáveis biométricas analisadas e induziram ao máximo crescimento.

Sob efeito da combinação de Cd 41 mg L<sup>-1</sup> x Si 145 mg L<sup>-1</sup>, houve incrementos de 33% na H e na AF (Figura 2.7; a, c) e de 53% e 58%, respectivamente, para o DC e CR (Figura 7; b, d) em relação às plantas cultivadas com tratamento isolado de Cd a 50 mg L<sup>-1</sup>. Fica evidente que a concentração intermediária de Si 150 mg L<sup>-1</sup>, reverteu a toxicidade de Cd sobre as variáveis de crescimento.

### 2.3.7. Fator de bioacumulação (FB) de Cádmi (Cd).

Conforme o ajuste da equação polinomial ( $Z_{Cd}$  folha,  $Z_{Cd}$  caule,  $Z_{Cd}$  raiz), o fator de bioacumulação (FB) de Cd em folhas, caules e raízes, foi significativamente maior naqueles onde o nível mais alto do metal foi aplicado (Figura 2.8).

Figura 2.8. Fator de bioacumulação (FB) de cádmio (Cd) nas raízes: (FB, a), nos caules (FB, b) e nas folhas (FB, c) de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{FB\ raiz} = 20.097692* -11.158768*X + 1.121878*Y + 2.089244*X^2 - 1.757491*Y.X + 4.174012*Y^2 (R^2=0,89)$$

$$Z_{FB\ caule} = 3.968584* -6.252540*X + 8.519153*Y + 1.335394*X^2 - 2.024308*Y.X + 8.45975*Y^2 (R^2=0,86)$$

$$Z_{FB\ folha} = 16.433885* -13.026328*X + 3.225647*Y + 2.572936*X^2 - 1.697074*Y.X + 2.473839*Y^2 (R^2=0,88)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\*p<0,001; \*p<0,05 e <sup>NS</sup> p>0,05).

Mudas de *K. ivorensis* apresentaram resposta diferencial ao conteúdo de Cd nos tecidos do vegetal. Na menor dosagem do MP (Cd 25 mg L<sup>-1</sup>), houve maior acúmulo do íon na ordem sequencial raiz > caule > folha (Figura 2.8). No entanto, no momento em que os níveis de Cd foram aumentados, houve aumento gradual da concentração do íon no tecido foliar. No tratamento com Cd 75 mg L<sup>-1</sup>, os maiores acúmulos do metal ocorreram no tecido foliar, atingindo pontos máximos de 57 mg g<sup>-1</sup> MS, o que foi 45% mais elevado do que a

concentração do íon encontrado no tecido radicular sob efeito do mesmo tratamento e 87% superior ao controle (Figura 2.8; c).

Fica claro que o Si induziu em decréscimos no teor de Cd nos diferentes órgãos do vegetal. Os pontos ótimos para a menor concentração do íon tóxico matéria seca (MS), conforme a análise canônica foi obtida com o tratamento interação entre doses do metal e níveis do nutriente de (Cd 45 mg L<sup>-1</sup> x Si 178 mg L<sup>-1</sup>) e (Cd 38 mg L<sup>-1</sup> x Si 141 mg L<sup>-1</sup>) em caules e folhas, concomitantemente (Figura 2.8; b, c), obtendo-se concentrações de Cd 60% e 78% inferiores às encontradas na MS das plantas mantidas sob estresse por Cd a 50 mg L<sup>-1</sup>.

No sistema radicular (Figura 2.8; a), o ponto mínimo da concentração de Cd 4,8 mg L<sup>-1</sup> MS ocorreu na presença de Si 150 mg L<sup>-1</sup> e na ausência do metal. No entanto, foram observadas reduções no teor do íon tóxico nas raízes de plantas mantidas sob estresse Cd 50 mg L<sup>-1</sup> e tratadas com o nível intermediário do nutriente, na ordem de 26%, indicando que o Si induz a menor acumulação do metal nos tecidos.

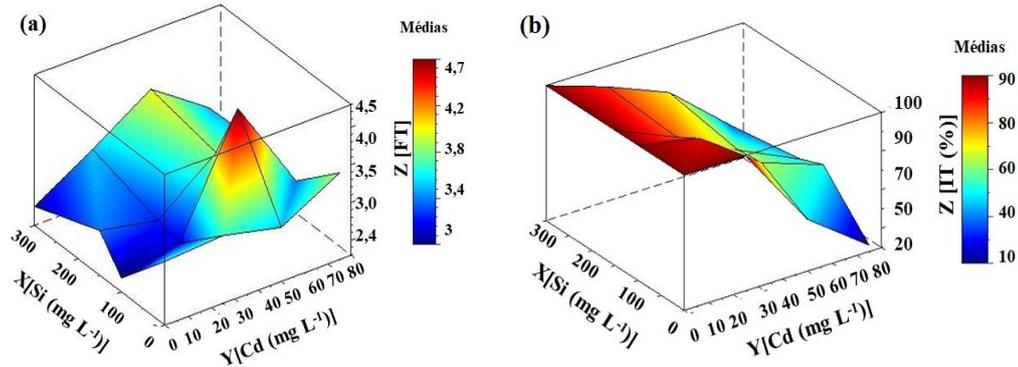
#### **2.3.7.1. Fator de translocação (FT) e Índice de tolerância (IT) ao Cd.**

A análise bivariada da regressão foi realizada para verificar a correlação negativa ( $r = -0,78$ ) entre o índice de tolerância (IT) e o fator de translocação (FT) do metal (Figura 2.9).

Plantas tratadas com Cd 25 mg L<sup>-1</sup> exibiram padrões de comportamento distinto às mantidas sob médias e altas concentrações de Cd. Sob efeito deste tratamento ocorreu a menor translocação (Figura 2.9; a) do íon tóxico das raízes para as partes aéreas e ponto mínimo equivalente à 3,8 mg g<sup>-1</sup> MS, o que foi gradualmente aumentado na medida em que os níveis do metal foram elevados no meio de cultivo. Na concentração de Cd 75 mg L<sup>-1</sup>, houve maior translocação de Cd em que as plantas exibiram pontos máximos de FT de 4,2 mg g<sup>-1</sup> MS, o que foi 38% mais elevado quando comparado ao controle, conforme o ajuste da regressão. E nesse momento, o índice de tolerância (IT) foi mínimo e correspondente a 5% (Figura 2.9 b).

A interação significativa ( $p < 0,01$ ) entre as doses do metal e do nutriente, comprova que a suplementação com Si 150 mg L<sup>-1</sup> resultou na menor translocação de Cd para as partes aéreas na ordem de Cd 2,3 mg g<sup>-1</sup> MS (Figura 2.9; a), o que foi 45% menor quando comparado ao FT de plantas mantidas em tratamento isolado com Cd 75 mg L<sup>-1</sup>.

Figura 2.9. Fator de translocação (FT, a) e índice de tolerância (IT, b) ao Cd em plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{FT} = 3,358313* + 0,1963*X + 0,020989**Y + 0,03965**X^2 + 0,05266**Y.X + 0,206**Y^2 (R^2=0,75)$$

$$Z_{IT} = 1,009042* + 0,00660**X - 0,005671**Y - 0,000002933**X^2 + 0,005860**Y.X - 0,027535**Y^2 (R^2=0,82)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\*p<0,001; \*p<0,05 e <sup>NS</sup>p >0,05).

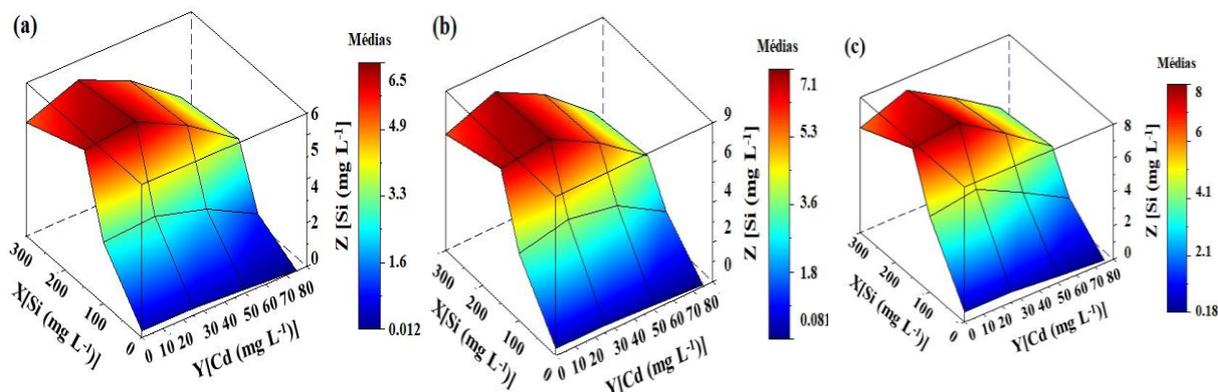
A análise canônica da regressão mostra que os pontos ótimos da combinação dos tratamentos (Cd 40 mg L<sup>-1</sup> x Si 158 mg L<sup>-1</sup>), resultou no menor FT das plantas submetidas às concentrações de Cd 50 mg L<sup>-1</sup> e suplementadas com Si 150 mg L<sup>-1</sup> o que, também, resultou no máximo índice de tolerância das plantas, sendo 68% superior ao daquelas tratadas com Cd 50 mg L<sup>-1</sup>.

### 2.3.8. Concentração de Silício na matéria seca (MS).

As dosagens de Cd 25 mg L<sup>-1</sup> e 50 mg L<sup>-1</sup> não afetaram o acúmulo de Si em todos os órgãos analisados. Os pontos mínimos da concentração de Si na MS em folhas caules e raízes (0,012; 0,081 e 0,18 Si mg<sup>-1</sup> MS), foram atingidos apenas com a máxima dose de Cd 75 mg L<sup>-1</sup> (Figura 2.10).

Houve aumentos graduais na concentração de Si nos diferentes tecidos de plantas de mogno, na medida em que os níveis do nutriente foram elevados na solução nutritiva. A equação de regressão ( $Z_{Si}$  folha;  $Z_{Si}$  caule;  $Z_{Si}$  raiz) mostra que os pontos máximos da concentração do mineral nestes órgãos foram obtidos com a dose de 150 mg L<sup>-1</sup> Si atingindo-se valores respectivos de (4,9; 6,8; 7,7 Si mg<sup>-1</sup> MS) naqueles tecidos e os maiores acúmulos de Si na MS ocorreram na ordem de raízes > caules > folhas (Figura 2.10).

Figura 2.10. Concentrações de Silício (Si): em folha (Si, a), em caule (Si,b) e raízes (Si,c) de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{\text{Si folha}} = -7,608813** + 6,751703**X + 2,374990**Y - 0,851335**X^2 - 0,274410**Y.X - 0,457289**Y^2 (R^2=0,95)$$

$$Z_{\text{Si fcaule}} = -6,170827** + 5,513027**X + 1,870763**Y - 0,656571**X^2 - 0,199288*Y.X - 0,387050*Y^2 (R^2=0,92)$$

$$Z_{\text{Si raiz}} = -7,554130** + 7,587897**X + 2,121734**Y + 1,022417**X^2 - 0,243728**Y.X - 0,454389**Y^2 (R^2=0,96)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$ ).

Pela equação polinomial, em plantas estressadas, os pontos ótimos da concentração de Si naqueles tecidos foram obtidos com o tratamento interação entre doses do metal e concentração do nutriente de (Cd 27 mg L<sup>-1</sup> x 132 mg L<sup>-1</sup>); (Cd 34 mg L<sup>-1</sup> x Si 156 mg L<sup>-1</sup>); (Cd 30 mg L<sup>-1</sup> x Si 151 mg L<sup>-1</sup>) que resultaram nas maiores concentrações de Si na matéria seca de folhas, caules e raízes, respectivamente, quando comparadas às plantas cultivadas com Cd à 50 mg L<sup>-1</sup>.

## 2.4. Discussão

No presente estudo, plantas de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev), cultivadas em solução nutritiva foram testadas para analisar o potencial fitorremediador à Cd dessa espécie, tomando-se como base as alterações nas variáveis fisiológicas de trocas gasosas, na fluorescência da clorofila *a*, e no teor de pigmentos fotossintéticos e investigar as modulações do Si sobre esses parâmetros na mitigação do estresse induzido por Cd, 60 dias após exposição ao MP e à nutrição silicatada.

O conteúdo de clorofila *a* é considerado um indicador de dano ao sistema fotossintético induzido por fatores ambientais estressores como os MPs. O menor nível de Cd não afetou o teor de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides, sugerindo alguma capacidade da planta em tolerar aquela concentração do metal pesado em seus tecidos (Figura 2.2). No

entanto, os resultados mostraram que, nas concentrações crescentes de Cd, houve decréscimos significativos nos teores dos pigmentos fotossintéticos (Figura 2.2), o que resultou em folhas cloróticas nas plantas de mogno submetidas às médias e altas concentrações do íon, o que atribuímos aos danos causados pelo MP ao metabolismo dos cloroplastos e aos fotossistemas.

Um grande número de estudos demonstrou que os locais primários de ação do Cd são os cloroplastos, afetando a biossíntese de pigmentos fotossintéticos, resultando em clorose o que aparece como o sintoma mais comum da toxicidade pelo metal (LYSENKO et al., 2015). Estudos realizados por Silva et al., (2017), demonstraram que a toxicidade de Cd, causou diminuição na densidade dos cloroplastos o que refletiu indiretamente, na diminuição do teor de pigmentos fotossintéticos.

Sendo assim, o decréscimo no teor de pigmentos fotossintéticos apresentou correlação com a redução nas taxas da fluorescência da clorofila *a* (Figura 2.3) e na fotossíntese líquida (Figura 2.6; a). O Cd tem grande efeito sobre o complexo protéico Chla/Chlb II de captação de energia luminosa (KRUPA, 1987). Ele inibe a fotossíntese devido reduzir a atividade do fotossistema II, que eventualmente suprime a produção quântica e transporte de elétrons, desse modo, os teores de clorofila e carotenóides são consideravelmente reduzidos (FAN et al., 2011; SEBASTIAN & PRASAD, 2014).

Por exemplo, Silva et al., (2017), observaram redução do rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) e da eficiência quântica efetiva do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) devido à fitointoxicação causada pelo Cd, que provoca a degradação do conteúdo interno do cloroplasto. Segundo Bolhàr-Nordenkamp et al., (1989), plantas que apresentam valores de  $F_v/F_m$  entre 0,75 e 0,85 são consideradas saudáveis e uma queda nesta razão reflete a presença de dano fotoinibitório nos centros de reação do PSII.

A eficiência fotoquímica potencial das plantas de mogno em função das concentrações crescentes de Cd e dosagens de Si é mostrada na (Figura 2.3;a), na qual se verificou tendência de redução na relação  $F_v/F_m$  sempre que as plantas foram submetidas ao tratamento isolado com o Cd. Os maiores decréscimos ocorreram com as concentrações de Cd  $50\text{mg L}^{-1}$  e de Cd  $75\text{mg L}^{-1}$ , indicando que o tratamento com o íon tóxico, promoveu danos ao PSII em *K. ivorensis*.

O Cd promove alterações à nível molecular e estrutural nas proteínas, promovendo sua inativação (CHOPALLA et al., 2014). Sugerimos houve regulação diferencial nas proteínas D1 e D2, ligadas ao PSII nas plantas de mogno africano estressadas por Cd, o que pode ter contribuído para os decréscimos nos valores de  $F'_v / F'_m$  levando a reduções subsequentes em  $qP$ ,  $\Phi_{PSII}$  e ETR (Figura 2.3). Essa cascata de eventos sugere que o transporte linear geral de

elétrons foi desacelerado com altos e médios níveis do metal no tecido vegetal o que determinou a baixa eficiência fotossintética (Figura 2.6).

Por outro lado, sob tratamento com Cd a  $25 \text{ mg L}^{-1}$  não se constatou alteração significativa na variável em análise. Isso indica que, sob esse nível do metal, a maior parte da radiação fotossinteticamente ativa foi utilizada na fase fotoquímica da fotossíntese, não havendo por tanto, comprometimento do PSII (Figura 2.3;b). Esta habilidade em manter valores semelhantes de  $F_v / F_m$  sob estresse por Cd, pode indicar alta eficiência no uso da radiação o que ficou comprovado neste estudo pelas reações de assimilação de carbono (Figura 2.6 b,e).

O Si configura como um nutriente benéfico atenuante de estresses abióticos como os decorrentes por MPs e, dentre eles, o Cd, como evidenciado para um vasto número de espécies vegetais (ADREES et al., 2015; NAEEM et al., 2015 ;WU et al., 2016; JI et al., 2017; YU et al. 2016)

Houve uma tendência para aumentos crescentes nas variáveis fisiológicas de trocas gasosas e na fluorescência da clorofila *a*, na medida em que as concentrações de Si foram aumentadas até a dosagem de ( $\text{Si } 150 \text{ mg L}^{-1}$ ). Portanto, esta dose intermediária de Si mostrou efeito positivo para a funcionalidade do PSII nas plantas sob estresse por Cd. Greger et al., (2016) sugeriram que o aumento no desempenho do PSII de plantas estressadas por Cd após tratamento com Si, é atribuído ao efeito do nutriente na atenuação dos danos aos componentes do PSII e não sob efeito direto aos teores de clorofila.

Autores como Rahman et al., (2017), também observaram incrementos no conteúdo dos pigmentos clorofilianos a medida em que as doses do Si foram aumentadas no meio de cultivo, o que refletiu na maior eficiência do PSII. No total, nossos dados confirmam que o Si restaurou o dano provocado pela toxicidade de Cd e, ainda, promoveu melhorias nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* das plantas de mogno africano (Figura 2.3).

O Si aumenta a proporção de Cd no apoplasto e reduz a quantidade de Cd no simplasto, o que reforça a teoria de que aquele nutriente aumenta a ligação do Cd às paredes celulares e limita o transporte do metal pela via apoplástica, como evidenciado por (SHAO et al., 2017). A redução da translocação do Cd para as partes aéreas da planta (Figura 2.9; a) reflete a importância do Si na proteção dessa espécie arbórea aos efeitos tóxicos do MP. Plantas de *K. ivorensis* suplementadas com o micronutriente, exibiram maior acumulação do metal nas raízes em relação às concentrações encontradas nas partes aéreas (Figura 2.8) e os maiores acúmulos ocorreram na seguinte ordem: raízes > caules > folhas. O aprisionamento do íon tóxico no sistema radicular em detrimento da sua translocação para as partes aéreas

comprova que o Si atua nos mecanismos de tolerância ao Cd para a espécie em estudo (Figura 2.9; b).

Nesse sentido, confirmamos que o Si previu danos aos cloroplastos que representam seu principal sítio de toxicidade, e onde ocorrem as reações metabólicas da fotossíntese. Inferimos que o complexo Si-Cd, estimulou a entrada e o armazenamento do íon tóxico no vacúolo celular, o que contribuiu para o aumento da tolerância de *K. ivorensis* ao metal (Figura 2.9; b). Autores como Rizwan et al., (2016), atribuem a maior tolerância das plantas ao Cd à sua capacidade de compartimentalização do íon no vacúolo. Neste aspecto, consideramos que o Si desempenha papel significativo no sequestro vacuolar do metal, o que pode explicar as diferenças de concentração de Cd no tecido vegetal e menor efeito fitotóxico.

Houve diminuição da eficiência do PSII (medido como  $F_v/F_m$ ) (Figura 2.3;a) em resposta ao estresse por Cd; o que sinalizou redução do rendimento quântico potencial máximo do PSII (Figura 2.3,b). Em adição, O qP (Figura 2.3; c) mostrou-se vulnerável às mudanças no estado de energia no cloroplasto decorrente do estresse causado por concentrações mais severas de Cd, o que induziu no fechamento estomático e causou o bloqueio do fluxo de elétron ao  $NADP^+$  na forma reduzida e resultou na conversão da taxa de energia PSII. Portanto, o qP, provou ser o mais sensível parâmetro para detecção precoce de estresse, tendo em vista as maiores quedas nas taxas de qP sob efeito da fitotoxicidade por Cd.

As alterações nos parâmetros de trocas gasosas, estiveram relacionados com os decréscimos no qP e no potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) (Figura 2.4). Sob tratamento com Cd, houve aumento da resistência estomática (Figura 5;b) o que induziu para a queda da taxa transpiratória (Figura 2.6;c) e para a menor assimilação de  $CO_2$  (Figura 2.6;d). O fechamento estomático (Figura 2.6;b), em decorrência do efeito tóxico do MP restringiu a absorção de  $CO_2$  nos cloroplastos o que, provavelmente, aumentou a ação oxigenase da Rubisco e, em consequência, a fotorrespiração, o que alterou o estado de ativação inicial daquela enzima.

A menor disponibilidade hídrica (Figura 2.4) nos tecidos em decorrência dos efeitos adversos do Cd no metabolismo vegetal favoreceu as reações em cadeia que resultaram no aumento da temperatura foliar com consequente redução na eficiência do uso da água (Figura 2.6;f). Assim, sob efeito do MP, componentes estomáticos e difusivos exerceram efeito negativo na regulação da fotossíntese líquida (Figura 2.6). Estudos anteriores também demonstraram a fitotoxicidade de Cd às variáveis fisiológicas (SILVA, et al., 2017; SLOT & WINTER, 2017).

Quando as reduções na fotossíntese líquida e condutância estomática estão associadas com um declínio de Ci, os fatores estomáticos são considerados cruciais para a diminuição da

taxa fotossintética; ao contrário, quando esses decréscimos estão associados com o aumento ou estabilização de  $C_i$ , a diminuição da capacidade fotossintética é causada principalmente por limitação não estomacal decorrente das restrições no metabolismo bioquímico de assimilação do  $CO_2$ , em vez de fatores estomáticos e componentes difusivos. De fato, na menor concentração de Cd, os valores de  $C_i$  (Figura 2.6;d), se mantiveram similares aos controle, indicando que os decréscimos na fotossíntese líquida sob efeito deste tratamento, estiveram atribuídos a fatores não estomáticos.

Para Dias et al., (2013), a redução da fotossíntese líquida em plantas de alface submetidas a doses de Cd foi associada à diminuição da atividade da Rubisco através da substituição do  $Mg^{2+}$  pelo Cd, como cofator de ativação enzimática, bem como, da redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II, em parte, resultante da degradação de clorofila.

A transpiração e a assimilação de  $CO_2$  são processos difusivos fundamentais para a síntese das trioses fosfatadas requeridas para os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como bem documentado na literatura (LI et al. 2016). Como consequência da menor assimilação de  $CO_2$  há redução ou paralisação do crescimento. Assim, ficam plausíveis os decréscimos observados em todos os parâmetros de crescimento de *K. ivorensis* submetidas às médias e altas concentrações de Cd utilizadas neste estudo (Figura 2.7).

Sob exposição a níveis tóxicos de MPs, diversas espécies de plantas apresentam redução no crescimento (GAUTAM et al., 2016; IVANOV et al., 2016; MATHUR et al., 2016). O que aparece como resultado do efeito desse metal-traço sobre diversos processos metabólicos incluindo às relações hídricas, trocas gasosas e a fotossíntese (GOSWAMI et al., 2015).

As raízes são os principais órgãos que entram em contato com os metais tóxicos e, geralmente, acumulam uma quantidade maior desses íons. O menor crescimento radicular (Figura 2.7;d) pelos tratamentos com Cd pode também resultar da inibição na divisão celular e taxa de alongamento das células que ocorrem principalmente por uma obstrução irreversível da bomba de prótons responsável pelo processo (GAUTAM et al., 2016). A redução do crescimento no mogno africano decorreu do efeito tóxico de Cd sob a atividade fotossintética e aos distúrbios em fotossistemas foliares (PSII) (Figura 2.3).

Os sintomas da toxicidade por Cd em *K. ivorensis* foram visivelmente atenuados pela suplementação de Si, o que associamos à redução no conteúdo desse MP nas raízes e partes aéreas da espécie em estudo. Greger et al., (2016), sugerem que o Si, interfere na membrana celular e inibe a captação de Cd, garantindo, assim, a funcionalidade normal das reações

metabólicas nas plantas relacionadas aos processos de crescimento e desenvolvimento do vegetal.

No entanto, a maior dose de Si aplicada promoveu decréscimos nos parâmetros de crescimento, na fotossíntese líquida, nas variáveis de trocas gasosas e na fluorescência da clorofila *a*. Isso indica que, embora o Si seja um elemento benéfico, altas doses do nutriente podem causar desequilíbrio nutricional e afetar as diversas atividades metabólicas nas plantas (ARAÚJO et al., 2011). Gu et al., (2011), sugerem que altas concentrações de Si, coprecipitem metais como o ferro (Fe) e o cobre (Cu) essenciais à eficiência fotossintética. Acredita-se que algo semelhante tenha ocorrido em nosso estudo, em que a maior dose do nutriente parece ter afetado, indiretamente, a fotossíntese, o que refletiu nas reduções das variáveis de crescimento analisadas (Figura 2.7).

## 2.5. Conclusão

Nesse ensaio buscou-se comprovar o potencial fitorremediador de *Khaya ivorenses*. A menor concentração de Cd 25 mg L<sup>-1</sup> utilizada neste estudo é 8 vezes superior ao VI conforme proposto por Brasil, (2009) e, sob essa dosagem do MP, não foram observados danos ao metabolismo fisiológico e bioquímico de *K. ivorenses* o que sugere tolerância dessa espécie a esse nível de exposição ao Cd.

O baixo coeficiente de permeabilidade da membrana 10<sup>-10</sup> m s<sup>-1</sup>, explica a absorção ativa de Si em espécies acumuladoras. Os médios acúmulos de Si no tecido do vegetal, possivelmente, decorreu da perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática causada pela toxicidade por Cd no mogno africano. Não descarta-se nesta pesquisa, ainda, a existência de transportadores de Si presentes na membrana plasmática de *K. ivorensis*, o que carece, no entanto, de maior investigação.

Nas plantas estressadas com Cd 50 mg L<sup>-1</sup> a presença do micronutriente, na concentração de Si 160 mg L<sup>-1</sup> elevou a tolerância e intensificou o caráter fitorremediador do mogno africano na medida em que promoveu a distribuição diferencial de Cd nos órgãos do vegetal e induziu na fitoestabilização do íon tóxico o que limitou sua entrada nos cloroplastos e garantiu proteção à maquinaria cloroplastídica, à eficiência da clorofila *a* e à difusão ao influxo de CO<sub>2</sub>, preveniu danos ao fotossistema II (PSII) e aclimatou as plantas.

Desse modo, *K. ivorenses*, mostra-se promissora para utilização em programas de fitorremediação, tendo em vista a recuperação de áreas degradadas por Cd o que é potencializado mediante a melhoria do estado nutricional pelo uso de Si.

## 2.6. Referências

ABHILASH, P. C., POWELL, J. R., SINGH, H. B., & SINGH, B. K. Plant–microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies. **Trends in biotechnology**, v.30, n.8, p.416-420, 2012.

ADREES, M., ALI, S., RIZWAN, M., ZIA-UR-REHMAN, M., IBRAHIM, M., ABBAS, F., & IRSHAD, M. K. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.119, p.186-197, 2015.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Cercla prioritylistofhazardoussubstances. Atlanta, 2011. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>>. Acesso em: 2 fevereiro. 2018.

ALI, H., KHAN, E., SAJAD, M.A.. Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, p.869–881, 2013.

ANJUM, S. A., TANVEER, M., HUSSAIN, S., SHAHZAD, B., ASHRAF, U., FAHAD, S., & BAJWA, A. A. Osmoregulation and antioxidant production in maize under combined cadmium and arsenic stress. **Environ Science and Pollution Reserch**. v. 23 p. 11864–11875, 2016.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in Beta vulgaris. **Plant Physiology, Maryland**, v.24, p.1-15, 1949.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, v. 102, n. 4, p. 425-432, 1995.

BLOOM, A.J., MOONEY, H.A., BJÖRKMAN, O., BERRY, J. Material and methods for carbon dioxide and water exchange analysis. **Plant, Cell and Environment** v.3: p.371-376, 1980.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R. (Ed.). (1989). Streßphysiologische Ökosystemforschung Höhenprofil Zillertal. Berger.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Legislação brasileira sobre sementes e mudas**: Lei n° 10.711, de 05 de agosto de 2003 e Decreto n° 5.153, de 23 de julho de 2004. Brasília, DF, 2004. 121 p.

BRASIL. Ministério do meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – Resolução n°420 de 28 de Dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de Dezembro. 2009.

- CHOPPALA, G., SAIFULLAH, BOLAN, N., BIBI, S., IQBAL, M., RENGEL, Z., & OK, Y. S. Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. **Critical reviews in plant sciences**, v.33 n.5, p. 374-391, 2014.
- CUI, J., LIU, T., LI, F., YI, J., LIU, C., & YU, H. Silica nanoparticles alleviate cadmium toxicity in rice cells: mechanisms and size effects. **Environmental Pollution**, v.228, p.363-369, 2017.
- DEDE, G., & OZDEMIR, S. Effects of elemental sulphur on heavy metal uptake by plants growing on municipal sewage sludge. **Journal of environmental management**, v.166, p.103-108, 2016.
- DEGEN, B.; WARD, S.E.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CAVERS, S.; EBBENN, A.M. Verifying the geographic origin of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) with DNA-fingerprints. **Forensic Science International: Genetics**, v.7, n.1, p.55-62, 2013.
- EMAMVERDIAN, A., DING, Y., MOKHBERDORAN, F., & XIE, Y. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 18, 2015.
- FAN, K.C.; HIS, H.C.; CHEN, C.W.; LEE, H.L.; HSEU, Z.Y. Cadmium accumulation and tolerance of mahogany (*Swietenia macrophylla*) seedlings for phytoextraction applications. **Journal of Environmental Management**, v.92, n.10, p.2818-2822, 2011.
- FROHNE, T., DIAZ-BONE, R.A., DU LAING, G., RINKLEBE, J. Impact of systematic change of redox potential on the leaching of Ba, Cr, Sr, and V from a riverine soil into water. **Journal Soils Sed.** v.15, p.623–633, 2015.
- GALLEGO, S.M., PENA, L.B., BARCIA, R.A., AZPILICUETA, C.E., LANNONE, M.F., ROSALES, E.P., ZAWOZNIK, M.S., GROPPA, M.D., BENAVIDES, M.P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**. v.83, p.33–46, 2012.
- GAUTAM S, ANJANI K AND SRIVASTAVA N. *In vitro* evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.22, n.1, p.121-129, 2016.
- GENTY B, BRIANTAIS JM, BAKER NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochim Biophys Acta** v.990, p.87–92, 1989.
- GOSWAMI, S., AICH, K., DAS, S., MUKHOPADHYAY, C. D., SARKAR, D., & MONDAL, T. K. A new visible-light-excitable ICT-CHEF-mediated fluorescence ‘turn-on’probe for the selective detection of Cd 2+ in a mixed aqueous system with live-cell imaging. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 12, p. 5763-5770, 2015.
- GREGER, M., KABIR, A. H., LANDBERG, T., MAITY, P. J., & LINDBERG, S. Silicate reduces cadmium uptake into cells of wheat. **Environmental Pollution**, v.211, p.90-97, 2016.

GU, H. H., QIU, H., TIAN, T., ZHAN, S. S., CHANEY, R. L., WANG, S. Z., & QIU, R. L. Mitigation effects of silicon rich amendments on heavy metal accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) planted on multi-metal contaminated acidic soil. **Chemosphere**, v.83, n.9, p.1234-1240, 2011.

HALLMARK, C. T., WILDING, L. P., & SMECK, N. E. Silicon. **Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties**, n. methodsofsoilan2, p. 263-273, 1982.

HE, J., LI, H., MA, C., ZHANG, Y., POLLE, A., RENNENBERG, H., & LUO, Z. B. Overexpression of bacterial  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase mediates changes in cadmium influx, allocation and detoxification in poplar. **New Phytologist**, v. 205, n. 1, p. 240-254, 2015.

IVANOV YV, KARTASHOV AV, IVANOVA AI, SAVOCHKIN YV AND KUZNETSOV VV. Effects of zinc on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings grown in hydroculture. *Plant Physiol Biochem*, v. 102, p.1-9, 2016.

JI, X., LIU, S., JUAN, H., BOCHARNIKOVA, E. A., & MATICHENKOV, V. V. Effect of silicon fertilizers on cadmium in rice (*Oryza sativa*) tissue at tillering stage. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.11, p.10740-10748, 2017.

KRASKA, J. E., & BREITENBECK, G. A. Simple, robust method for quantifying silicon in plant tissue. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 41, n. 17, p. 2075-2085, 2010.

LAISK, A., & LORETO, F. Determining photosynthetic parameters from leaf CO<sub>2</sub> exchange and chlorophyll fluorescence (ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase specificity factor, dark respiration in the light, excitation distribution between photosystems, alternative electron transport rate, and mesophyll diffusion resistance. **Plant Physiology**, v. 110, n. 3, p. 903-912, 1996.

LI, N., LI, R., FENG, J., ZHANG, Z., & SHEN, F. Remediation effects of heavy metals contaminated farmland using fly ash based on bioavailability test. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v.31, n.16, p.213-219, 2015.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: S. P. Colowick, & N. O. Kaplan (Eds.), *Methods in enzymology*, San Diego, CA: **Academic Pres**, v. 48, p. 350 – 382). 1987.

LYSENKO, E. A., KLAUS, A. A., PSHYBYTKO, N. L., & KUSNETSOV, V. V. Cadmium accumulation in chloroplasts and its impact on chloroplastic processes in barley and maize. **Photosynthesis research**, v.125, n.1-2, p.291-303, 2015.

LUO, Z. B., HE, J., POLLE, A., & RENNENBERG, H. Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. **Biotechnology advances**, v.34, n.6, p.1131-1148, 2016.

MA, J., SHENG, H., LI, X., & WANG, L. iTRAQ-based proteomic analysis reveals the mechanisms of silicon-mediated cadmium tolerance in rice (*Oryza sativa*) cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, 104, 71-80, 2016.

NAEEM, A., SAIFULLAH, REHMAN, M. Z. U., AKHTAR, T., OK, Y. S., & RENGEL, Z. GENETIC variation in cadmium accumulation and tolerance among wheat cultivars at the seedling stage. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.47, n.5, p.554-562, 2016.

NWUGO, C. C., & HUERTA, A. J. Effects of silicon nutrition on cadmium uptake, growth and photosynthesis of rice plants exposed to low-level cadmium. **Plant and soil**, v.311,n.1-2, p.73-86, 2008.

PARROTTA, L., GUERRIERO, G., SERGEANT, K., CAI, G., & HAUSMAN, J. F. Target or barrier? The cell wall of early-and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. **Frontiers in plant science**, v.6, p.133, 2015.

PEREIRA, A. S., CORTEZ, P. A., DE ALMEIDA, A. A. F., PRASAD, M. N. V., FRANÇA, M. G. C., DA CUNHA, M., & MANGABEIRA, P. A. O. Morphology, ultrastructure, and element uptake in *Calophyllum brasiliense* Cambess.(*Calophyllaceae* J. Agardh) seedlings under cadmium exposure. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.18, p.15576-15588, 2017.

PINHEIRO, H.A., SILVA, J.V., ENDRES, L., FERREIRA, V.M., CA^MARA, C.A., CABRAL, F.F., OLIVEIRA, J.F., CARVALHO, L.W.T., SANTOS, J.M., SANTOS FILHO, B.G. Leaf gas exchange, chloroplastic pigments and dry matter accumulation in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings subjected to salt stress conditions. **Industrial Crops and Products** v.27, p.385–392, 2008.

MATHUR S, KALAJIHMAND JAJOO A. Investigation of deleterious effects of chromium phytotoxicity and photosynthesis in wheat plant. **Photosynthetica**, v. 54, n. 2, p. 185-192, 2016.

MIYAZAWA, M., PAVAN, M. A., MURAOKA, T., CARMO, C. A., & MELO, W. J. D. Análise química de tecido vegetal. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**, 2009.

RAHMAN, M. F., GHOSAL, A., ALAM, M. F., & KABIR, A. H. Remediation of cadmium toxicity in field peas (*Pisum sativum* L.) through exogenous silicon. **Ecotoxicology and environmental safety**, 135, 165-172, 2017.

RASCHER, U., LIEBIG, M., & LÜTTGE, U. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field.. **Plant, Cell & Environment**, v. 23, n. 12, p. 1397-1405, 2000.

RIZWAN, M., ALI, S., QAYYUM, M. F., IBRAHIM, M., ZIA-UR-REHMAN, M., ABBAS, T., & OK, Y. S. Mechanisms of biochar-mediated alleviation of toxicity of trace

elements in plants: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, n.3, p.2230-2248, 2016.

RUI, H., CHEN, C., ZHANG, X., SHEN, Z., & ZHANG, F. Cd-induced oxidative stress and lignification in the roots of two *Vicia sativa* L. varieties with different Cd tolerances. **Journal of hazardous materials**, v.301, p. 304-313, 2016.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, **Jaboticabal**, v.1, n.3, p.231-233, 1975.

SHAO JF, CHE J, YAMAJI N, SHEN RF, MA JF. Silicon reduces cadmium accumulation by suppressing expression of transporter genes involved in cadmium uptake and translocation in rice. **Journal of experimental botany**, v. 68, n. 20, p. 5641-5651, 2017.

SILVA, A. J., NASCIMENTO, C. W. A., & GOUVEIA-NETO, A. S. Assessment of cadmium phytotoxicity alleviation by silicon using chlorophyll a fluorescence. **Photosynthetica**, v.55, n.4, p.648-654, 2017.

SLOT, M., & WINTER, K. Photosynthetic acclimation to warming in tropical forest tree seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 9, p. 2275-2284, 2017.

TAUQEER, H. M., ALI, S., RIZWAN, M., ALI, Q., SAEED, R., IFTIKHAR, U., & ABBASI, G. H. Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: growth and physiological response. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.126, p. 138-146, 2016.

TRIPATHI, D. K., SINGH, S., SINGH, V. P., PRASAD, S. M., DUBEY, N. K., & CHAUHAN, D. K. Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.110, p.70-81, 2017.

WILKINS, D. A. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. **New Phytologist**, v. 80, n. 3, p. 623-633, 1978.

WU, J., GEILFUS, C. M., PITANN, B., & MÜHLING, K. H. Silicon-enhanced oxalate exudation contributes to alleviation of cadmium toxicity in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v.131, p.10-18, 2016.

YU, H. Y., DING, X., LI, F., WANG, X., ZHANG, S., YI, J., & WANG, Q. The availabilities of arsenic and cadmium in rice paddy fields from a mining area: the role of soil extractable and plant silicon. **Environmental Pollution**, v.215, p.258-265, 2016.

ZHANG, X., GAO, B., & XIA, H. Effect of cadmium on growth, photosynthesis, mineral nutrition and metal accumulation of bana grass and vetiver grass. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 106, p. 102-108, 2014.

### 3. FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO POR *Khaya ivorensis* A. Chev. MITIGAÇÃO DO ESTRESSE POR SILÍCIO NO SISTEMA ANTIOXIDANTE.

#### Resumo

Neste estudo, plantas de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev.), cultivadas em solução nutritiva foram testadas para analisar o potencial fitorremediador ao cádmio (Cd), tomando-se como base a magnitude das alterações na produção de biomassa, na peroxidação lipídica por meio do teor de malonaldeído (MDA) e nas respostas antioxidantes enzimáticas e investigar o papel do silício (Si) nas modulações sobre essas variáveis na mitigação do estresse induzido por Cd, 60 dias após a exposição ao metal pesado (MP) e à nutrição silicatada. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, conforme delineamento em blocos casualizados 4x4 com cinco repetições, e os fatores constituídos por níveis crescentes do MP (Cd 0, 25, 50 e 75 mg L<sup>-1</sup>) e doses de silício (Si 0, 100, 150 e 300 mg L<sup>-1</sup>). Realizou-se a análise de regressão polinomial. Em geral, o Si promoveu efeito positivo sobre a toxicidade de Cd, minimizando a absorção e acúmulo do MP na parte aérea, o que ficou evidente nos menores teores e índices de translocação de Cd respectivos de 80% e 47% observados nas plantas mantidas em condições mais severas de toxicidade por Cd e que receberam doses intermediárias de Si. O restabelecimento do metabolismo vegetal foi comprovado pela produção de biomassa da parte aérea 80% superior ao das plantas estressadas. Além disso, pela análise canônica, o tratamento combinado (Cd 40 mg L<sup>-1</sup> x Si 160 mg L<sup>-1</sup>) induziu em aumento na atividade das enzimas antioxidantes. A dismutase do superóxido (SOD) e a catalase (CAT) tiveram suas expressões acrescidas em 54%, e 44% ao passo que houve uma diminuição de 65% no teor de MDA, o que indicou redução dos danos oxidativos nos cloroplastos evidenciado pelos decréscimos das espécies reativas de oxigênio (ROS). Os resultados encontrados neste estudo confirmam o papel do Si no aumento da tolerância de *K. ivorensis* ao Cd, especialmente, pelas modulações no metabolismo bioquímico e antioxidante dessa espécie. Em adição, a regulação do menor acúmulo e translocação do metal pesado configuraram como mecanismo chave do Si sobre as variáveis analisadas e potencializou o caráter fitorremediador do mogno africano ao Cd.

**Palavras-chave:** Cádmium. Sílica. Mitigação. Estresse oxidativo. Fitorremediação.

## Abstract

In this study, African mahogany (*Khaya ivorensis* A. Chev.) Plants cultivated in nutrient solution were tested to analyze the cadmium phytoremediation potential (Cd), based on the magnitude of changes in biomass production, in lipid peroxidation through malonaldehyde (MDA) content and enzymatic antioxidant responses and to investigate the role of silicon (Si) in modulating these variables in mitigating Cd-induced stress 60 days after exposure to heavy metal (MP) and silicate nutrition. The experiment was conducted in a greenhouse, according to a 4x4 randomized block design with five replications, and the factors constituted by increasing MP levels (Cd 0, 25, 50 e 75 mg L<sup>-1</sup>) and silicon doses (Si 0, 100 , 150 e 300 mg L<sup>-1</sup>). Polynomial regression analysis was performed. In general, Si promoted a positive effect on Cd toxicity, minimizing the absorption and accumulation of MP in the shoots, which was evident in the lower levels and respective Cd translocation indexes of 80% and 47% observed in plants maintained in Cd more severe Cd toxicity conditions that received intermediate doses of Si. Restoration of plant metabolism was confirmed by the biomass production of the shoot 80% higher than that of stressed plants. Moreover, by canonical analysis, the combined treatment (Cd 40 mg L<sup>-1</sup> x Si 160 mg L<sup>-1</sup>) induced an increase in antioxidant enzyme activity. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) had their expressions increased by 54%, and 44% while there was a 65% decrease in MDA content, which indicated a reduction in chloroplast oxidative damage evidenced by decreases reactive oxygen species (ROS). The results found in this study confirm the role of Si in increasing tolerance of *K. ivorensis* to Cd, especially by modulation in biochemical and antioxidant metabolism of this species. In addition, the regulation of lower heavy metal accumulation and translocation configured as a key mechanism of Si over the analyzed variables and enhanced the phytoremediation character of african mahogany to Cd.

**Keywords:** Cadmium. Silica. Mitigation. Oxidative stress. Phytoremediation,

### 3.1. Introdução

O Cádmiio (Cd) é um metal pesado (MP) extremamente tóxico para plantas e altamente persistente no meio ambiente (CHEN et al., 2019). Nos solos, a concentração do MP varia entre 0,03 e 20 mg kg<sup>-1</sup> em que as atividades antrópicas contribuem de 3 a 10 vezes mais para a contaminação do ambiente com o íon metálico (SAUERBECK, 1989; LI et al., 2017). Estima-se que 54% a 58% do Cd encontrado nos solos, provêm das práticas agrícolas via adubação fosfatada, e pelo lodo de esgoto, insumos utilizados no cultivo de espécies agrônômicas e pela mineração (TIRADO, R., & ALLSOAPP, 2012; CHEN et al., 2019).

Ainda que acumulado em concentrações diminutas como 6 mg kg<sup>-1</sup> no tecido vegetal, o Cd, promove desordens em processos metabólicos chaves como a fotossíntese, a respiração, desbalanço na homeostase iônica o que causa sérias implicações sobre o crescimento das plantas (ALI et al., 2014; STOHS & BAGCHI, 1995; JI et al., 2017).

Embora seja um metal não redox, o Cd, desencadeia o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) compostos altamente reativos, que causam danos oxidativos (ASHRAF, 2013; ZHAO et al., 2016; LI et al., 2017). Recentes pesquisas realizadas por Silva et al., (2017), mostraram danos fotoinibitórios ao fotossistema II como consequência da elevada concentração das ROS nas células, o que decorreu da presença de Cd no metabolismo celular.

Dentre as enzimas antioxidantes envolvidas na detoxificação das ROS, destacam-se a dismutase do superóxido (SOD; E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6) e a peroxidase do ascorbato (APX; E.C.1.11.1.11). Essas enzimas convertem compostos potencialmente danosos ao metabolismo vegetal em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  e previnem danos oxidativos (WANG et al., 2013; GILL, et al., 2015; SILVA et al., 2017; CONCEIÇÃO et al., 2019).

Como a transferência de Cd do solo para as diversas espécies vegetais é bastante eficiente, a toxicidade do MP nas plantas é uma preocupação em âmbito global. Assim, a adoção de estratégias para minimizar essa transferência é uma necessidade urgente e, nesse aspecto, a intensificação de estudos sobre a nutrição mineral visando à atenuação de fatores estressantes às plantas tem sido alvo de investigação.

O Silício (Si) é o segundo elemento químico mais abundante na crosta terrestre e configura como mineral matriz de crescimento e de desenvolvimento para muitas plantas (ZHANG et al., 2013). O nutriente é reconhecido como um elemento benéfico por conferir proteção às plantas contra estresses bióticos e abióticos (DORNELES a et al., 2017; ARAÚJO et al., 2019; CHEN et al., 2019; CONCEIÇÃO et al., 2019; HAWERROTH et al., 2019).

Em estudos sobre estresse induzido por metais tóxicos, o Si, tem mostrado eficiente efeito mitigador, sobre tudo, por reduzir a absorção de metais pesados pelo sistema radicular de plantas (IMTIAZ et al., 2016; SHAO et al., 2017; WEI et al., 2018) monocotiledôneas (WU et al., 2016; HUANG et al., 2018; LIN et al., 2018) e dicotiledôneas (SHI et al., 2017; PEREIRA et al., 2018; RADY et al., 2019). O mecanismo primário de mitigação do estresse por MP induzido pela sílica consiste na sua deposição na endoderme radicular, reduzindo a absorção de íons tóxicos Ma e Guo, (2014) e restringindo a translocação para os órgãos da parte aérea devido a um bloqueio físico da rota apoplástica (DA CUNHA & NASCIMENTO, 2009). Outro mecanismo de mitigação promovido pelo Si está relacionado com o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, que neutralizam radicais livres produzidos a partir de níveis tóxicos de MP e, dentre eles, o Cd (MOHAMED et al., 2012; IRFAN et al., 2014; PEREIRA et al., 2018).

As plantas diferem na capacidade de absorver silício o que é, em parte, atribuído à peculiaridades da membrana plasmática e às concentrações desse nutriente no meio externo (LIANG et al., 2006; MA; YAMAJI, 2008). O mogno africano ou *Khaya ivorensis* A. Chev. é uma espécie arbórea pertencente à família Meliaceae, que apresenta grande importância econômica devido ao valor de sua madeira. No Brasil, sua introdução e cultivo ocorreram devido à necessidade de substituir o mogno nativo (*Swietenia macrophylla*). Apesar das semelhanças entre as espécies e de haver alguns estudos sobre toxicidade de poluentes em *Swietenia macrophylla* FAN et al., (2011); Pérez-Hernández et al., (2017), pouco se sabe sobre o nível de resistência de *K. ivorensis* à toxicidade por Cd e sobre a modulação do Si na atenuação do estresse provocado por àquele metal pesado no metabolismo bioquímico e fisiológico dessa espécie.

Desse modo, o experimento foi conduzido para avaliar o efeito mitigador do Si em plantas de mogno africano tratadas com cádmio em solução nutritiva e investigar o aumento da tolerância e mecanismos de extração do MP por *K. ivorensis* induzidos pelo nutriente. Para isso, tomou-se como base os parâmetros sobre biodisponibilidade, translocação, índice de tolerância ao íon tóxico, atividade das enzimas antioxidantes SOD, APX e CAT, bem como, danos à membrana por meio da peroxidação lipídica.

## 3.2. Material e métodos

### 3.2.1. *Material vegetal e condições de crescimento.*

O experimento foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil, localizada a 01 ° 28'03 "S; 48 ° 29'18 "W. O genótipo utilizado neste ensaio foi o de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev). A descrição detalhada da área de estudo, bem como, as condições de crescimento e delineamento experimental utilizado, foram apresentados no capítulo 2 nas páginas 38, 39 e 43, respectivamente.

### 3.2.2. *Coleta das plantas e determinações biométricas e da massa seca*

A coleta das plantas ocorreu aos 300 DAS às 05:30h e, nesse momento, mensurada a variável biométrica altura da planta (H), com o auxílio de régua centimétrica. Amostras de raízes, caules e folhas de cada tratamento, foram reservadas separadamente em sacos de papel e levadas a estufa de ventilação de ar forçada, mantendo-se a temperatura de 65°C por 72h até atingirem a massa constante. O material seco foi pesado e determinada a matéria seca: da parte aérea (MSPA); da raiz (MSR) e a total (MST). Na sequencia, o material foi moído em moinho tipo Wiley equipado com peneira de 0,038mm, até a obtenção de um pó fino e, devidamente armazenado em tubos de falcon, até a sua utilização nos ensaios para a análise das concentrações de cádmio e de silício encontradas na matéria seca das plantas. Parte do material vegetal *in vivo*, foi utilizado para estimar as atividades enzimáticas e o conteúdo de malonoaldeído (MDA). Para isso, tecido de folhas, caules e raízes foram primeiramente congelados em ultrafreezer a -80 °C sendo posteriormente liofilizados.

### 3.2.3. *Enzimas antioxidantes*

Os extratos enzimáticos foram preparados por homogeneização de 100 mg de pó liofilizado de folhas e raízes num almofariz frio com 5,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M a pH 7,0, contendo 0,1 mM de EDTA. Para a estimativa da atividade de APX, adicionou-se ascorbato 2 mM ao tampão de extração. O homogeneizado foi filtrado através de tecido de nylon e centrifugado a 12.000 × g por 15 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 ° C e o sobrenadante (extrato) foi armazenado a -25 ° C até a análise.

A atividade de SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada medindo a sua capacidade para inibir a redução fotoquímica do cloreto de nitro azul de tetrazólio (NBT), como previamente descrito por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Uma unidade de atividade SOD

foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da taxa de fotoredução do NBT, e os resultados foram expressos como proteína U mg<sup>-1</sup>. A atividade de APX (EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com o método descrito por Nakano e Asada (1981), monitorando a oxidação do ascorbato, que foi medida como a diminuição da absorvância a 290 nm ( $\epsilon = 2,8 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A atividade da APX foi expressa em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína. A atividade CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com Beers Jr. e Sizer (1952), monitorando a diminuição na absorvância a 240 nm devido à quebra de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A atividade da CAT foi expressa como  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de proteína.

### **3.2.4. Peroxidação lipídica, (MDA)**

A peroxidação lipídica foi expressa como equivalentes de malondialdeído (MDA) calculados a partir do conteúdo total de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, de acordo com Cakmak e Horst (1991) com modificações. A absorvância (Abs) das amostras a 532 nm foi corrigida por interferências descontando a Abs a 600 nm. O conteúdo de MDA foliar foi calculado a partir do seu coeficiente de extinção ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### **3.2.5. Análise da concentração de cádmio**

A análise de cádmio foi processada em triplicata de acordo com Silva (2009). A descrição pormenorizada dessa metodologia encontra-se no capítulo 2 na página 42.

#### **3.2.5.1. Índice de tolerância (IT) para Cd**

O índice de tolerância à Cd foi estimado segundo o método descrito por Wilkins (1978). A análise metodológica literal encontra-se no capítulo 2 na página 42.

#### **3.2.5.2. Fatores de bioacumulação e de translocação de Cd nas plantas**

Em plantas mantidas sob estresse por cádmio (Cd), foram determinados os fatores de bioacumulação (FB) e de translocação (FT) de Cd nas plantas conforme a metodologia descrita por Zhang et al, (2014), o que foi previamente detalhado no capítulo 2 na página 42.

### **3.2.6. Análise da concentração de Silício (Si)**

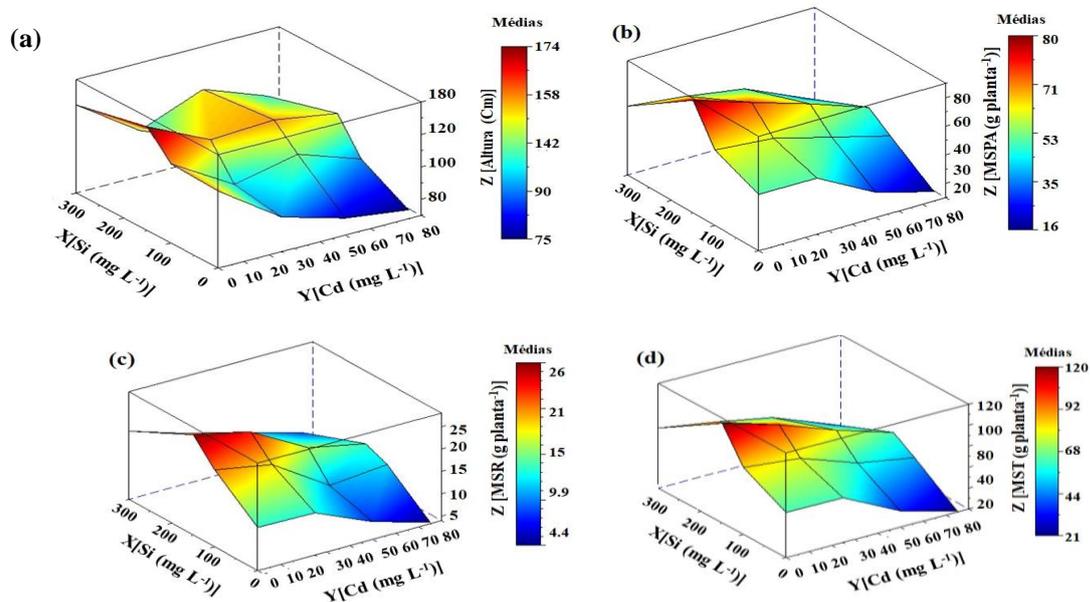
A determinação do silício ocorreu conforme o método descrito por Kraska e Breitenbeck (2010). A metodologia pormenorizada encontra-se descrita no capítulo 2 na página 43.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Variáveis biométricas

Pela análise de superfície de resposta fica evidente que plantas de *Khaya ivorensis* submetidas aos níveis crescentes de Cd tiveram os parâmetros de crescimento e produção de biomassa significativamente reduzidos ( $p < 0,01$ ) quando utilizada a maior concentração de cádmio (Cd) ( $75 \text{ mg L}^{-1}$  Cd). De fato, houve reduções nessas variáveis à medida que a concentração de Cd aumentou, e concomitante elevação desses valores, quando a concentração de Si foi aumentada (Figura 3.1).

Figura 3.1. Altura (H;a), matéria seca da parte aérea (MSPA; b), matéria seca das raízes (MSR; c) e matéria seca total (MST; d) de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_H = 110,274695^{**} - 0,837162Y^{**} + 0,219755X^{**} + 0,004980 Y^2^{**} + 0,000952XY^{**} - 0,000626X^2^{**} \quad (R^2=0,77)$$

$$Z_{MSPA} = 49,735413^{**} + 0,333365^{**}X + 0,223817^{**}Y - 0,000994^{**}X^2 + 0,0253^{**}Y.X - 0,003237^{**}Y^2 \quad (R^2=0,89)$$

$$Z_{MSR} = 14,964081^{**} + 0,109855^{**}X - 0,152410^{**}Y - 0,000313^{**}X^2 - 0,037779^{**}Y.X + 0,000113^{**}Y^2 \quad (R^2=0,85)$$

$$Z_{MST} = 64,699494^{**} + 0,443220^{**}X - 0,376228^{**}Y - 0,001308^{**}X^2 + 0,00216^{**}Y.X - 0,003124^{**}Y^2 \quad (R^2=0,90)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ ).

A massa seca da parte aérea (MSPA) (Figura 3.1; b) foi a variável mais afetada pelas concentrações crescentes de Cd. Pela equação de regressão ( $Z_{MSPA}$ ), fica evidente que, a maior concentração do metal, induziu em decréscimos de 78% nessa variável quando comparadas ao controle.

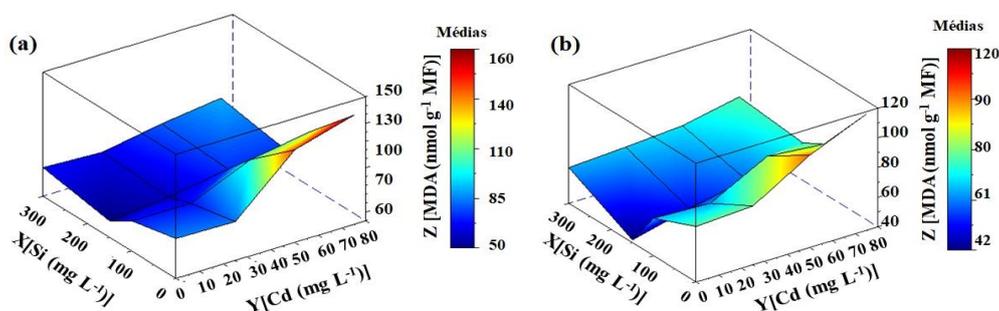
Por outro lado, os maiores valores da H, MSPA, MSR e MST (Figura 3.1) foram observados na ausência de Cd e na concentração intermediária de Si, ocasião em que o aumento induzido pelo nutriente foi máximo. Os efeitos mais expressivos da suplementação silicatada ocorreram sobre a MSPA (Figura 3.1, b). Na presença de Si a 150 mg L<sup>-1</sup>, plantas mantidas sob estresse por Cd a 75mg L<sup>-1</sup> apresentaram incrementos na H e MSPA de 58% e 80%, respectivamente, em comparação ao tratamento isolado com Cd 75mg L<sup>-1</sup>.

A interação significativa ( $p<0,01$ ) entre os fatores concentrações de (Cd) e dosagens de silício (Si), mostrou que o nutriente promoveu acréscimos nas variáveis analisadas nas plantas estressadas pelo metal pesado, sobre tudo, quando utilizada a dose intermediária de Si. Pela análise canônica, os pontos ótimos das concentrações de Cd e de Si que induziram na maior (H) e MSPA foram de (Cd 31 mg L<sup>-1</sup> X Si 162 mg L<sup>-1</sup>) e (Cd 27 mg L<sup>-1</sup> x Si 160 mg L<sup>-1</sup>) concomitantemente. Sob efeito desse tratamento, essas variáveis foram 44% e 34% simultaneamente superiores àquelas observadas no tratamento isolado com Cd 50 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.3.2. Peroxidação lipídica, (MDA)

A análise de variância mostrou que, para o conteúdo de MDA, houve significância ( $p<0,01$ ) da interação entre os níveis de Cd e dosagens de silício em folhas e raízes de plantas de mogno (Figura 3.2). A variável ajustou-se ao modelo de regressão polinomial quadrática.

Figura 3.2. Peroxidação lipídica avaliada como malondialdeído (MDA,) em folhas (a) e raízes (b) de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{\text{MDA folha}} = 86,015300^{**} - 0,356351^{**}X + 0,708319^{**}Y + 0,001081^{**} X^2 - 0,002973^{**}Y.X + 0,03620^{*}Y^2 (R^2=0,86)$$

$$Z_{\text{MDA raiz}} = 77,291133^{**} + 0,325884^{**}X - 0,374152^{**}Y - 0,000941^{**} X^2 - 0,001219^{*}Y.X + 0,1960^{*}Y^2 (R^2=0,88)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\* $p<0,001$ ; \* $p<0,05$ ).

Houve acréscimos expressivos no teor de MDA com o aumento da concentração de Cd no meio de cultivo, especialmente na ausência de Si, ocasião em que a peroxidação

lipídica atingiu pontos máximos de 152 e 95 nmol g<sup>-1</sup> MF, em folhas e raízes, respectivamente, o que foi 69% e 63% superior ao conteúdo de MDA encontrado nas plantas controle (Figura 3.2). A equação de regressão ( $Z_{\text{MDA folha}}$ ) comprova que o tecido foliar foi o mais afetado pelos aumentos crescentes de Cd no meio de cultivo.

No entanto, o Si, reverteu os efeitos tóxicos do metal o que ficou evidente pelos decréscimos graduais na peroxidação lipídica, simultaneamente à elevação dos níveis de Si no tecido vegetal até a concentração de Si 150 mg L<sup>-1</sup>. A concentração máxima do nutriente Si 300 mg L<sup>-1</sup>, no entanto, não produziu efeitos positivos significativos ( $p > 0,01$ ) na redução da peroxidação lipídica.

A análise canônica confirma os pontos ótimos das concentrações de Cd e de Si (Cd 28 mg L<sup>-1</sup> x Si 174 mg L<sup>-1</sup>); (Cd 31 mg L<sup>-1</sup> x Si 167) que resultaram no menor conteúdo de MDA 60 e 45 nmol g<sup>-1</sup> MF, em folhas e raízes, respectivamente. Sob efeito do tratamento interação o teor de MDA foi 53% e 65%, concomitantemente, menores naqueles tecidos em relação à concentração de MDA das plantas mantidas em tratamento isolado com Cd a 50 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.3.3. Atividade das enzimas antioxidantes

Pela análise de superfície de resposta nota-se que, na ausência do tratamento com Si e na presença da maior concentração do metal (Cd 75 mg L<sup>-1</sup>), houve decréscimos significativos ( $p < 0,01$ ) na atividade das enzimas antioxidantes, a dismutase do superóxido (SOD), a peroxidase do ascorbato (APX), Catalase (CAT) nas plantas de mogno africano (Figura 3.3).

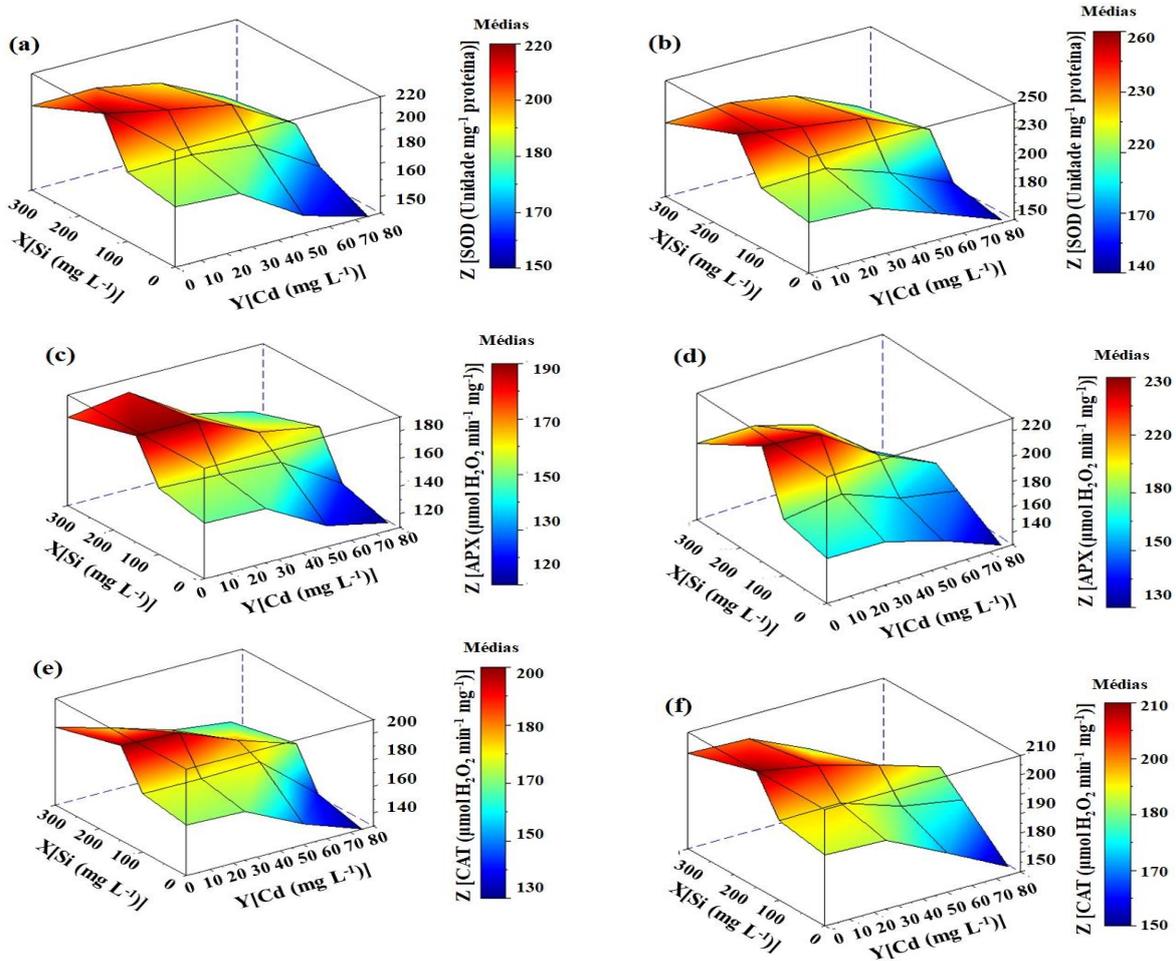
Nestas condições, no sistema radicular, o metabolismo das enzimas atingiu pontos mínimos de 130 Unidade mg<sup>-1</sup> proteína, 100 e 120 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectivamente, conforme mostrado pelo ajuste da equação de regressão ( $Z_{\text{SOD raiz}}$ ;  $Z_{\text{APX raiz}}$ ;  $Z_{\text{CAT raiz}}$ ) o que foi 51%, 43% e 60%, inferiores ao das plantas controle. Enquanto que, nas folhas, as reduções nessas variáveis foram mais expressivas na ordem de 59% e 63% e 69%. Em ambos os órgãos analisados, a CAT foi a enzima mais afetada pelos níveis crescentes de Cd (Figura 3.3; c,d).

De modo geral, as reduções nas atividades enzimáticas foram revertidas pelo Si. Houve aumentos exponenciais quadráticos no metabolismo das enzimas no sistema foliar e radicular no momento em que a concentração do nutriente foi elevada no meio de cultivo até a dose intermediária de Si 150 mg L<sup>-1</sup>.

Houve interação significativa ( $p < 0,01$ ), entre as concentrações do nutriente e do metal pesado para todas as variáveis analisadas, e em todos os órgãos estudados. Os efeitos mais

expressivos da nutrição silicatada sobre o aumento da atividade antioxidante ocorreram nas raízes das plantas.

Figura 3.3. Atividade da dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT) em folhas (a, c, e) e raízes (b, d, f) de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{\text{SOD folha}} = 183,031733* + 0,280298**X + 0,1664*Y - 0,000724** X^2 + 0,00562**Y.X - 0,006560*Y^2 (R^2=0,86)$$

$$Z_{\text{SOD raiz}} = 197,907833** + 0,459107**X + 0,94313**Y - 0,001140* X^2 + 0,884**Y.X - 0,012220**Y^2 (R^2=0,81)$$

$$Z_{\text{APX folha}} = 146,273400** + 0,19357*X + 0,332748*Y + 0,000770* X^2 + 0,052053*Y.X - 0,005800*Y^2 (R^2=0,80)$$

$$Z_{\text{APX raiz}} = 161,732900 * + 0,424521**X + 0,282463 *Y - 0,001027** X^2 - 0,000886* Y.X + 0,08220*Y^2 (R^2=0,82)$$

$$Z_{\text{CAT folha}} = 166,119367** + 0,303561**X + 0,89919*Y - 0,000810** X^2 + 0,317*Y.X - 0,005540**Y^2 (R^2=0,86)$$

$$Z_{\text{CAT raiz}} = 183,361267** + 0,245095**X - 0,75043*Y - 0,000643** X^2 - 0,0212**Y.X - 0,003480*Y^2 (R^2=0,88)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\*p<0,001 e \*p<0,05).

Pela regressão polinomial, os pontos ótimos obtidos para a atividade enzimática nas folhas ocorreram com tratamento combinado de Cd e de Si nas concentrações de (Cd 42 mg

$L^{-1}$  x Si  $129 \text{ mg L}^{-1}$ ) para SOD; (Cd  $40 \text{ mg L}^{-1}$  x Si  $139 \text{ mg L}^{-1}$ ) para APX; (Cd  $30 \text{ mg L}^{-1}$  x Si  $163 \text{ mg L}^{-1}$ ) para a CAT. Nessas condições, ocorreram incrementos exponenciais quadráticos dessas variáveis no tecido foliar, respectivos de 35%, 23% e 17%.

Nas raízes, os pontos ótimos para a atividade da SOD, APX e CAT ocorreram com as doses de (Cd  $37 \text{ mg L}^{-1}$  x Si  $150 \text{ mg L}^{-1}$ ); ( $40 \text{ mg L}^{-1}$  x Si  $141 \text{ mg L}^{-1}$ ); (Cd  $43 \text{ mg L}^{-1}$  x Si  $131 \text{ mg L}^{-1}$ ), simultaneamente. No tratamento interação, as enzimas expressaram a máxima atividade e foram 54%, 44% e 34% superiores, respectivamente, ao tratamento isolado com o íon tóxico na concentração de Cd  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Em resposta ao Si, a SOD expressou os maiores incrementos enzimáticos em ambos os órgãos analisados sob efeito daquele tratamento combinado (Figura 3.3; a, b).

### 3.4. Discussão

Os resultados do presente estudo confirmam que *Khaya ivorensis* tolera níveis de Cd de até  $25 \text{ mg L}^{-1}$  após 60 dias de exposição ao MP, tendo em vista que a peroxidação lipídica pela concentração de MDA e a produção de biomassa vegetal não diferiram entre as plantas submetidas àquele nível de toxicidade e as controle. Níveis similares de resistência ao encontrado neste estudo foram observados em *Swietenia macrophylla* (Fan et al., 2011), *Salix fragilis* (Evlard et al., 2014) e *Populus euramericana* (Nikolić et al., 2017).

A performance antioxidante (Figura 3.3) do mogno africano foi suficiente em reduzir o estresse oxidativo desencadeado por níveis mais severos de Cd, o que foi mediado pela nutrição com Si à  $150 \text{ mg L}^{-1}$  e permitiu, desse modo, o restabelecimento do metabolismo vegetal, o que ficou evidenciado pela retomada do crescimento satisfatório das plantas (Figura 3.1).

No entanto, um ligeiro aumento das ROS, foi observado em resposta à menor dosagem do MP o que, provavelmente, está relacionado a eventos de sinalização requeridos para aclimação do mogno africano à presença do íon tóxico. Nessas condições, mudas de *K. ivorensis* promoveram a proteção celular contra danos oxidativos o que foi adequadamente alcançada pelos incrementos na atividade das enzimas antioxidantes, SOD, APX e CAT (Figura 3.3), em vez de mecanismos dissipativos como a fotorrespiração o que foi similarmente confirmado em estudos anteriores (LI et al., 2017; RAHMAN et al., 2017; TAI et al., 2017; RIZWAN et al., 2018).

De modo similar, a análise proteômica foliar, de espécies lenhosas, tolerantes, demonstrou o enriquecimento de enzimas antioxidantes e de proteínas envolvidas no

sequestro e desintoxicação de MPs, quando submetidas às baixas concentrações de íons tóxicos (LUO et al., 2016; GONG et al., 2017).

Plantas podem tolerar estresse por Cd até certo nível aumentando a atividade de enzimas do estresse oxidativo, no entanto, as respostas adaptativas estão diretamente ligadas à espécie vegetal, ao metal e à sua concentração e ao tempo de exposição (AKHTAR 2017; RIZWAN et al., 2018). Observamos que os tratamentos mais severos de Cd reduziram a atividade das enzimas antioxidantes. De fato, médias e altas concentrações do MP, aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio como resultado da menor atividade ou da inativação do sistema antioxidante do mogno africano (Figura 3.3).

O Cd é um elemento químico não redox e, por isso, não participa diretamente na produção de estresse oxidativo. Ele induz a formação indireta das ROS por meio não enzimático e enzimático, através da ativação de um NADPH oxidase e pelo aumento na atividade da dismutase do superóxido em vários compartimentos celulares (CHMIELOWSKA-BAK et al., 2016). Além disso, o aumento da concentração das ROS em resposta ao Cd decorre da sua ligação à grupamentos tióis, ácidos carboxílicos e resíduos de histidina em proteínas específicas de membrana, promovendo sua inativação o que acelera a produção de compostos oxidantes (SHARMA & DIETZ, 2009; ZHANG et al., 2014).

A presença de metais pesados predispõe a uma baixa disponibilidade de adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada ( $\text{NADP}^+$ ), que constitui um aceptor de elétrons no fotossistema I. Sendo assim, ocorre um efeito competitivo entre o oxigênio e o  $\text{NADP}^+$  com agentes redutores, o que gera as ROS tais como o oxigênio singlet ( $^1\text{O}_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) (NABATI, *et al.*, 2011; RISHI; SNEHA, 2013). Os cloroplastos, mitocôndrias e metabolismo oxidativo nos peroxissomos constituem os principais sítios de produção desses compostos (SHARMA & DIETZ 2009).

Em condições normais de crescimento, as plantas mantêm um equilíbrio entre a produção e a eliminação das ROS dos compartimentos celulares. No entanto, a homeostase redox é alterada pela toxicidade de Cd conforme as evidências encontradas em (RIZWAN et al., 2016; GONG et al., 2017; LI et al., 2017; RAHMAN et al., 2017; TAI et al., 2017; RIZWAN et al., 2018). Os desequilíbrios entre a produção de ATP e NADPH pelas reações fotoquímicas e seu uso para a assimilação de  $\text{CO}_2$  durante as etapas fotossintéticas anteriormente relatadas neste estudo (Figura 2.6), induziram a superredução de componentes de cadeia fotoquímica. Neste sentido, a excitação continuada de ambos os fotossistemas,

associada a uma incapacidade de dissipar o excesso de energia de excitação, desencadeou o estresse oxidativo em *K. ivorensis* submetidas aos tratamentos mais severos com Cd.

A menor regulação da SOD no tecido radicular (Figura 3.3; b) em resposta ao aumento na concentração de Cd está, provavelmente, relacionada à substituição de íons  $Zn^{2+}$  do centro catalítico da enzima Cu/Zn-SOD por  $Cd^{2+}$  o que altera sua estrutura, tornando-a sem função levando à sua degradação. Sendo assim, considera-se que algo semelhante tenha ocorrido. Kupper & andresen, (2016), também observaram decréscimos na atividade da SOD em plantas submetidas às concentrações de Cd.

Em outra via, o disparo na superprodução das ROS nos cloroplastos em condições extremas de toxicidade por Cd foi eficientemente controlado pela maior atividade das enzimas antioxidantes, o que foi mediado pelo Si, indicando que o nutriente aumenta a tolerância das plantas ao MP. De acordo com estudos anteriores, a aplicação exógena de Si melhora a capacidade de eliminação das ROS e regula a atividade de enzimas chaves do estresse oxidativo (TORABI et al., 2015; KIM et al., 2016; TRIPATHI et al., 2017).

Mudas de *K. ivorensis* tratadas com Cd e que receberam suplementação silicatada, mostraram uma sobre expressão na atividade da SOD, principalmente no sistema radicular. A SOD é considerada a primeira enzima da linha de frente contra o estresse oxidativo e atua na dismutação do radical superóxido  $\cdot O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ .

As reações no fotossistema I, em que os elétrons são transferidos da ferredoxina imediatamente para o  $O_2$  (reação de Mehler) em detrimento da redução pelo  $NADP^+$  são responsáveis pela geração do  $\cdot O_2^-$ , nos cloroplastos. Esse radical livre apresenta reatividade seletiva a alguns componentes celulares, sendo altamente reativo à proteínas, em particular, as que apresentam átomos de Fe e S (CHMIELOWSKA-BAK et al., 2014, GILL et al., 2015).

Neste sentido, o aumento da expressão da SOD, modulada pelo Si em resposta ao Cd, demonstra que o micronutriente tem um papel importante na mitigação do estresse pelo MP na medida em que induziu à dismutação do  $\cdot O_2^-$  pela enzima. Em adição, a melhoria nas respostas antioxidantes das plantas em função da nutrição silicatada, foi paralelamente acompanhada pela redução da toxicidade do Cd, o que ficou evidente pelos decréscimos no teor de MDA (Figura 3.2) um agente citotóxico produto da peroxidação lipídica, e aparece como um importante indicador de danos à membrana plasmática, e serve de parâmetro na avaliação do estresse oxidativo (CARNEIRO et al., 2017; KIM et al., 2017; NEVES et al., 2019).

De fato, plantas de *K. ivorensis* mantidas em condição de estresse por Cd e que receberam doses crescentes de Si mostraram supressão nos danos à membrana (Figura 3.2) o

que atribuímos à modulação do micronutriente na redução da concentração do peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , um composto não radicalar que liga-se à metais de transição como o Cd e forma o radical hidroxila ( $HO\cdot$ ), o mais deletério ao organismo por possuir meia-vida curta, o que dificulta o sequestro *in vivo*. Os sítios alvo do  $HO\cdot$  são as proteínas e os lipídios de membrana (GILL & TUTEJA, 2015).

A CAT converte o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  e, por isso, é considerada como a principal enzima responsável pela manutenção de níveis ideais de  $H_2O_2$  no metabolismo vegetal. Os sítios de atuação dessa enzima são peroxissomos e glioxissomos. Assim, o aumento na atividade da CAT em folhas e raízes (Figura 3.3 c; d) do mogno africano apresentou correlação negativa com os danos à membrana expressos pelo menor teor de MDA (Figura 3.2) no vegetal conforme, também, relatado em pesquisas prévias (CARNEIRO et al., 2017; LI et al., 2017).

O aumento da tolerância ao Cd por *K. ivorensis* mediada pelo Si, é explicada pela redução na biodisponibilidade (Figura 2.8) e na translocação de Cd no interior celular (Figura 2.9). O Si induziu no maior acúmulo do MP no tecido radicular das plantas e inibiu sua ascensão radial para as partes aéreas, o que confirma o mecanismo de fitoestabilização do metal pesado induzido pelo nutriente.

Desse modo, inferimos que o Si restringiu a ligação do Cd à compostos oxidantes como  $H_2O_2$  com efeito positivo na menor peroxidação dos lipídios. Autores como Pereira et al. (2018), afirmam que o Si reduz a absorção e a translocação de Cd para a parte aérea, o que resulta no aumento na atividade antioxidante e na menor concentração de MDA em folhas. De fato, demonstramos que as menores concentrações e translocações de Cd no tecido vegetal ocorreram simultaneamente aos níveis crescentes de Si, o que reduziu os danos oxidativos ao metabolismo de *K. ivorensis*.

A deposição de Si na endoderme radicular inibe o transporte de Cd para o caule e folhas devido ao bloqueio físico da passagem do MP pela rota apoplástica e previne a passagem do íon tóxico para outros órgãos e compartimentos celulares metabolicamente ativos como os cloroplastos que representam os principais sítios da toxicidade por Cd (DA CUNHA & NASCIMENTO, 2009; SILVA et al., 2017). O silício promoveu, assim, a organização no metabolismo cloroplastídico e peroxissomal, mediante a maior expressão das enzimas antioxidantes e paralelo decréscimo no teor de MDA nas plantas de mogno africano mantidas em condições tóxicas por Cd, o que permitiu a retomada do crescimento vegetal como evidenciado pelos incrementos na biomassa de *K. ivorensis* (Figura 3.1).

Inúmeros estudos mostram que os MP, regulam negativamente a produção de biomassa em diversas espécies vegetais, como resultado dos efeitos adversos dos íons tóxicos aos principais processos fisiológicos, bioquímicos e enzimáticos nas plantas (GAUTAM et al., 2016; IVANOV et al., 2016; MATHUR et al., 2016; AKHTAR et al., 2017).

A tolerância ao estresse por Cd é particularmente atribuído à capacidade das plantas para manter taxas de crescimento e de desenvolvimento consideráveis em comparação àquelas não estressadas. Demonstramos que a suplementação com Si aumentou a produção de biomassa em níveis adequados em *K. ivorensis*, indicando que o micronutriente mitiga os efeitos tóxicos do Cd, o que ficou evidente nos tratamentos combinados do nutriente e do MP, em particular, na concentração intermediária de Si que foi mais efetiva em reduzir a absorção de Cd e, conseqüentemente, melhorar o crescimento do mogno africano (Figura 3.1).

### 3.5. Conclusão

O presente estudo sugere que as concentrações de Cd 50 e 75 mg L<sup>-1</sup>, indiretamente, levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), particularmente, o peróxido de hidrogênio e induzem a peroxidação lipídica em *K. ivorensis*. Estes eventos decorreram da provável ligação do Cd ao centro catalítico de enzimas chaves envolvidas na eliminação das ROS, promovendo, assim, a inativação do sistema antioxidante e o conseqüente desbalanço da homeostase redox no mogno africano. Consideramos que a ligação do metal de transição aos radicais livres, potencializou os danos oxidativos.

No entanto, o Si mitigou a toxicidade do Cd por modular as respostas antioxidantes, particularmente, pela supreeexpressão da atividade da SOD e da CAT o que contribuiu para o restabelecimento do metabolismo citosólico, preveniu danos oxidativos ao PSII e elevou a tolerância de *K. ivorensis*, especialmente, pelo envolvimento do nutriente na redução da biodisponibilidade e da translocação do MP nos tecidos do vegetal. Neste aspecto, a nutrição com Si configurou como uma técnica eficiente a ser utilizada em programas que visam à recuperação de áreas degradadas por metais pesados, acima de tudo, porque elevou a fitoestabilização do Cd por *K. ivorensis*.

A espécie mostrou-se tolerar o Cd até concentrações de 25 mg L<sup>-1</sup> por não haver redução de crescimento e os níveis de peroxidação lipídica foram diminutos. Esses resultados evidenciam o potencial fitorremediador do mogno africano ao Cd, considerando que 25 mg L<sup>-1</sup> é um valor oito vezes maior ao de intervenção para cenários de exposição agrícola em áreas de proteção máxima, segundo o CONAMA.

### 3.6. Referências

- AKHTAR, T., ZIA-UR-REHMAN, M., NAEEM, A., NAWAZ, R., ALI, S., MURTAZA, G., & RIZWAN, M. Photosynthesis and growth response of maize (*Zea mays* L.) hybrids exposed to cadmium stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 6, p. 5521-5529, 2017.
- ALI, B., QIAN, P., JIN, R., ALI, S., KHAN, M., AZIZ, R., TIAN, T., ZHOU, W. Physiological and ultra-structural changes in *Brassica napus* seedlings induced by cadmium stress. **Biologia plantarum**, v. 58, n. 1, p. 131-138, 2014.
- ARAÚJO MUP, RIOS JA, SILVA ET, RODRIGUES FA. Silicon alleviates changes in the source-sink relationship of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, p. PHYTO-11-18-0428-R, 2019.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, p.206-216, 2007.
- BEERS, Jr R. F.; SIZER, W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, **Journal of Biological Chemistry**, n. 195, p. 133-140, 1952.
- CAKMAK, I., & HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, n. 3, p. 463-468, 1991.
- CARNEIRO, J. M., CHACÓN-MADRID, K., GALAZZI, R. M., CAMPOS, B. K., ARRUDA, S. C., AZEVEDO, R. A., & ARRUDA, M. A.. Evaluation of silicon influence on the mitigation of cadmium-stress in the development of *Arabidopsis thaliana* through total metal content, proteomic and enzymatic approaches. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, p. 50-58, 2017.
- CHEN D, CHEN D, XUE R, LONG J, LIN X, LIN Y, JIA L, ZENG R, SONG Y. Effects of boron, silicon and their interactions on cadmium accumulation and toxicity in rice plants. **Journal of hazardous materials**, v. 367, p. 447-455, 2019.
- CHMIELOWSKA-BAK, J., GZYL, J., RUCIŃSKA-SOBKOWIAK, R., ARASIMOWICZ-JELONEK, M., & DECKERT, J. The new insights into cadmium sensing. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 245, 2014.
- CONCEIÇÃO, S. S., OLIVEIRA NETO, C. F. D., MARQUES, E. C., BARBOSA, A. V. C., GALVÃO, J. R., OLIVEIRA, T. B. D., ... & GOMES-FILHO, E. Silicon modulates the activity of antioxidant enzymes and nitrogen compounds in sunflower plants under salt stress. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 65, n. 9, p. 1237-1247, 2019.

DA CUNHA, K. P. V., & DO NASCIMENTO, C. W. A. Silicon effects on metal tolerance and structural changes in maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil. **Water, air, and soil pollution**, v. 197, n. 1-4, p. 323, 2009.

DA SILVA, F. C. (2009). Handbook of the chemical analysis of soils, plants and fertilizers.

DORNELES KR, DALLAGNOL LJ, PAZDIORA PC, RODRIGUES FA, DEUNER S. Silicon potentiates biochemical defense responses of wheat against tan spot. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 97, p. 69-78, 2017.

EVLARD, A., SERGEANT, K., PRINTZ, B., GUIGNARD, C., RENAUT, J., CAMPANELLA, B., & HAUSMAN, J. F. A multiple-level study of metal tolerance in *Salix fragilis* and *Salix aurita* clones. **Journal of proteomics**, v. 101, p. 113-129, 2014.

FAN, K. C., HSI, H. C., CHEN, C. W., LEE, H. L., & HSEU, Z. Y. Cadmium accumulation and tolerance of mahogany (*Swietenia macrophylla*) seedlings for phytoextraction applications. **Journal of environmental management**, v. 92, n. 10, p. 2818-2822, 2011.

GAUTAM S, ANJANI K AND SRIVASTAVA N. *In vitro* evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). *Physiol Mol Biol Plants* 22:121-129. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 22, n. 1, p. 121-129, 2016.

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

GILL, S. S., ANJUM, N. A., GILL, R., YADAV, S., HASANUZZAMAN, M., FUJITA, M., & Tuteja, N. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 10375-10394, 2015.

GONG, X., HUANG, D., LIU, Y., ZENG, G., WANG, R., WAN, J., & XUE, W. Stabilized nanoscale zerovalent iron mediated cadmium accumulation and oxidative damage of *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich cultivated in cadmium contaminated sediments. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 19, p. 11308-11316, 2017.

HAWERROTH C, ARAUJO L, BERMÚDEZ-CARDONA MB, SILVEIRA PR, FILHO JAW, RODRIGUES FA. Silicon-mediated maize resistance to macrospora leaf spot. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 2, p. 192-196, 2019.

HUANG F, WEN X-H, CAI Y-X, CAI K-Z. Silicon-Mediated Enhancement of Heavy Metal Tolerance in Rice at Different Growth Stages. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 10, p. 2193, 2018.

IMTIAZ M, RIZWAN MS, MUSHTAQ MA, ASHRAF M, SHAHZAD SM, YOUSAF B, SAEED DA, RIZWAN M, NAWAZ MA, MEHMOOD S, TU S. Silicon occurrence, uptake,

transport and mechanisms of heavy metals, minerals and salinity enhanced tolerance in plants with future prospects: **Journal of environmental management**, v. 183, p. 521-529, 2016.

IRFAN M, AHMAD A, HAYAT S. Effect of cadmium on growth and antioxidant enzymes in two varieties of *Brassica juncea*. **Saudi journal of biological sciences**, v. 21, n. 2, p. 125-131, 2014.

IVANOV YV, KARTASHOV AV, IVANOVA AI, SAVOCHKIN YV AND KUZNETSOV VV (2016). Effects of zinc on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings grown in hydroculture. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 102, p. 1-9, 2016.

JI, X., LIU, S., JUAN, H., BOCHARNIKOVA, E. A., & MATICHENKOV, V. V. Effect of silicon fertilizers on cadmium in rice (*Oryza sativa* L.) tissue at tillering stage. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 11, p. 10740-10748, 2017.

KIM, Y. H., KHAN, A. L., WAQAS, M., & LEE, I. J. Silicon regulates antioxidant activities of crop plants under abiotic-induced oxidative stress: a review. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 510, 2017.

KLAR, A.E.; VILLA NOVA, N.A.; MARCOS, Z.Z.; CERVELLINI, A. Determinação da umidade do solo pelo método das pesagens. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, 23:16-30, 1966.

KRASKA, J. E., & BREITENBECK, G. A. Simple, robust method for quantifying silicon in plant tissue. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 41, n. 17, p. 2075-2085, 2010.

KÜPPER, H., & ANDRESEN. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metallomics**, v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016.

LIANG., Y. C.; HUA, H.; ZHU, Y.G.; ZHANG, J.; CHENG, CHUNMEI.; RÖMHELD, V. Importance of plant species and external silicon concentration to active silicon uptake and transport. **New Phytologist**, Cambridge, v.172, n.1, p.63-72, 2006.

LI, P., ZHAO, C. Z., ZHAND, Y. Q., WANG, X. M., WANG, J. F., WANG, F., & BI, Y. R. Silicon enhances the tolerance of *Poa annua* to cadmium by inhibiting its absorption and oxidative stress. **Biologia plantarum**, v. 61, n. 4, p. 741-750, 2017.

LIN H, HE J, LIN W, LI Y, FANG C, LIN W. *Lsi1*-regulated Cd uptake and phytohormones accumulation in rice seedlings in presence of Si. **Plant growth regulation**, v. 86, n. 2, p. 149-157, 2018.

LUO, Z. B., HE, J., POLLE, A., & RENNENBERG, H. Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 6, p. 1131-1148, 2016.

MA JF, YAMAJI N. Function and transport of silicon in plants. **Cell Mol Life Sci** 65:3049–3057, 2008.

MATHUR S, KALAJIHMAND JAJOO A. Investigation of deleterious effects of chromium phytotoxicity and photosynthesis in wheat plant. **Photosynthetica**, v. 54, n. 2, p. 185-192, 2016.

MOHAMED AA, CASTAGNA A, RANIERI A, SANITA` DI TOPPI L. Cadmium tolerance in Brassica juncea roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 15-22, 2012.

NABATI, J., KAFI, M., NEZAMI, A., MOGHADDAM, P. R., MASOUMI, A., & MEHRJERDI, M. Z. Effect of salinity on biomass production and activities of some key enzymatic antioxidants in kochia (*Kochia scoparia*). **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 1, p. 539-548, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 887-880, 1981.

NEVES, L. H., SANTOS, R. I. N., dos Santos Teixeira, G. I., de Araujo, D. G., Silvestre, W. V. D., & Pinheiro, H. A. Leaf gas exchange, photochemical responses and oxidative damages in assai (*Euterpe oleracea* Mart.) seedlings subjected to high temperature stress. **Scientia Horticulturae**, v. 257, p. 108733, 2019.

NIKOLIĆ, N., ZORIĆ, L., CVETKOVIĆ, I., PAJEVIĆ, S., BORIŠEV, M., ORLOVIĆ, S., & PILIPOVIĆ, A. Assessment of cadmium tolerance and phytoextraction ability in young *Populus deltoides* L. and *Populus* × *euramericana* plants through morpho-anatomical and physiological responses to growth in cadmium enriched soil. **IForest-Biogeosciences and Forestry**, v. 10, n. 3, p. 635, 2017.

PEREIRA, T. S., PEREIRA, T. S., DE CARVALHO SOUZA, C. L. F., LIMA, E. J. A., BATISTA, B. L., & DA SILVA LOBATO, A. K. Silicon deposition in roots minimizes the cadmium accumulation and oxidative stress in leaves of cowpea plants. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 24, n. 1, p. 99-114, 2018.

PÉREZ-HERNÁNDEZ I, OCHOA-GAONA S, ADAMS RH, & RIVERA-CRUZ MC, PÉREZ-HERNÁNDEZ V, JARQUÍN-SÁNCHEZ A, GEISSEN V, MARTÍNEZ-ZURIMENDI P. Growth of four tropical tree species in petroleum-contaminated soil and effects of crude oil contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1769-1783, 2017.

RADY MM, ELRYS AS, EL-MAATI MFA, DESOKY E-SM. Interplaying roles of silicon and proline effectively improve salt and cadmium stress tolerance in *Phaseolus vulgaris* plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 558-568, 2019.

RAHMAN, M. F., GHOSAL, A., ALAM, M. F., & KABIR, A. H. Remediation of cadmium toxicity in field peas (*Pisum sativum* L.) through exogenous silicon. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 135, p. 165-172, 2017.

RISHI, A., & SNEHA, S. Antioxidative defense against reactive oxygen species in plants under salt stress. **International Journal of Current Research**, v. 5, p. 1622-1627, 2013.

RIZWAN, M., ALI, S., ABBAS, T., ADREES, M., ZIA-UR-REHMAN, M., IBRAHIM, M., ... & NAWAZ, R. Residual effects of biochar on growth, photosynthesis and cadmium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) under Cd stress with different water conditions. **Journal of environmental management**, v. 206, p. 676-683, 2018.

SAUERBECK, D.. Der Transfer von Schwermetallen in die Pflanze. *Beurteilung von Schwermetallkontaminationen i* **Beurteilung von Schwermetallkontaminationen im Boden**, p. 281-316, 1989

SHAO JF, CHE J, YAMAJI N, SHEN RF, MA JF. Silicon reduces cadmium accumulation by suppressing expression of transporter genes involved in cadmium uptake and translocation in rice. **Journal of experimental botany**, v. 68, n. 20, p. 5641-5651, 2017.

SHARMA, S. S., & DIETZ, K. J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends in plant science**, v. 14, n. 1, p. 43-50, 2009.

SHI G, ZHANG Z, LIU C. Silicon influences cadmium translocation by altering subcellular distribution and chemical forms of cadmium in peanut roots. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 63, n. 1, p. 117-123, 2017.

SILVA, A. J., NASCIMENTO, C. W. A., & GOUVEIA-NETO, A. S. Assessment of cadmium phytotoxicity alleviation by silicon using chlorophyll a fluorescence. **Photosynthetica**, v. 55, n. 4, p. 648-654, 2017.

STOHS, S.J., BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free radical biology and medicine**, v. 18, n. 2, p. 321-336, 1995.

TAI, Y. P., LI, Z. A., MCBRIDE, M. B., & YANG, Y. Dry cultivation enhances cadmium solubility in contaminated soils but minimizes cadmium accumulation in a leafy vegetable. **Journal of soils and sediments**, v. 17, n. 12, p. 2822-2830, 2017.

TIRADO, R., & ALLSOAPP, M. Phosphorus in agriculture problems and solutions greenpeace research laboratory, 2012.

TORABI, F., MAJD, A., & ENTESHARI, S. The effect of silicon on alleviation of salt stress in borage (*Borago officinalis* L.) **Soil science and plant nutrition**, v. 61, n. 5, p. 788-798, 2015.

TRIPATHI, D. K., SINGH, S., SINGH, V. P., PRASAD, S. M., DUBEY, N. K., & CHAUHAN, D. K. Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon

in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 110, p. 70-81, 2017.

WANG X, HOU C, LIU J, HE W, NAN W, GONG H, BI Y. Hydrogen peroxide is involved in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) tolerance to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, 35:891-900, 2013.

WEI X, LIU Y, ZHAN Q, ZHANG P, ZHAO D, XU B, BOCHARNIKOVA E, MATICHENKOV V. Effect of Si soil amendments on As, Cd, and Pb bioavailability in contaminated paddy soils. **Paddy and water environment**, v. 16, n. 1, p. 173-181, 2018.

WU J, GEILFUS C-M, PITANN B, MÜHLING K-H. Silicon-enhanced oxalate exudation contributes to alleviation of cadmium toxicity in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 131, p. 10-18, 2016.

ZHANG, X., GAO, B., & XIA, H. Effect of cadmium on growth, photosynthesis, mineral nutrition and metal accumulation of bana grass and vetiver grass. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 106, p. 102-108, 2014.

ZHANG Q, YAN Q, LIU J, LU H, WANG W, DU J, DUAN H. Silicon alleviates cadmium toxicity in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. seedlings in relation to root anatomy and radial oxygen loss. **Marine pollution bulletin**, v. 76, n. 1-2, p. 187-193, 2013.

ZHAO, S., MA, Q., XU, X., LI, G., & HAO, L.. Tomato jasmonic acid-deficient mutant spr2 seedling response to cadmium stress. **Journal of plant growth regulation**, v. 35, n. 3, p. 603-610, 2016.

#### 4. FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO POR *Khaya ivorensis* A. Chev. MODULAÇÕES DO SILÍCIO NAS RESPOSTAS ANATÔMICAS.

##### Resumo

O silício (Si) apresenta uma estreita relação com a melhoria da fitotoxicidade por metais pesados (MPs). No entanto, mecanismos de alívio do estresse provocado por cádmio (Cd) mediado pelo Si na anatomia de espécies arbóreas permanecem pouco compreendidos. Diante do exposto, foi investigada a magnitude nas alterações anatômicas nos tecidos foliares e radiculares em mudas de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev.) submetidas às concentrações tóxicas de Cd e nutricionais com Si. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial constituídos por 4 níveis crescentes do metal pesado (Cd a 0, 25, 50 e 75 mg L<sup>-1</sup>) e 4 de concentrações de silício (Si a 0, 100, 150 e 300 mg L<sup>-1</sup>) com cinco repetições. Realizou-se a análise de regressão polinomial. Na menor concentração de Cd 25 mg L<sup>-1</sup>, houve aumento de 30% e 25% e 33% nas espessuras epidérmicas (EAD, EPE e do ECR), e drásticas reduções de 70% e 81% no (EAB e ECR) no tratamento com Cd 75 mg L<sup>-1</sup> em relação ao controle, indicando que *K. ivorensis*, foi tolerante à menor concentração do MP e sensível ao nível mais severo de Cd. No entanto, o Si restaurou os danos provocados pela toxicidade do íon metálico à anatomia vegetal, sobre tudo, nos tratamentos combinados com Si 150 mg L<sup>-1</sup> e Cd 50 mg L<sup>-1</sup>. Nestas condições, a espessura da (EAB), foi aumentada em 33% e, tanto a (EPP) quanto a (EPE), tecidos relacionados à fotossíntese e às trocas gasosas foram 48% e 55%, respectivamente, mais espessos em relação àquele com Cd 50 mg L<sup>-1</sup>. A melhoria dos padrões anatômicos esteve relacionada à modulação do Si no metabolismo bioquímico e fisiológico do mogno africano. O maior potencial hídrico na presença de Si, reduziu a concentração de Cd nos diferentes tecidos por efeito de diluição. Em adição, no sistema radicular, o Si contribuiu para o reforço à barreira mecânica ao influxo de Cd imposta pela estrias de Caspary, reduzindo sua absorção e translocação às partes aéreas. Os achados deste estudo mostram que, o Si, pode mitigar a toxicidade por Cd à anatomia foliar e radicular de *K. ivorensis* por meio da intensificação do espessamento dos tecidos avaliados.

**Palavras-chave:** Meliácea. Fitotoxicidade. Metal pesado. Sílica. Tecidos epidérmicos.

## Abstract

Silicon (Si) is closely related to improved heavy metal phytotoxicity (MPs). However, mechanisms mediated by Si-mediated cadmium stress (Cd) in the anatomy of tree species remain poorly understood. Given the above, we investigated the magnitude of the anatomical changes in leaf and root tissues in African mahogany (*Khaya ivorensis* A. Chev.) Seedlings submitted to toxic concentrations of Cd and nutritional with Si. The experimental design was randomized blocks in factorial scheme consisting of 4 increasing levels of heavy metal (Cd at 0, 25, 50 and 75 mg L<sup>-1</sup>) and 4 silicon concentrations (Si at 0, 100, 150 and 300 mg L<sup>-1</sup>) with five repetitions. Polynomial regression analysis was performed. At the lowest concentration of Cd 25 mg L<sup>-1</sup>, there was a 30% and 25% and 33% increase in epidermal thickness (EAD, EPE and RCT), and drastic reductions of 70% and 81% in (EAB and RCT) in treatment with Cd 75 mg L<sup>-1</sup> in relation to control, indicating that *K. ivorensis* was tolerant to lower MP concentration and sensitive to more severe Cd level. However, Si restored damage caused by metal ion toxicity to plant anatomy above all in the combined treatments with Si 150 mg L<sup>-1</sup> and Cd 50 mg L<sup>-1</sup>. Under these conditions, the thickness of (EAB) was increased by 33% and, both (EPP) and (EPE), tissues related to photosynthesis and gas exchange were 48% and 55%, respectively, thicker than that. with Cd 50 mg L<sup>-1</sup>. The improvement of anatomical patterns was related to Si modulation in biochemical and physiological metabolism of african mahogany. The higher water potential in the presence of Si reduced the concentration of Cd in the different tissues by dilution effect. In addition, in the root system, Si contributed to the reinforcement of the mechanical barrier to the influx of Cd imposed by the Caspary striae, reducing its absorption and translocation to the aerial parts. The findings of this study show that Si can mitigate Cd toxicity to the leaf and root anatomy of *K. ivorensis* by intensifying the thickening of the tissues evaluated.

**Keywords:** Meliace. Phytotoxicity. Heavy metal. Silica, Epidermal tissues.

#### 4.1. Introdução

Plasticidade é definida como a habilidade das plantas de ajustarem sua performance através da alteração na sua morfologia e/ou fisiologia às variações ambientais onde crescem. Entretanto, mudanças plásticas necessariamente não refletem alterações adaptativas (SCHLICHTING, 1986; VACULÍK et al., 2015; NIKOLIĆ et al., 2017).

As folhas são os órgãos que na maioria das vezes estão expostos ao ambiente aéreo, sendo mais sensíveis e plásticos às modificações ambientais quando comparadas a outros órgãos (VACULÍK et al., 2015). Por isso, a folha em si reflete o ambiente que a planta ocupa, sendo suas características morfológicas e estruturais indicadores ecológicos do habitat de plantas (FAROOQ et al. 2016; GREGER et al., 2016).

Nesse sentido, a toxicidade por metais é um fator estressante que promove mudanças no tecido foliar que se mostram na morfologia (comprimento, largura e espessura) e na anatomia na superfície de órgãos (estômatos, epiderme e anexos) e mesófilo (parênquima paliçádico e esponjoso, espaço intercelular esclerificações e veias) de plantas (CUI et al., 2017; PEREIRA et al., 2017; SHI et al., 2017; XU et al., 2017).

Dentre os metais pesados (MPs) de grande importância ambiental destaca-se o cádmio (Cd) que, além de afetar negativamente o crescimento e a fotossíntese de plantas, promove alterações estruturais e ultraestruturais significativas (WU et al., 2016; YU et al. 2016; JI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018). Por exemplo, em plantas de algodoeiro, a concentração de 200  $\mu\text{M}$  de Cd reduziu a espessura da epiderme superior e parênquima paliçádico, além de restringir o crescimento (OZYIGIT et al., 2013).

A tolerância das plantas às concentrações tóxicas de Cd depende de mecanismos como: o transporte intracelular, compartimentalização vacuolar, imobilização do íon na rizosfera, restrição do transporte através da membrana plasmática e do carregamento no xilema e da translocação do MP o que, comumente, são acompanhados por alterações na anatomia e na morfologia vegetal (SMOLINSKA & ROWE, 2015; MINKINA et al., 2018).

Uma das estratégias utilizadas para minimizar o efeito de estresse por toxicidade de MPs é o uso de nutrientes benéficos, que tem mostrado resultados positivos na mitigação dos efeitos tóxicos desses contaminantes (HUSSAIN et al., 2015; IMTIAZ et al., 2016; MA et al., 2016; TRIPATHI et al., 2017; CHEN et al., 2019). Nesse contexto, enquadra-se o silício, o segundo elemento químico mais abundante no solo, presente na forma de ácido silícico,  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , encontrando-se em concentrações na faixa de 0.1 a 2.0 mM ( $\text{pH} > 9$ ) (Epstein, 1994).

Um exemplo de tolerância ao Cd induzida pelo Si foi demonstrado em estudos recentes por Fleck et al., (2011). Esses autores mostraram que o Si aumenta a suberização e lignificação em raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.). Em adição, Ma et al., (2017), demonstraram, que a nutrição silicatada em plantas de arroz, induziu a síntese de hemicelulose, e o complexo Si-hemicelulose formado é capaz de ligar cátions Cd, restringindo a captação celular do metal.

A regulação de processos de desintoxicação e compartimentalização do MP em tecidos menos metabolicamente ativos (vacúolos e parede celulares), a imobilização na rizosfera, restrição do transporte através da membrana plasmática confirmam o envolvimento do Si no metabolismo bioquímico, que resulta em alterações na anatomia e na morfologia vegetal (ZHANG et al., 2013; ROWE & SMOLINSKA, 2015; MINKINA et al., 2018).

A parede celular (PC) das raízes contribui positivamente com maior retenção de íons Cd e constituem a primeira barreira protegendo o protoplasto da toxicidade deste contaminante (XUE, et al., 2014; QUIAN et al., 2015). Um aumento na espessura da parede celular da raiz foi observado como resposta à contaminação pelo íon. Nesse caso, a planta maximiza sua capacidade de filtro, pois aumenta suas cargas negativas e protege os tecidos internos dos efeitos tóxicos daquele MP (MA et al., 2017; SHI et al., 2017).

No mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev.) não é claro, no plano anatômico, como o Si mitiga a toxicidade de Cd, tendo-se em vista a inexistência de investigações nessa linha de pesquisa. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as alterações anatômicas promovidas pelo Cd nos tecidos radiculares e foliares e o efeito mitigador do Si em plantas de mogno africano cultivados em solução nutritiva, 60 dias após a exposição àquele íon tóxico.

## **4.2. Material e métodos**

### **4.2.1. *Material vegetal e condições de crescimento***

O experimento foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA, Belém, Pará, Brasil, localizada a 01 ° 28'03 "S; 48 ° 29'18 "W. O genótipo utilizado neste estudo foi o de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev). A descrição pormenorizada da área de estudo, bem como, as condições de crescimento e delineamento experimental utilizado, foi apresentada no capítulo 2 nas páginas nas 38, 39 e 43, sucessivamente.

### **4.2.2. *Determinação da concentração de cádmio***

A análise de cádmio foi processada em triplicata segundo a metodologia descrita por Silva (2009), com modificações. A descrição pormenorizada dessa metodologia encontra-se no capítulo 2 na página 42.

#### **4.2.2.1. *Índice de tolerância (IT) para Cd***

Determinou-se o índice de tolerância à Cd, segundo Wilkins (1978). A análise metodológica precisa encontra-se descrita no capítulo 2 na página 42.

#### **4.2.2.2. *Fatores de bioacumulação translocação de Cd nas plantas***

Em plantas mantidas sob estresse por Cd, os fatores de bioacumulação (FB) e de translocação (FT) de Cd foram determinados conforme o método descrito por Zhang et al, (2014), o que foi previamente detalhado no capítulo 2 na página 42.

### **4.2.3. *Análise da concentração de Silício (Si)***

A determinação do silício foi feita realizada conforme o método descrito por Kraska e Breitenbeck (2010). A metodologia pormenorizada encontra-se descrita no capítulo 2 na página 43.

### **4.2.4. *Análise anatômica***

Foram coletadas amostras da região média do ramo foliar de folhas totalmente expandidas do terceiro nó e de raízes à 5 cm do ápice radicular. Posteriormente, todos os materiais botânicos coletados foram fixados em FAA 70 por 24 horas e desidratados em etanol e embebidos em Historesin Leica<sup>TM</sup> (Leica, Nussloch, Alemanha). Seções transversais

com uma espessura de 5  $\mu\text{m}$  foram obtidas utilizando um micrótomo rotativo (modelo Leica RM 2245, Leica Biosystems). As seções foram coradas com azul de toluidina (O'Brien et al., 1964). As lâminas foram observadas e fotomicrografadas sob um microscópio óptico (Motic BA 310, Motic Group Co. LTD.) Acoplado a uma câmera digital (Motic 2500, Motic Group Co., LTD.). As imagens foram analisadas com um Moticplus 2.0 que foi calibrado anteriormente com uma lâmina de micrômetro. Os parâmetros anatômicos avaliados foram os seguintes: espessura da epiderme do lado adaxial da folha (EEAB), espessura da epiderme abaxial da folha (EEAD), a espessura dos parênquimas: paliçádico (EEPP), e esponjoso (EEPE) e a relação EEPP/EEPE. Nas amostras radiculares foram medidos o diâmetro (DR), espessura do córtex radicular (ECR), o diâmetro do cilindro vascular (DCV) e o diâmetro do maior elemento de vaso (DEV).

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Seção transversal em folhas de *Khaya ivorensis* A. Cherv.

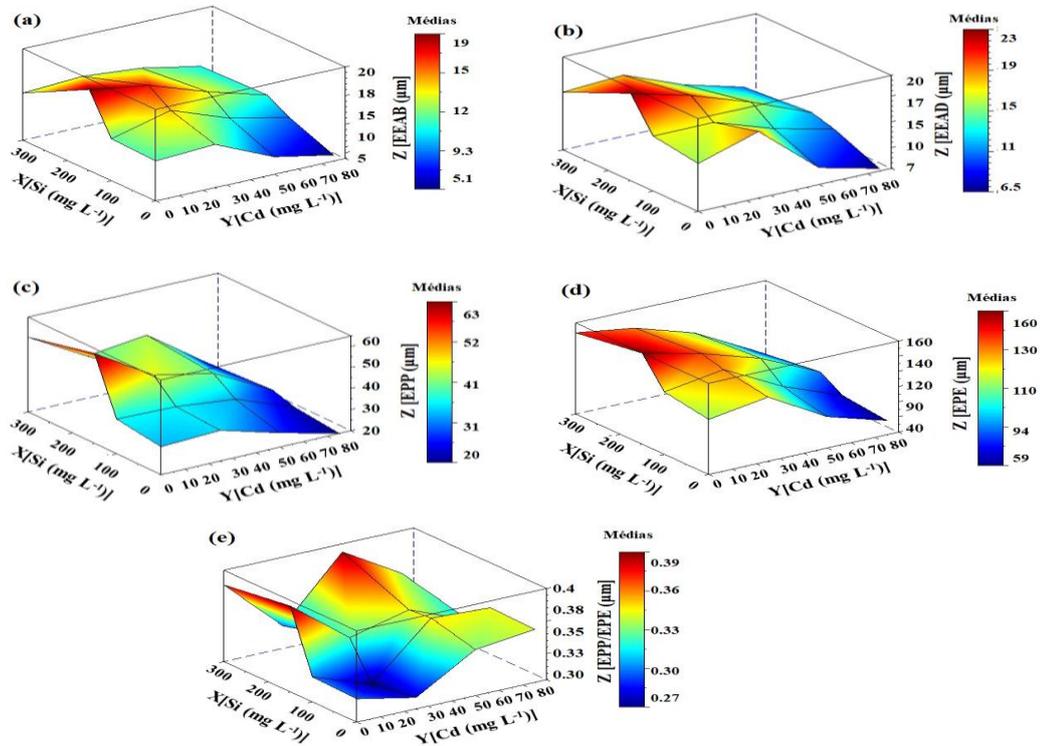
O tratamento com Cd 25  $\text{mg L}^{-1}$  induziu em variações significativas ( $p < 0,01$ ) nas estruturas anatômicas do tecido foliar em *Khaya ivorensis* o que culminou em diferenças nas espessuras da epiderme adaxial (EEAD) (Figura 4.1; b) e do parênquima esponjoso (EPE) (Figura 4.1; d). As micrografias das células epidérmicas de amostras de folha mostraram que houve aumento da espessura daquelas estruturas e foram, respectivamente, 30% e 25% superiores ao controle. Enquanto que o tratamento com Cd 50  $\text{mg L}^{-1}$ , levou ao espessamento da bainha do feixe vascular (Figura 4.3;b).

Pela análise bivariada, o impacto da toxicidade do MP resultou do nível máximo de contaminação Cd 75  $\text{mg L}^{-1}$ , o que modificou o arranjo das estruturas dos tecidos foliares e acarretou em reduções significativas ( $p < 0,01$ ) nas espessuras da epiderme abaxial (EEAB), adaxial (EEAD), e do parênquima paliçádico (EEPP) (Figura 4.1). Houve perda adicional da forma da célula e diminuição dos espaços intercelulares em relação às plantas controle. Pela análise de regressão, àquelas variáveis apresentaram pontos mínimos de 4,5 $\mu\text{m}$  e 5,8 $\mu\text{m}$ , 17  $\mu\text{m}$  o que foi 73%. 70% e 68% inferior ao das plantas cultivadas na ausência de Cd (Figura 4.1; a,b,c). Houve correlação positiva ( $r=0,81$ ) entre EEAD e EEPP (Figura 4.1; b,c).

O arranjo compacto das células epidérmicas do tecido foliar mostra que a suplementação com Si 150  $\text{mg L}^{-1}$  em plantas cultivadas na presença de Cd 50  $\text{mg L}^{-1}$ ,

apresentaram aumentos substanciais na espessura epidérmica dos tecidos foliares (Figura 4.3; a).

Figura 4.1. Seções transversais, espessuras: da epiderme abaxial (EEAB;a); da epiderme adaxial (EEAD;b); do parênquima paliçádico (EPP;c); do parênquima esponjoso (EPE;d) e a relação do parênquima paliçádico e esponjoso (EPP/EPE; e) em folhas de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{EEab} = 11,166101^{**} + 0,047561^{**}X - 0,008911^{NS}Y - 0,000140^{**}X^2 + 0,000167^{**}Y.X - 0,001130^{**}Y^2 (R^2=0,83)$$

$$Z_{EEad} = 16,444396^{**} - 0,029135^{**}X + 0,041624^{**}Y - 0,001450^{*}X^2 + 0,000108^{*}Y.X - 0,000123^{**}Y^2 (R^2=0,81)$$

$$Z_{EPP} = 34,114876^{**} + 0,137581^{**}X - 0,059832^{*}Y - 0,000222^{**}X^2 - 0,000689^{**}Y.X - 0,001933^{**}Y^2 (R^2=0,92)$$

$$Z_{EPE} = 115,787978^{**} + 0,286101^{**}X + 0,084778^{*}Y - 0,000591^{**}X^2 - 0,000663^{**}Y.X - 0,012159^{**}Y^2 (R^2=0,90)$$

$$Z_{EPP/EPE} = 0,291828^{**} + 0,00316^{**}X - 0,000241^{*}Y - 0,00000142^{*}X^2 - 0,00003668^{**}Y.X - 0,00011892^{*}Y^2 (R^2=0,88)$$

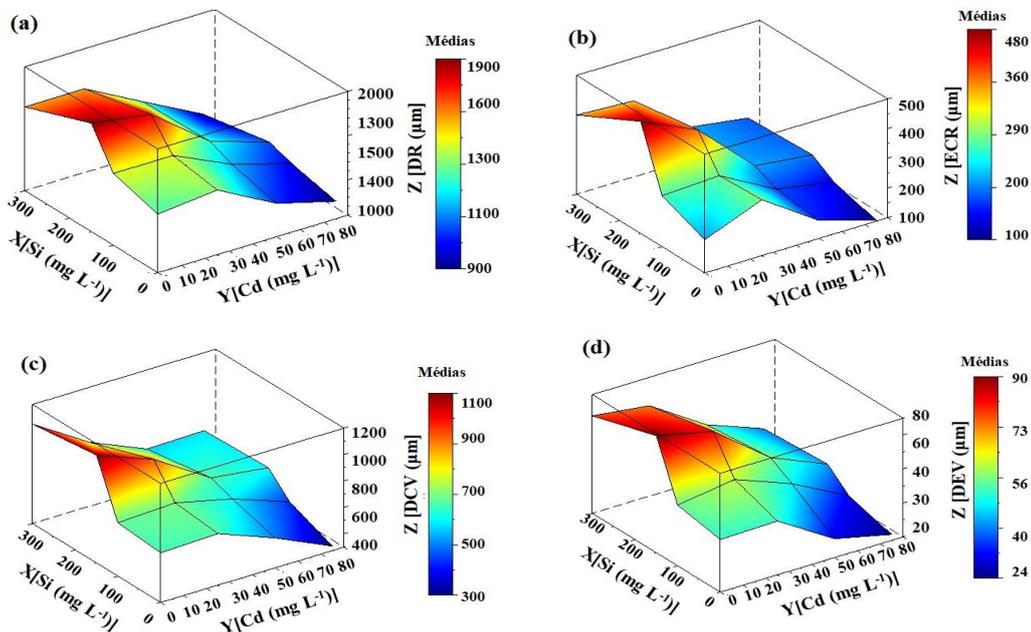
Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\*p<0,001 e \*p<0,05).

Pela análise canônica a combinação (Cd 45 mg L<sup>-1</sup> x Si 165 mg L<sup>-1</sup>) representa os pontos ótimos da interação que induziram em aumentos nas variáveis anatômicas analisadas. Por este tratamento, a espessura da epiderme abaxial (EEAB), do parênquima paliçádico (EPP) e do parênquima esponjoso (EPE) foi aumentada em 63%; 68% e 45% em relação às plantas tratadas com Cd 75 mg L<sup>-1</sup>, e foram as variáveis que melhor responderam à nutrição silicatada nas plantas mantidas em condições extremas de contaminação por Cd (Figura 4.1).

#### 4.3.2. Seção transversal em raízes de *Khaya ivorensis* A. Cherv.

Houve grande variação na espessura dos tecidos radiculares na medida em que os níveis de Cd foram elevados no meio de cultivo (Figura 4.2). De fato, Plantas de *K. ivorensis* tratadas com Cd 25 mg L<sup>-1</sup> não exibiram mudanças anatômicas, e foram significativamente (p<0,01) similares ao controle, à exceção do que ocorreu para a espessura do cilindro radicular (ECR) (Figura 4.2; b) e para o diâmetro do maior elemento de vaso da raiz (DEV) (Figura 4.2; d). Sob a menor dosagem do metal, houve incrementos respectivos de 33% e 28% nessas variáveis, atingindo ponto máximo na espessura de 120µm e 55 µm conforme o ajuste da equação de regressão.

Figura 4.2. Seções transversais: diâmetro da raiz (DR; a) espessura do cortéx da raiz (ECR; b); diâmetro do cilindro vascular da raiz (DCV;c); diâmetro do maior elemento do vaso da raiz (DEV;d) em tecidos radiculares de plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



$$Z_{DR} = 1297,074682^{**} + 3,496974^{**}X - 0,765508 \cdot Y - 0,007835 \cdot X^2 - 0,010561^{**} \cdot Y \cdot X - 0,089709^{**} \cdot Y^2 \quad (R^2=0,76)$$

$$Z_{ECR} = 253,814162^{**} + 1,141012^{**}X - 1,168902 \cdot Y - 0,002188 \cdot X^2 + 0,003915 \cdot Y \cdot X - 0,012898 \cdot Y^2 \quad (R^2=0,80)$$

$$Z_{DCV} = 701,385526^{**} + 2,529637^{**}X - 4,428992^{**} \cdot Y - 0,005055^{**} \cdot X^2 - 0,006193 \cdot Y \cdot X + 0,724 \cdot Y^2 \quad (R^2=0,87)$$

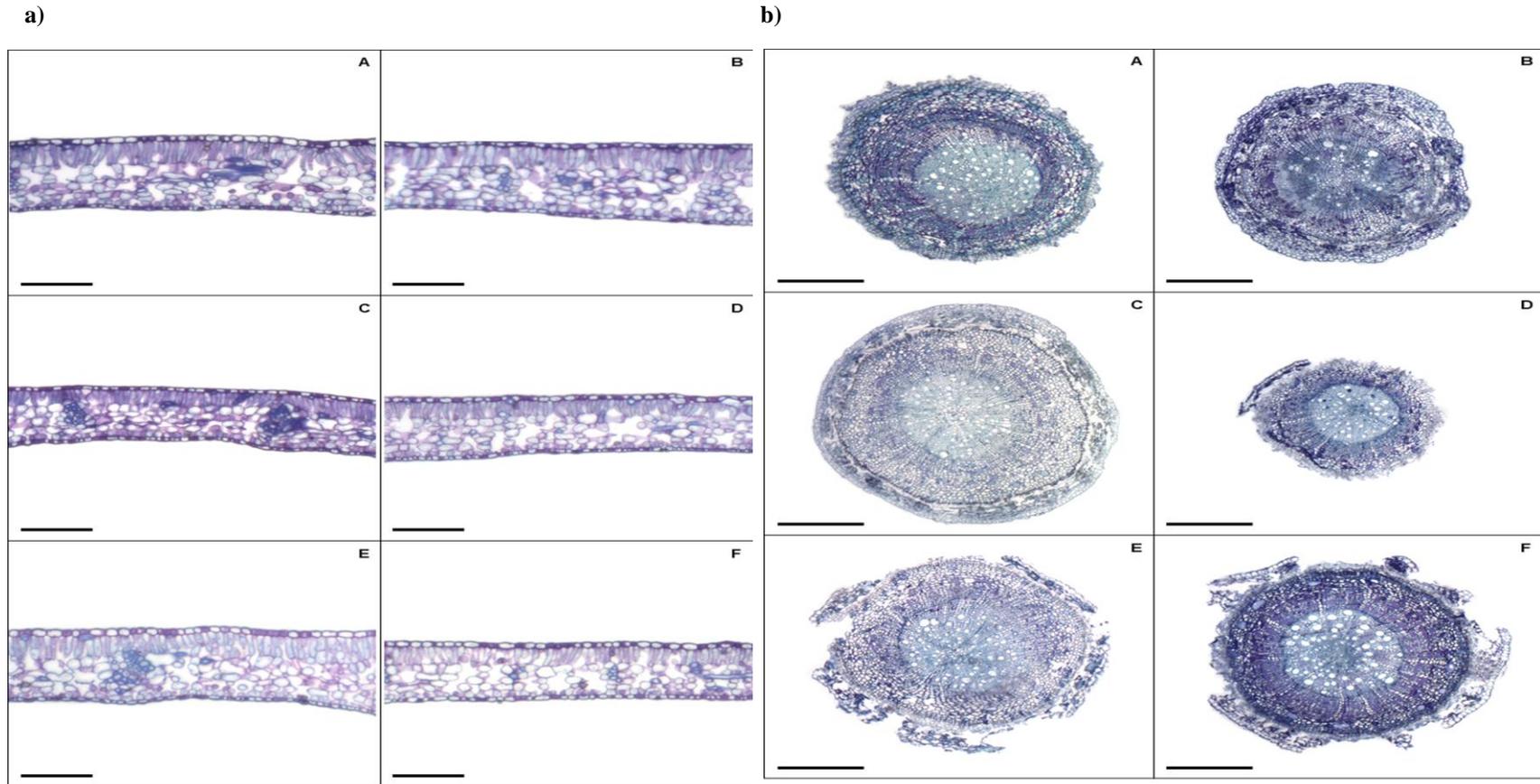
$$Z_{DEV} = 50,585534^{**} + 0,250313^{**}X - 0,076556 \cdot Y - 0,000503^{**} \cdot X^2 - 0,000566^{**} \cdot Y \cdot X - 0,004526 \cdot Y^2 \quad (R^2=0,89)$$

Legenda: Os asteriscos correspondem aos níveis de significância encontrados (\*\*p<0,001; \*p<0,05).

A superfície de resposta mostra que houve decréscimos exponenciais quadráticos nas espessuras e diâmetros dos tecidos radiculares quando utilizada a concentração de Cd  $75 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 4.2). A ECR foi reduzida em 81%, o que foi acompanhado pela diminuição no DEV de 80%. Essas variáveis mostraram-se mais sensíveis àquele nível de exposição (Figura 4.2; b, d).

No entanto, o silício modulou as respostas anatômicas. A espessura e o diâmetro dos tecidos radiculares analisados foram significativamente ( $p < 0,01$ ) aumentados nas plantas mantidas sob estresse por Cd  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e suplementadas com o mineral benéfico. Pela análise canônica, de modo geral, a combinação de Cd  $40 \text{ mg L}^{-1}$  e de Si  $165 \text{ mg L}^{-1}$ , resultou em pontos máximos do ECR e DEV de  $250 \mu\text{m}$  e  $58 \mu\text{m}$  e, nessas condições, houve incrementos 53% e 56% nesses tecidos quando comparados ao das plantas mantidas sob tratamento isolado com Cd  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

Figura 4.3. Seções transversais em folhas (a) e raízes (b) em plantas mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio (Cd) e de silício (Si).



Legenda: Letras maiúsculas representam os tratamentos: A= Cd 0 x Si 0; B= Cd 0 x Si 150; C= Cd 50 x Si 0; D= Cd 50 x Si 150; E= Cd 75 x Si 0; F= Cd 75 x Si 150

\*Unidade: (mg L<sup>-1</sup>).

#### 4.4. Discussão

Os aumentos graduais na concentração de cádmio (Cd) nos tecidos radiculares e foliares em *Khaya ivorensis* confirmam a eficácia das concentrações do íon metálico utilizadas neste estudo (Figura 2.8) em que a maior delas foi tóxica ao metabolismo vegetal e causou reduções drásticas nas espessuras epidérmicas dos tecidos foliares (Figura 4.1), bem como, alterações estruturais nos tecidos radiculares (Figura 4.2).

Estudos anteriores também confirmam os efeitos adversos do Cd sobre o metabolismo bioquímico e fisiológico das plantas com repercussões negativas na estrutura e na anatomia vegetal (PEREIRA et al., 2016; NIKOLIĆ et al., 2017; PEREIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

No entanto, o ácido monossilícico, mitigou os danos provocados por Cd aos tecidos de *K. ivorensis* submetidas à concentrações tóxicas do MP, mediante a diminuição da absorção e do acúmulo de Cd nas raízes. O nutriente modulou eficientemente a anatomia radicular por meio de aumentos taxativos na espessura do córtex radicular (CR) e nos diâmetros: do cilindro vascular (DCV) e do maior elemento de vaso (DEV) (Figura 4.2), indicando que o mineral suaviza a toxicidade de Cd, instigando a performance de crescimento do meristema radicular, mediante aos processos de expansão e divisão celulares, notadamente na epiderme.

Consideramos que essas modulações resultam do efeito positivo do Si na indução da síntese de suberina nas paredes das células endodérmicas na base radicular, o que contribuiu para o engrossamento desses tecidos, com conseqüente redução do transporte de Cd para o estelo, limitando, assim, o transporte apoplástico do íon metálico às partes aéreas do vegetal, o que explica as menores concentrações do MP na raiz, simultaneamente aos maiores níveis de Si no sistema radicular (Figura 2.8).

O desenvolvimento da endoderme, exoderme e outras barreiras extracelulares podem restringir a translocação de Cd para o xilema (FONTANILI et al., 2016). Assim, o espessamento da ECR configurou como estratégia de tolerância ao Cd induzida pelo Si em *K. ivorensis*, tendo em vista a redução da translocação do MP (Figura 4.2 b). Diversas pesquisas corroboram com esses resultados e mostram que o Si configura como um nutriente benéfico que atenua estresses provocados por Cd para um vasto número de espécies de plantas (LI et al., 2015; MALCOVSKA et al., 2014; FAROOQ et al. 2016; GREGER et al., 2016; CUI et al., 2017; KIM et al., 2017; LI et al., 2017; SHAO et al., 2017; RAHMAN et al., 2017).

Inferimos que o aumento do DR induzido pelo mineral benéfico (Figura 4.2; a), contribuiu para a ampliação das cargas negativas da parede celular e para o maior aprisionamento de Cd à elas. Estudos com plantas lenhosas constataram o sequestro de íons metálicos por constituintes da parede celular da raiz, o que configura como mecanismo de tolerância primário dessas espécies ao efeito fitotóxico por MPs (PEREIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018). Em consonância, Souza et al., (2011), observaram maior teor de Cd nas raízes de *Eucalyptus camaldulensis* em relação às partes aéreas, o que foi relacionado à sua ligação aos ácidos orgânicos presentes nos exudatos radiculares.

Um número restrito de estudos mostra que, o Si, promove o sequestro vacuolar de Cd por meio da ligação do MP ao complexo Si-hemicelulose em grupos específicos de plantas (MA et al., 2015; RAHMAN et al., 2017). Além disso, a indução do Si ao processo de quelatção do Cd às fitoalequitinas aparece como importante método de desintoxicação ao MP (FAROOQ et al., 2016).

Desse modo, sugerimos que os mecanismos de tolerância de *K. ivorensis* ao Cd mediados pelo Si envolvem o sequestro do íon tóxico por componentes da parede celular, bem como, pela indução da síntese de substâncias hidrofóbicas que se depositam radialmente e transversalmente na endoderme o que inferimos ter contribuído para o reforço à barreira mecânica ao influxo do MP imposto pelas estrias de Caspary. Assim, confirmamos que o nutriente foi fundamental para a fitoestabilização do Cd pelo mogno africano.

Essas inflexões do ácido monossilícico, em conjunto, limitam a entrada do metal nos cloroplastos e garantem a proteção do aparato fotossintético (PSII) e das enzimas nele envolvidas (FAROOQ et al., 2016). O Cd tem grande efeito sobre o complexo protéico Chla/Chlb II de captação de energia luminosa, em partes, por induzir na redução da densidade cloroplastos (CHOPPALA et al., 2014; PEREIRA et al., 2017).

No entanto, vale ressaltar que, a endoderme da bainha do feixe vascular, foi, também, mais espessa no tratamento com a dose intermediária do MP (Figura 4.3; a). A maior espessura desse tecido constituiu uma resposta da planta à diminuição da translocação de Cd para o parênquima clorofiliano evitando, dessa forma, possíveis danos ao sistema fotossintético, já que a exposição ao íon metálico afeta o desenvolvimento dos cloroplastos.

Níveis mais severos de Cd provocaram redução na área foliar útil (Figura 2.7, c), o que pode ter causado diminuição na relação massa/volume cloroplastídica. Inicialmente, essa alteração apareceu como estratégia compensatória de *K. ivorensis* à redução da área mesofílica. Essa espécie mostrou sensibilidade às maiores concentrações de Cd, o que ficou evidente pela redução nas espessuras do parênquima paliçádico (EEPP) e lacunoso (EEPE)

(Figura 4.1; c, d), tecidos diretamente relacionados ao metabolismo fotossintético e de trocas gasosas. Nesse sentido, atribuímos à fitotoxicidade do Cd sobre essas variáveis à inibição da expansão foliar, em virtude da redução do potencial de turgescência (Figura 2.4) e da condutância estomática (Figura 2.6).

Por outra via, a presença do Si no meio de cultivo restaurou os padrões anatômicos normais nos tecidos foliares, tendo em vista os decréscimos da concentração de Cd nesses compartimentos celulares (Figura 2.8, a) o que decorreu do efeito de diluição do MP induzido pelo micronutriente, conforme evidenciado pelos aumentos no potencial hídrico de *K. ivorensis* mantidas em condição de estresse pelo MP e suplementadas com Si (Figura 2.4). Estes resultados estiveram relacionados aos acréscimos nos diâmetros de tecidos condutores DCV e DEV (Figura 4.2; a, b) promovidos pelo Si, o que indica que o nutriente melhora o sistema hidráulico de mudas de mogno africano mantidas em condições de toxicidade por Cd.

Em adição, a hipótese da formação de uma barreira física abaixo da cutícula após a polimerização do ácido monossilícico, provavelmente, aumentou as espessuras da epiderme foliar abaxial (EEAB) e adaxial (EEAD) (Figura 4.1; a, b), e reduziu substancialmente a perda de água por processo transpiratório e restabeleceu o metabolismo fotossintético (Figura 2.6). Confirmamos, assim, o envolvimento do Si no metabolismo fisiológico das plantas.

Assim, na presença do Si, as etapas fotossintéticas de síntese e translocação de fotoassimilados necessárias ao crescimento e ao desenvolvimento vegetal foram asseguradas, o que contribuiu para o espessamento dos tecidos foliares analisados com repercussões positivas na aclimação das plantas de mogno africano ao efeito fitotóxico do Cd.

#### 4.5. Conclusão

Há evidências na literatura de que existe um transportador com um  $k_m$  de 0,15 mM, que medeia o transporte de silício para as células corticais em plantas que acumulam altos, médios e baixos níveis do mineral. Em resposta ao Cd, a densidade de transporte do Si nas células foi, provavelmente, acrescida no mogno africano, o que colaborou para as alterações anatômicas com evidentes aumentos na espessura dos tecidos epidérmicos foliares e radiculares, resultantes da diminuição da toxicidade por Cd induzida pelo nutriente em *K. ivorensis*. Comprovamos que a espécie, comporta-se como uma acumuladora mediana de Si.

Além disso, o Si participa do metabolismo fisiológico do mogno africano por induzir no maior espessamento do diâmetro do cilindro vascular e do maior elemento de vaso, tecidos

reconhecidamente condutores, o que garantiu a manutenção do status hídrico das plantas em níveis satisfatórios ao crescimento. Em adição, no sistema radicular, o Si, provavelmente, promoveu o depósito radial e transversal de suberina nas células epidérmicas e, assim, contribuiu para reforçar as estrias de Caspary reduzindo o transporte apoplástico do Cd às partes aéreas. Esse mecanismo de ação do nutriente contribuiu para a fitoestabilização do Cd nas plantas e preveniu danos ao maquinário fotossintético, fato que permitiu ganhos no crescimento e espessamento dos tecidos foliares.

Não descartamos, ainda, o envolvimento do nutriente nos processos de complexação, compartimentalização e quelação do MP, o que contribuiu para o aumento da tolerância de *K. ivorensis* à toxicidade por Cd, o que carece, no entanto, de maior investigação.

#### 4.6. Referências:

CHEN D, CHEN D, XUE R, LONG J, LIN X, LIN Y, JIA L, ZENG R, SONG Y. Effects of boron, silicon and their interactions on cadmium accumulation and toxicity in rice plants. **Journal of hazardous materials**, v. 367, p. 447-455, 2019.

CHOPPALA, G., SAIFULLAH, BOLAN, N., BIBI, S., IQBAL, M., RENGEL, Z., & OK, Y. S. Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. **Critical reviews in plant sciences**, v.33 n.5,p. 374-391, 2014

CUI, J., LIU, T., LI, F., YI, J., LIU, C., & YU, H.. Silica nanoparticles alleviate cadmium toxicity in rice cells: mechanisms and size effects. **Environmental Pollution**, v. 228, p. 363-369, 2017.

DE SOUZA, E. P., DA SILVA, I. D. F., & FERREIRA, L. E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 2, 2011.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 1, p. 11-17, 1994.

FAROOQ, M. A., DETTERBECK, A., CLEMENS, S., & DIETZ, K. J. Silicon-induced reversibility of cadmium toxicity in rice **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 11, p. 3573-3585, 2016.

FLECK, A. T., NYE, T., REPENNING, C., STAHL, F., ZAHN, M., & SCHENK, M. . Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 6, p. 2001-2011, 2010.

FONTANILI, L., LANCILLI, C., SUZUI, N., DENDENA, B., YIN, Y. G., FERRI, A.& SACCHI, G. A. KINETIC analysis of zinc/cadmium reciprocal competitions suggests a

possible Zn-insensitive pathway for root-to-shoot cadmium translocation in rice. **Rice**, v. 9, n. 1, p. 16, 2016.

GREGER, M., KABIR, A. H., LANDBERG, T., MAITY, P. J., & LINDBERG, S. Silicate reduces cadmium uptake into cells of wheat. **Environmental Pollution**, v.211, p.90-97, 2016.

HUSSAIN, I., ASHRAF, M. A., RASHEED, R., ASGHAR, A., SAJID, M. A., & IQBAL, M. Exogenous application of silicon at the boot stage decreases accumulation of cadmium in wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 223-234, 2015.

IMTIAZ M, RIZWAN MS, MUSHTAQ MA, ASHRAF M, SHAHZAD SM, YOUSAF B, SAEED DA, RIZWAN M, NAWAZ MA, MEHMOOD S, TU S. Silicon occurrence, uptake, transport and mechanisms of heavy metals, minerals and salinity enhanced tolerance in plants with future prospects: **Journal of environmental management**, v. 183, p. 521-529, 2016.

IORI, V., PIETRINI, F., BIANCONI, D., MUGHINI, G., MASSACCI, A., & ZACCHINI, M. Analysis of biometric, physiological, and biochemical traits to evaluate the cadmium phytoremediation ability of eucalypt plants under hydroponics. **iForest-Biogeosciences and Forestry**, v. 10, n. 2, p. 416, 2017.

JI, X., LIU, S., JUAN, H., BOCHARNIKOVA, E. A., & MATICHENKOV, V. V. Effect of silicon fertilizers on cadmium in rice (*Oryza sativa*) tissue at tillering stage. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.11, p.10740-10748, 2017.

KIM, Y. H., KHAN, A. L., WAQAS, M., & LEE, I. J. Silicon regulates antioxidant activities of crop plants under abiotic-induced oxidative stress: a review. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 510, 2017.

LI, N., LI, R., FENG, J., ZHANG, Z., & SHEN, F. Remediation effects of heavy metals contaminated farmland using fly ash based on bioavailability test. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v.31, n.16, p.213-219, 2015.

LI, P., ZHAO, C. Z., ZHAND, Y. Q., WANG, X. M., WANG, J. F., WANG, F., & BI, Y. R. Silicon enhances the tolerance of *Poa annua* to cadmium by inhibiting its absorption and oxidative stress. **Biologia plantarum**, v. 61, n. 4, p. 741-750, 2017.

MA, J., SHENG, H., LI, X., & WANG, L. iTRAQ-based proteomic analysis reveals the mechanisms of silicon-mediated cadmium tolerance in rice (*Oryza sativa*) cells. **Plant physiology and biochemistry**, v. 104, p. 71-80, 2016.

\_\_\_\_CAI, H., HE, C., ZHANG, W., & WANG, L. A hemicellulose-bound form of silicon inhibits cadmium ion uptake in rice (*Oryza sativa*) cells. **New Phytologist**, v. 206, n. 3, p. 1063-1074, 2015.

\_\_\_\_\_ZHANG, X., & WANG, L. Synergistic effects between [Si-hemicellulose matrix] ligands and Zn ions in inhibiting Cd ion uptake in rice (*Oryza sativa*) cells **Planta**, v. 245, n. 5, p. 965-976, 2017.

MALČOVSKÁ, S. M., DUČAIOVÁ, Z., MASLAŇÁKOVÁ, I., & BAČKOR, M. Effect of silicon on growth, photosynthesis, oxidative status and phenolic compounds of maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium excess. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 8, p. 2056, 2014.

MINKINA, T., FEDORENKO, G., NEVIDOMSKAYA, D., FEDORENKO, A., CHAPLYGIN, V., & MANDZHIEVA, S. Morphological and anatomical changes of *Phragmites australis* Cav. due to the uptake and accumulation of heavy metals from polluted soils. **Science of the Total Environment**, v. 636, p. 392-401, 2018.

NIKOLIĆ, N., ZORIĆ, L., CVETKOVIĆ, I., PAJEVIĆ, S., BORIŠEV, M., ORLOVIĆ, S., & PILIPOVIĆ, A. Assessment of cadmium tolerance and phytoextraction ability in young *Populus deltoides* L. and *Populus*× *euramericana* plants through morpho-anatomical and physiological responses to growth in cadmium enriched soil. **IForest-Biogeosciences and Forestry**, v. 10, n. 3, p. 635, 2017.

O'BRIEN, T., FEDER, N., & MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, J. P. V., PEREIRA, M. P., DUARTE, V. P., CORRÊA, F. F., CASTRO, E. M., & PEREIRA, F. J. Cadmium tolerance of *Typha domingensis* Pers. (*Typhaceae*) as related to growth and leaf morphophysiology. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3, p. 509-516, 2018.

OZYIGIT, I. I., VARDAR, F., YASAR, U., & AKINCI, S. Long-term effects of aluminum and cadmium on growth, leaf anatomy, and photosynthetic pigments of cotton. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 44, n. 21, p. 3076-3091, 2013.

PEREIRA, F. J., DE CASTRO, E. M., PIRES, M. F., DE OLIVEIRA, C., & PASQUAL, M. Anatomical and physiological modifications in water hyacinth under cadmium contamination. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 90, 2017.

QIAN, L., CHEN, M., & CHEN, B. Competitive adsorption of cadmium and aluminum onto fresh and oxidized biochars during aging processes. **Journal of Soils and Sediments**, v. 15, n. 5, p. 1130-1138, 2015.

RAHMAN, M. F., GHOSAL, A., ALAM, M. F., & KABIR, A. H. Remediation of cadmium toxicity in field peas (*Pisum sativum* L.) through exogenous silicon. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 135, p. 165-172, 2017.

ROWE, S., & SMOLINSKA, B. The potential of *Lepidium sativum* L. for phytoextraction of Hg-contaminated soil assisted by thiosulphate. *Journal of Soils & Sediments: Journal of Soils & Sediments: Protection, Risk Assessment, & Remediation*, v. 15, n. 2, 2015.

SCHLICHTING, C. D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual review of ecology and systematics*, v. 17, n. 1, p. 667-693, 1986.

SHAO JF, CHE J, YAMAJI N, SHEN RF, MA JF. Silicon reduces cadmium accumulation by suppressing expression of transporter genes involved in cadmium uptake and translocation in rice. *Journal of experimental botany*, v. 68, n. 20, p. 5641-5651, 2017.

SHI G, ZHANG Z, LIU C. Silicon influences cadmium translocation by altering subcellular distribution and chemical forms of cadmium in peanut roots. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v. 63, n. 1, p. 117-123, 2017.

TRIPATHI, D. K., SINGH, S., SINGH, V. P., PRASAD, S. M., DUBEY, N. K., & CHAUHAN, D. K. Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 110, p. 70-81, 2017.

VACULÍK, M., PAVLOVIČ, A., & LUX, A. Silicon alleviates cadmium toxicity by enhanced photosynthetic rate and modified bundle sheath's cell chloroplasts ultrastructure in maize. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 120, p. 66-73, 2015.

WU J, GEILFUS C-M, PITANN B, MÜHLING K-H. Silicon-enhanced oxalate exudation contributes to alleviation of cadmium toxicity in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, v. 131, p. 10-18, 2016.

XU, Q., WANG, C., LI, S., LI, B., LI, Q., CHEN, G., & WANG, F. Cadmium adsorption, chelation and compartmentalization limit root-to-shoot translocation of cadmium in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 12, p. 11319-11330, 2017.

XUE, L. P., CHANG, X. H., LI, S. H., MA, L. F., & WANG, L. Y. The structural diversity and photoluminescent properties of cadmium thiophenedicarboxylate coordination polymers. *Dalton Transactions*, v. 43, n. 19, p. 7219-7226, 2014.

YU, H. Y., DING, X., LI, F., WANG, X., ZHANG, S., YI, J., ... & WANG, Q. The availabilities of arsenic and cadmium in rice paddy fields from a mining area: the role of soil extractable and plant silicon. *Environmental pollution*, v. 215, p. 258-265, 2016.

ZHANG Q, YAN Q, LIU J, LU H, WANG W, DU J, DUAN H. Silicon alleviates cadmium toxicity in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. seedlings in relation to root anatomy and radial oxygen loss. *Marine pollution bulletin*, v. 76, n. 1-2, p. 187-193, 2013.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

A partir do referencial teórico adotado como indicador do nível de tolerância e potencial fitorremediador, confirmamos que o mogno africano (*Khaya ivorenses* A. Chev.) é fitorremediadora ao Cd e apresenta potencial para remediar solos contaminados com até Cd 25 mg L<sup>-1</sup>. Essa concentração é oito vezes superior ao valor de intervenção para áreas de proteção máxima (APMax) conforme proposto pelo CONAMA. A espécie mostrou-se tolerante a essa condição adversa, tendo em vista a manutenção de taxas de crescimento e de produção de biomassa satisfatórias, equivalentes às das plantas não estressadas.

Esses resultados foram atribuídos à indução de *K. ivorenses* na redução da translocação de Cd para as partes aéreas e no maior acúmulo do íon no sistema radicular. Nesse aspecto, a fitoestabilização, apareceu como estratégia primária de tolerância dessa espécie àquele nível de contaminação por Cd.

Por outro lado, para ambientes contaminados com Cd 50 mg L<sup>-1</sup>, as modulações adaptativas do mogno africano não são suficientes para garantir seu crescimento e desenvolvimento. Nessa concentração, há grande mobilização do Cd das raízes para as partes aéreas do vegetal, com conseqüente dano ao metabolismo bioquímico, fisiológico e anatômico.

Diante disso, a suplementação com Si 150 mg L<sup>-1</sup> é fundamental e assegura o restabelecimento do metabolismo normal das plantas e potencializa o caráter fitorremediador de *K. ivorenses* ao Cd, sobre tudo, porquê o nutriente imobiliza o Cd nas raízes e evita sua entrada no xilema, provavelmente, por processos de suberização de tecidos radiculares, bem como, pelo eficiente aumento na espessura do córtex e do diâmetro radicular. As modificações anatômicas nesses tecidos induzidas pelo Si preveniram a translocação do MP para órgãos superiores do vegetal e sua conseqüente entrada em tecidos metabolicamente ativos e evitaram danos à maquinaria fotossintética.

De modo geral, espécies lenhosas não são acumuladoras de Si, ou acumulam níveis extremamente baixos do mineral em seus tecidos, o que impede as modulações do micronutriente benéfico nas respostas adaptativas dos vegetais às condições inóspitas de crescimento. Comprovamos que *K. ivorenses*, concentra níveis intermediários do ácido monossalicílico nos diferentes órgãos do vegetal, o que assegurou sua tolerância à fitotoxicidade causada por Cd em níveis mais extremos de contaminação pelo MP.