UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUCAS CARVALHO DE FREITAS

PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Lemna aequinoctialis* SOB ESTRESSE POR CHUMBO

Recife
2020

LUCAS CARVALHO DE FREITAS

PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Lemna aequinoctialis* SOB ESTRESSE POR CHUMBO

Dissertação a apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior
Coorientadora: Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

Recife
2020

Catalogação na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Freitas, Lucas Carvalho de
Proteômica diferencial de *Lemna aequinoctialis* sob estresse por chumbo / Lucas Carvalho de Freitas - 2020.
99 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Tercilio Calsa Junior
Coorientadora: Fabiana Aparecida Cavalcante Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Lentilhas-d´água 2. Fitorremediação 3. Análise Proteômica I. Calsa Junior, Tercilio (Orientador) II.Silva, Fabiana Aparecida Cavalcante (Coorientadora) III. Título

584.64 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2020-200

LUCAS CARVALHO DE FREITAS

PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Lemna aequinoctialis* SOB ESTRESSE POR CHUMBO

Dissertação a ser apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Aprovado em: 19/02/2020

_____

(Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____

(Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

_____

(Prof. Dr. Marcus Vinícius Loss Sperandio)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFPE

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois Ele é a energia vital que permeia todo o universo e que nos inunda com sua imensa sabedoria e amor, sempre direcionando nossos passos para o melhor caminho possível.

Quero agradecer aos meus pais, João de Freitas (matuto) e Schirley, que sempre cuidaram de mim com muito carinho e afeto, me apoiando incondicionalmente em todas as decisões que tomei, sempre estando ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis. Não poderia ter escolhido pais melhores para essa existência! A eles dedico essa conquista! Também gostaria de agradecer aos meus irmãos Filipe e Guilherme, as minhas tias Beronice, Beronete e Josinete por terem me proporcionado ótima estadia durante o período que permaneci em Brasília e a toda minha família, principalmente aqueles que apesar de não estarem fisicamente presentes, sempre estarão em nossas lembranças, em nossos corações, com a certeza que futuramente nos reencontraremos.

Gostaria de agradecer ao Professor Tercilio, por ter me aceitado no grupo e ter acreditado no meu potencial, sempre me orientando e ensinando com muita dedicação durante esses dois anos de convívio. Também agredeço pelos ótimos momentos vividos juntos durante esse período, seja pelas conversas, viagens a congressos, confraternizações e claro, pelo ótimo senso de humor.

Gostaria de agradecer a todos os profissionais que integram a equipe do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) por todo o carinho, atenção, dedicação e principalmente pela excelente formação acadêmica a qual tive acesso. Tenho orgulho de ter sido discente e de carregar o nome desse PPG tão incrível. Também gostaria de agradecer a minha maravilhosa turma do mestrado por todo companherismo e momentos de descontração!

Gostaria de agradecer a Fabiana, por ser mais que uma co-orientadora, por ser uma grande amiga. Obrigado por todos ensinamentos, puxões de orelha, momentos de descontração e companherismo, sempre sendo essa pessoa que alegra a todos a sua volta com sua energia.

Gostaria de agradecer a toda equipe do LGPP: Elton, Geise, José, Rodrigo, Rayssa, Sheyla, Mara, Tainara, Heloisa, Raphael, Daniel, Nathália pela convivência diária, por tornarem o ambiente e rotina do laboratório tão agradáveis e por todo os ensinamentos. Não existe equipe melhor na UFPE!! Também gostaria de agradecer a

Marciana e Adauto pelos ensimentos e por todo auxílio que tive no decorrer do trabalho.

Gostaria de agredecer ao Professor Dr. Emmanuel Dutra, a Professora Dr. Ana Christina e a MsC. Sibelly, por terem me ajudado com as análises de quantificação do Pb e análises citogenéticas. Também gostaria de agredecer a participação na banca de qualificação!

Gostaria de agredecer ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste e a técnica Julia Campos pela disponibilidade de uso do MALDI-TOF/TOF.

Gostaria de agradecer a CAPES pela concessão ao auxílio financeiro.

Gostaria de agradecer a todos (as) que fizeram parte da minha vida acadêmica nesses dois anos.

Por fim, gostaria de agradecer a todos aqueles brasileiros que, apesar das dificuldades, contribuem para o para o desenvolvimento da ciência e tecnologia do Brasil. DESISTIR, JAMAIS!

RESUMO

As lentilhas-d´água são macrófitas aquáticas que tem despertado o interesse da comunidade científica devido a sua aplicação como ferramenta sustentável para solucionar problemas ambientais emergentes. Destacam-se devido a sua capacidade de fitorremediação associada produção de biomassa. Desse modo, as lentilhas-d´água podem ser utilizadas como alternativa para o tratamento de águas residuais antropogênicas que contém grandes concentrações de poluentes, dentres estes, o chumbo (Pb), metal pesado que possui grande relevância no contexto ambiental. Para maior entendimento dos mecanismos moleculares das lentilhas-d´água em resposta ao Pb, a análise proteômica é uma ferramenta analítica que permite identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs), fornecendo descrições detalhadas da estrutura e função dos sistemas biológicos em diferentes condições ambientais. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi identificar as DAPs de lentilhas-d´água em resposta ao Pb. Cerca de 15 frondes de *Lemna aequinoctialis* clone M1 foram cultivadas durante 12 dias em meio SH 0,5X e distribuídas em 5 tratamentos: 0 mM, 150 mM, 300 mM, 450 mM e 600 mM de Pb(NO3)2 para mensuração das taxas de crescimento e seleção da concentração subletal de Pb para análise proteômica subsequente. As proteínas totais das amostras de cada tratamento foram extraídas pelo método SDS-Denso, quantificadas pelo método de Bradford e posteriormente separadas por eletroforese bidimensional. Os géis foram digitalizados em scanner de transparência e analisados no programa ImageMaster. As DAPs identificadas foram excisadas dos géis, digeridas com tripsina e identificadas por espectrometria de massas (MS). As análises das taxas de crescimento indicaram a concentração de 300 mM de Pb como a subletal, sendo este tratamento utilizado como condição contrastante para a análise proteômica diferencial (0 x 300 mM / Pb(NO3)2). Foram identificadas 157 DAPs, dentre as quais, a análise por MS permitiu a identificação de 41 proteínas. Dentre as proteínas identificadas, destacam-se aquelas diretamente relacionadas aos mecanismos de tolerância a metais pesados, como a glutarredoxina, endonucleases de recombinação homóloga e metalotioneínas. O entendimento da modulação de respostas das lentilhas-d´água ao Pb permite a identificação de proteínas que poderão ser utilizadas como biomarcadores funcionais para seleção de potenciais clones fitorremediadores desse metal.

Palavras-chaves: Lentilhas-d´água. Fitorremediação. Análise Proteômica.

ABSTRACT

The duckeed are aquatic macrophytes that have aroused the interest of the scientific community due to their application as a sustainable tool to solve emerging environmental problems. They stand out due to their phytoremediation capacity associated with biomass production. In this way, duckweed can be used as an alternative for the treatment of anthropogenic wastewater that contains large concentrations of pollutants, including lead (Pb), a heavy metal that has great relevance in the environmental context. For a better understanding of the molecular mechanisms of duckweed in response to Pb, proteomic analysis is an analytical tool that allows the identification of differentially accumulated proteins (DAPs), providing detailed descriptions of the structure and function of biological systems under different environmental conditions. In view of the above, the objective of the present study was to identify the duckweed DAPs in response to Pb. 15 fronds of *Lemna aequinoctialis* clone M1 were grown for 12 days in 0.5X SH medium and distributed in 5 treatments: 0 mM, 150 mM, 300 mM, 450 mM and 600 mM Pb (NO3)2 for measuring growth rates and selecting the sublethal concentration of Pb for subsequent proteomic analysis. The total proteins of the samples of each treatment were extracted by the SDS-Denso method, quantified by the Bradford method and later separated by two-dimensional electrophoresis. The gels were digitized on a transparency scanner and analyzed using the ImageMaster program. The identified DAPs were excised from the gels, digested with trypsin and identified by mass spectrometry (MS). The analysis of growth rates indicated the concentration of 300 mM of Pb as the sublethal, this treatment being used as a contrasting condition for the differential proteomic analysis (0 x 300 mM / Pb (NO3)2). 157 DAPs were identified, among which, the analysis by MS allowed the identification of 41 proteins. Of the all proteins identified, those directly related to mechanisms of tolerance to heavy metals, such as glutaredoxin, homologous recombination endonucleases and metallothioneins. Understanding the modulation of duckweed responses to Pb allows the identification of proteins that can be used as functional biomarkers for the selection of potential phytoremediation clones of this metal.

Keywords: Duckweed. Phytoremediation. Proteomic Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Aspectos morfológicos e filogenéticos dos cincos gêneros de lentilhas-d´água..... 18

Figura 2- Esquematização dos diferentes agentes estressores bióticos e abióticos. 22

Figura 3- Visão generalizada da toxicidade intracelular causados pelo Pb. O Pb pode se complexar com os componentes dos fotossistemas causando alterações na fotossíntese, bem como induzir a formação de EROs que gera danos às membranas celulares e material genético, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica..... 27

Figura 4- Visão geral dos mecanismos de resposta (tolerância) frente ao estresse pelo Pb. A detoxificação celular ocorre pela produção de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos e pela síntese de fitoquelatinas e metalotioteínas e posterior compartimentalização em vacúolo..... 31

Figura 5- *L. aequinoctialis* clone M1 em meio de cultura SH 0,5X com adição de Pb $(NO_3)_2$. Bioensaio realizado a partir do inóculo de populações clonais submetidas a diferentes concentrações de Pb $(NO_3)_2$ durante 12 dias..... 48

Figura 6- Taxa de crescimento relativo de *L. aequinoctialis* clone M1 em resposta a diferentes concentrações de Pb $(NO_3)_2$ ao longo (A) e no final (B) do período experimental. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p<0,05$, onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle 49

Figura 7- Taxa de inibição do crescimento de *L. aequinoctialis* clone M1 em resposta a diferentes concentrações de $Pb(NO_3)_2$ ao longo (A) e no final (B) do período experimental. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p<0,05$, onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle..... 50

Figura 8- Tempos de duplicação de *L. aequinoctialis* clone M1 sob diferentes concentrações de $Pb(NO_3)_2$ ao final do período experimental. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p<0,05$, onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle..... 51

Figura 9- Rendimento de biomassa de de *L. aequinoctialis* clone M1 em resposta a diferentes concentrações de Pb $(NO_3)_2$ ao longo (A) e no final (B) do período experimental. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p<0,05$, onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle..... 52

Figura 10- Bioacúmulo de Pb^{2+} nas populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1 cultivadas na concentração de 300 mM de de Pb $(NO_3)_2$ ao final do período experimental. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Teste t-student estabelecidos em $p<0,05$, onde * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle..... 53

Figura 11- Teores globais de clorofila “a”, “b”, totais e carotenoides das populações de *L. aequinoctialis* clone M1 submetidas ao tratamento com 0 mM x 300 mM de $Pb(NO_3)_2$. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Teste t-student estabelecido em $p<0,05$, onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle..... 54

Figura 12- SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5% das proteínas solúveis totais de *L. aequinoctialis* clone M1 submetidas a dois tratamentos: [0 mM] (C-1, C-2, C-3) X [300 mM] (E-1, E-2, E-3). Marcador de baixo peso molecular (MM) em KDa..... 55

Figura 13- Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* em diferentes massas moleculares e pontos isoelétricos: A - 0 mM e B – 300 mM. Marcador de baixo peso molecular (MM) em KDa..... 56

Figura 14- Distribuição das DAPs identificadas do proteoma diferencial das populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1 em diferentes faixas pontos isoelétricos..... 58

Figura 15- Distribuição das DAPs identificadas do proteoma diferencial das populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1 em diferentes faixas de peso molecular..... 58

Figura 16- Categorização das DAPs identificadas de *L. aequinoctialis* clone M1 em processo biológico. Comparação entre as DAPs do tratamento controle (0 mM – $Pb(NO_3)_2$) e estresse (300 mM - $Pb(NO_3)_2$)..... 66

Figura 17- Categorização das DAPs identificadas de *L. aequinoctialis* clone M1 em função molecular. Comparação entre as DAPs do tratamento controle (0 mM - $Pb(NO_3)^2$) e estresse (300 mM - $Pb(NO_3)_2$)..... 67

Figura 18- Categorização das DAPs identificadas de *L. aequinoctialis* clone M1 em localização subcelular. Comparação entre as DAPs do tratamento controle (0 mM - $Pb(NO_3)_2$) e estresse (300 mM - $Pb(NO_3)^2$)..... 68

Figura 19- Rede de interação proteína-proteína analisada pelo software CYTOSCAPE das proteínas do proteoma diferencial de *L. aequinoctialis* M1. Cores: Azul - proteínas da condição controle/ Vermelho: proteínas do tratamento com Pb^{2+}..... 69

Figura 20- Modelo biológico dos processos de regulação de proteínas *de L. aequinoctialis* M1 (RDSC5500) submetido ao estresse por Pb^{2+}. As setas em vermelho e azul indicam, respectivamente, as proteínas com maior e menor acúmulo diferencial no tratamento com 300 mM de Pb $(NO_3)_2$..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição e categorização das DAPs identificadas do proteoma diferencial das populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1..... 57

Tabela 2- Identificação presumível das DAPs do tratamento controle de *L. aequinoctialis* clone M1 cultivado em meio de cultura SH 0,5X. Anotação putativa realizada de acordo com os padrões de similaridade (p≤0.05) da plataforma Mascot..... 60

Tabela 3- Identificação presumível das DAPs do tratamento sob estresse de *L. aequinoctialis* clone M1 cultivado em meio de cultura SH 0,5X:300 mM Pb $(NO_3)_2$. Anotação putativa realizada de acordo com os padrões e similaridade (p≤0.05) da plataforma Mascot..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS

BFC	Fator de bioconcentração
BSA	Albumina de soro bovino
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
DAPs	Proteínas diferencialmente acumuladas
DTT	Ditiotreitol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GO	Ontologia gênica
IAA	Iodoacetamida
IEF	Focalização isoelétrica
MM	Massa molecular
MS	Espectrometria de massas
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
pI	Ponto isoelétrico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PMF	Impressão digital do peptídeo (*peptide mass fingerprint*)
RDSC	*Rutgers Duckweeds Stock Cooperative*
RB	Rendimento de biomassa
SDS	Dodecilsulfato de sódio
2D- PAGE	Eletroforese bidimensional
TCR	Taxa de crescimento relativo
TD	Tempo de duplicação
TI	Taxa de inibiçãoa
TOF	Tempo de vôo
TFA	Ácido Trifluoroacético
UWPR	*University Washington proteomics resources*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 OBJETIVOS 17
1.1.1 Objetivo geral 17
1.1.2 Objetivos específicos 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 LENTILHAS-D´ÁGUA: ASPECTOS GERAIS 18
2.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LENTILHAS-D´ÁGUA 20
2.3 ESTRESSES AMBIENTAIS 21
2.3.1 Metais pesados 22
2.3.1.1 Chumbo 24
2.4 TOXICIDADE INDUZIDA POR CHUMBO 26
2.4.1 Alterações no crescimento e desenvolvimento vegetal 27
2.4.2 Desequilíbrio do metabolismo oxidativo 28
2.4.3 Deficiência fotossintética 28
2.4.4 Genotoxicidade 29
2.4.5 Degradação proteica e inibição da atividade enzimática 30
2.5 MECANISMOS DE RESPOSTA FRENTE AO ESTRESSE POR CHUMBO 30
2.5.1 Antioxidantes enzimáticos 32
2.5.2 Antioxidantes não-enzimáticos 33
2.5.3 Glutationa, fitoquelatinas e metalotioneínas 34
2.6 ANÁLISE PROTEÔMICA 35
3 MATERIAIS E MÉTODOS 39
3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO* 39
3.2 CULTIVO SOB ESTRESSE POR CHUMBO (Pb^{2+}) 39
3.3 TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO, RENDIMENTO DE BIOMASSA, TAXA DE INIBIÇÃO E TEMPO DE DUPLICAÇÃO 40
3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES 41
3.5 QUANTIFICAÇÃO DO BIOACÚMULO DE Pb^{2+} E DETERMINAÇÃO DO FATOR DE BIOCONCENTRAÇÃO 41
3.6 ANÁLISES ESTATÍSICAS 42
3.7 EXTRAÇÃO PROTEICA 42
3.8 QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DAS PROTEÍNAS 42
3.9 ANÁLISE PROTEÔMICA POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE) 43

3.9.1 Focalização isoelétrica (1º dimensão) 43
3.9.2 2D-PAGE (2º dimensão) 44
3.10 DIGITALIZAÇÃO DOS GÉIS 44
3.11 ANÁLISE DAS IMAGENS 44
3.12 DIGESTÃO DOS SPOTS COM TRIPSINA 45
3.13 ESPECTROMETRIA DE MASSAS 46
3.14 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA 46
3.14.1 Identificação das proteínas 46
3.14.2 Ontologia gênica (GO) 46
4 RESULTADOS 48
4.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO ASSOCIADOS AO CULTIVO COM $Pb(NO_3)_2$ 48
4.2 QUANTIFICAÇÃO DO BIOACÚMULO DE Pb^{2+} 53
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS 53
4.4 ANÁLISE PROTEÔMICA 54
5 DISCUSSÃO 71
5.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO ASSOCIADOS AO ESTRESSE POR CHUMBO 71
5.2 QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS 72
5.3 QUANTIFICAÇÃO DO BIOACÚMULO DE Pb^{2+} 73
5.4 ANÁLISE PROTEÔMICA 74
5.4.1 Cloroplasto 74
5.4.2 Núcleo 76
5.4.3 Citoplasma 78
5.4.4 Membrana plasmática 80
5.4.5 Mitocôndria 81
5.4.6 Retículo endoplasmático 82
5.4.8 Citoesqueleto 82
6 CONCLUSÕES 84
REFERÊNCIAS 85

1 INTRODUÇÃO

As lentilhas-d´água constituem um grupo de pequenas macrófitas aquáticas pertencentes a família Araceae que tem despertado o interesse da comunidade científica devido as suas diferentes aplicações biotecnológicas, destacando-se o potencial fitorremediador dessas plantas, as quais podem ser utilizadas como ferramenta sustentável para o tratamento de águas residuais antropogênicas (KHELLAF; ZERDAOUI, 2012; ZHAO et al., 2012).

O descarte inadequado de efluentes domésticos e industriais contendo metais pesados, dentre esses o chumbo (Pb), é um grave problema para a biota associada aos ecossistemas aquáticos e principalmente para a saúde humana. Nesse contexto, as lentilhas-d´água podem ser utilizadas uma como alternativa eficiente e de baixo custo para a remediação de corpos hídricos contaminados por esse metal (SINGH, GUPTA, TIWARI, 2012; DAUD et al., 2018).

Para que o processo de fitorremediação seja eficaz, torna-se necessário a identificação e utilização de ecótipos de lentilhas-d´água que sejam eficientes em bioacumular o Pb biodisponível nos corpos hídricos ao mesmo tempo que são capazes de mitigar os potenciais efeitos tóxicos causados por esse metal (HESAMI et al., 2018). Os ecótipos de lentihas-d´água que possuem tais características são classificados como acumuladores ou tolerantes ao Pb, enquanto aqueles que não dispõem desses atributos podem ser classificados como sensíveis ao Pb (EMMAVERDIAN et al., 2015).

A toxicidade proveniente do bioacúmulo do Pb é capaz de causar a plantas sensíveis distúrbios associados processos fisiológicos e bioquímicos, tais como disfunções nas relações hídricas, incapacidade de absorção de nutrientes, déficits de crescimento e deficiência fotossintética (SILVEIRA et al., 2012; GONTIJO, MONTEIRO, ROSA, 2017), além de favorecer o desequilíbrio do metabolismo oxidativo a partir da elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que ocasionam danos oxidativos como a peroxidação das membranas celulares, degradação proteica, inibição da atividade enzimática e danos ao material genético (ESTEVES; SUZUKI, 2008; RODRIGUES et al., 2016; KUMAR, PRASAD, 2018).

Em contrapartida, plantas acumuladoras/tolerantes ao Pb dispõem de mecanismos moleculares capazes de mitigar os efeitos deletérios associados a toxicidade desse metal, por exemplo, a partir da detoxificação do Pb^{2+} livre

citoplasmático por proteínas quelantes de íons metálicos como as fitoquelatinas e metalotioneínas, bem como pela síntese de enzimas antioxidantes capazes de reduzir os níveis de EROs diante do estresse oxidativo causado pelo Pb^{2+} e outros mecanismos de resposta associados (SINGH et al., 2016).

A ativação desses mecanismos moleculares de resposta ao Pb estão associados a modulações nos níveis de expressão gênica que resultam em mudanças a níveis transcricionais e traducionais, consequentemente alterando o metabolismo vegetal (SUOKKO, 2008). Entretanto apenas os dados de expressão gênica não são suficientes para revelar complexidade de respostas moleculares ao Pb e dessa forma, o nível da expressão dos transcritos nem sempre é correlacionado com o padrão celular das proteínas sintetizadas (SINGH et al., 2016; MORAIS, 2017).

Desse modo, a proteômica surge como uma ferramenta analítica que permite obter respostas mais próximas do fenótipo (PACHECO et al., 2014). A análise proteômica utiliza diversas técnicas para identificação de proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs), fornecendo descrições detalhadas da estrutura e função dos sistemas biológicos em diferentes condições biológicas (SUOKKO, 2008; DALCORSO et al., 2013).

Nesse contexto, a utilização da proteômica para o entendimento dos mecanismos de respostas das lentilhas-d´água frente ao bioacúmulo e tolerância ao Pb permite a identificação de biomarcadores funcionais que podem ser utilizados na seleção de potenciais ecótipos (clones) fitorremediadores desse metal. Diante do exposto, o presente trabalho visa identificar proteínas de lentilhas-d´água diferencialmente acumuladas em resposta ao Pb.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Identificar os mecanismos moleculares de *L. aequinoctilis* em resposta ao bioacúmulo e toxicidade causada pelo chumbo;

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o clone M1 de *L. aequinoctialis* quanto a sua capacidade de fitorremediação do chumbo;

- Estabelecer o perfil eletroforético 2D de proteínas totais dos isolados com resposta contrastante ao estresse;

- Identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) por espectrometria de massas (MS);

- Determinar a função, processo biológico e localização celular das DAPs;

- Validar os dados proteômicos obtidos;

- Correlacionar as DAPs identificadas com vias metabólicas (modelo biológico);

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LENTILHAS-D´ÁGUA: ASPECTOS GERAIS

As lentilhas-d´água constituem um grupo monofilético de pequenas macrófitas aquáticas flutuantes livres classificadas na família Lemnaceae, que possuem como principal característica uma estrutura vegetativa talóide, de formato lenticular, a qual não possui diferenciação entre caule e folha, denominada de fronde (LANDOLT, 1986; BOG, APPENROTH, SREE, 2019). Habitam predominantemente ecossistemas de água doces com baixo fluxo hídrico, porém são capazes de colonizar ambientes de água salobra e até mesmo águas residuais antropogênicas como efluentes domésticos, industriais, entre outros (ZHAO et al., 2012).

Atualmente foram identificadas 38 espécies de lentilhas-d´água que estão agrupadas em cinco gêneros: *Spirodella*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* e *Wolffia* (Figura 1). São consideradas as menores e estruturalmente mais simples angiospermas já descritas (TIPPERY, LES, CRAWFORD, 2015). Possuem poucas semelhanças morfológicas com as demais angiospermas e as frondes tem tamanho que variam de ~ 20 mm (*Spirodella*) a ~ 0.3 mm (*Wolffia*) (LANDOLT, 1986; LANDOLT, 1996; PEREIRA, POTT, TEMPONI, 2016).

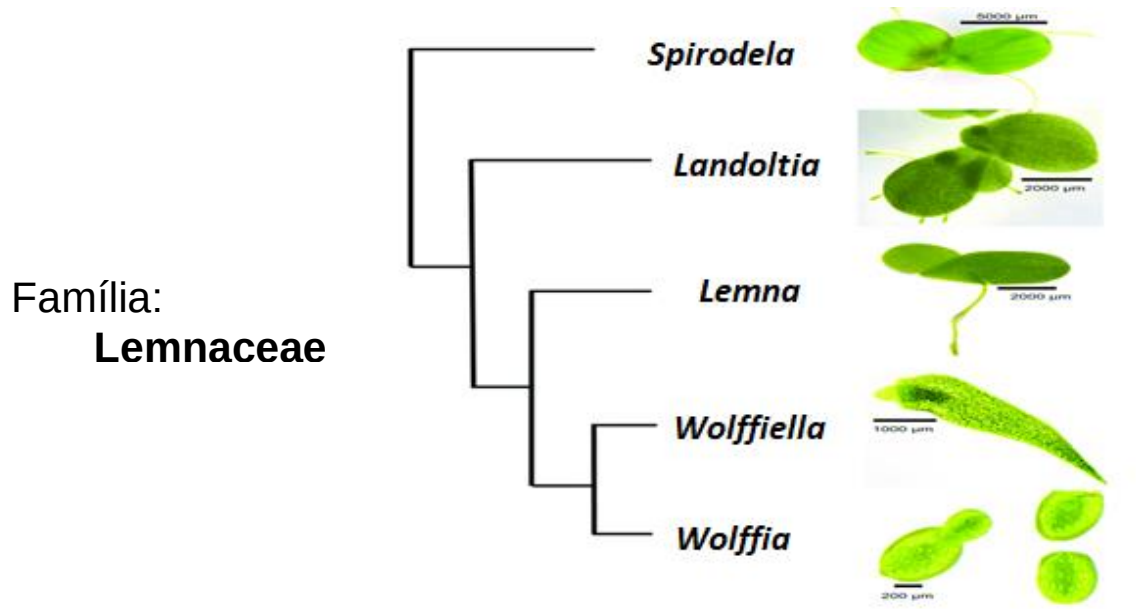

Figura 1 – Aspectos morfológicos e filogenéticos dos cincos gêneros de lentilhas-d´água. Fonte: Adaptado de Pagliuso et al., 2015.

A simplificação da estrutura vegetativa das lentilhas-d´água é decorrente da sua adaptação/especialização ao ambiente aquático e está fortemente relacionada aos aspectos evolutivos destas plantas (WANG et al., 2011). O tamanho reduzido das frondes é resultado da perda, ao longo do seu curso evolutivo, de várias estruturas anatômicas que são comuns as demais angiospermas (ALI et al., 2016). Desse modo, as análises evolutivas revelam que o gênero mais primitivo é *Spirodella* e o mais derivado é *Wolffia* (BOG et al., 2010; ALI, 2016).

As diminutas frondes compreendem estruturas foliares dotadas de tecido parenquimático composto na sua maior parte por parênquima aerífero (aerênquima) e amilífero. O tecido vascular, constituído por traqueídes, é bastante reduzido e limita-se a poucas nervuras que se extendem longitudinalmente ao eixo da fronde. O tecido de sustentação é pouco desenvolvido devido ao baixos teores de lignina presente na parede celular. As raízes são rudimentares e completamente ausentes nas lentilhas-d´água do gênero *Wolffia* (LANDOLT, 1996; ALI, 2016).

As lentilhas-d´água são plantas monóicas, protogínicas, possuindo inflorescência constituida por duas flores estaminadas e flor única pistilada. A reprodução sexuada é pouco comum e quando ocorre produz um pequeno fruto denominada de útriculo que flutua sobre a superfície d´água (ALI, 2016). Já a reprodução assexuada é mais frequente e ocorre a partir de bolsas de brotamento que se localizam na extremidade basal ou ao longo das margens laterais das “frondes-mães” (LANDOLT, 1996). Também são capazes de induzir a formação de gemas vegetativas latentes denominadas de turiões, ricas em amido, necessárias para a sua sobrevivência diante de condições ambientais desfavoráveis (OLÁH; HEPP; MÉSZÁROS, 2015).

Associada a capacidade de reprodução assexuada por brotamento, essas macrófitas aquáticas possuem rápidas taxas de crescimento e assim uma única fronde tem o potencial de colonizar rapidamente a superfície de diferentes corpos hídricos, gerando populações geneticamente semelhantes (XU et al., 2011). Devido a essas características, as lentilhas-d´água são capazes de adaptar a diferentes nichos ecológicos e por isso possuem ampla distribuição geográfica e climática, exceto em regiões desérticas e polares, com a maioria das espécies encontrada em climas moderados de zonas tropicais e subtropicais (ZIEGLER et al., 2014; PEREIRA, POTT, TEMPONI, 2016).

A ampla distribuição das lentilhas-d´água também está relacionada com a sua alta diversidade genética (XUE et al., 2012). Populações geograficamente distintas são denominadas de ecótipos e esses diferentes grupos ecológicos constituem uma fonte intraespecífica de variação genética. Consequentemente, a diversidade intraespecífica dessas plantas está relacionada a sua adaptabilidade a diferentes habitats e assim as lentilhas-d´água podem vir a exibir diferentes características em aspectos fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e genéticos (ZIEGLER et al., 2014).

O conhecimento acerca das lentilhas-d´água vem por muito tempo proporcionando grandes avanços na pesquisa básica sobre plantas, visto que essas macrófitas aquáticas são utilizadas como organismo modelo para estudos bioquímicos, fisiológicos, moleculares e evolutivos no campo da biologia vegetal. Além disso possuem enorme potencial biotecnológico, e podem ser utilizadas como uma opção sustentável para solucionar diferentes demandas ambientais e econômicas (LANDOLT, 1986; LAM et al., 2014; BARBOSA-NETO, 2017; BARBOSA-NETO et al., 2019).

2.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LENTILHAS-D´ÁGUA

As lentilhas-d´água tem despertado o interesse da comunidade científica devido a sua aplicação como ferramenta para solucionar problemas ambientais emergentes. As principais aplicações biotecnológicas das lentilhas-d´água estão associadas a capacidade fitorremediadora dessas plantas, as quais podem ser utilizadas para remover diferentes substâncias orgânicas e inorgânicas, bioacumulando assim grande percentual de substâncias presentes em águas residuais; na sua utilização como importante agente de fitoindicação da qualidade da água, que pode ser observada a partir das variações das taxas de crescimento e dependendo da sensibilidade da espécie e do ecótipo, podem apresentar tolerância ou suscetibilidade diante das alterações presentes no meio; e na utilização da sua biomassa para diversas finalidades, por exemplo, na produção de biocombustíveis (LI et al., 2011; KHELAFF; ZERDAOUI, 2012; HEGEL; MELO, 2016).

O potencial fitorremediador das lentilhas-d´água estende-se a uma ampla gama de poluentes como compostos fosfatados e nitrogenados, fármacos, toxinas, resíduos radioativos, nanomateriais, corantes, metais pesados, agroquímicos, podendo

bioacumular grande parte das substâncias presentes em efluentes domésticos, sanitários, industriais, entre outros (EKPESUSI, SIKOKI, NWACHUKWU, 2019).

As lentilhas-d´água também são ótimas indicadoras da toxicidade ambiental. Espécies como *Lemna minor* e *Spirodella pollyrhiza* são utilizadas para indicar a qualidade da água, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de conservação e restauração dos ambientes aquáticos (NIEMI et al., 2004; BRAIN; SOLOMON, 2007; SCHILLER et al., 2017).

Diante do potencial das lentilhas-d´água gerar grandes quantidades de biomassa, a qual possui alto teor de celulose, amido e proteína bruta (LANDOLT; KANDELER, 1987), diversos estudos propõem formas de aproveitamento da biomassa para diversas finalidades, como a produção de biocombustíveis (biogás, bioetanol, metanol), ração animal e fertilizantes naturais (MIRZA et al., 2014; GRAEFF et al., 2015; CALICIOGLU; BRENNAN, 2018).

Adicionalmente, as lentilhas-d´água também podem ser utilizadas como biofábricas para produção de compostos bioativos com diversas utlizações terapêuticas e/ou indústriais (GÒRNIAK et al., 2014), sendo consideradas excelentes plataformas de expressão heteróloga para produção de peptídeos vacinais e diferentes bioprodutos com atividade imunológica já foram sintetizados neste sistema vegetal (BERTRAN et al., 2015).

2.3 ESTRESSES AMBIENTAIS

Os estresses ambientais podem ser definidos como quaisquer modificações no ecossistema capazes de alterar o seu equilíbrio. São desvios significativos das condições ótimas para a vida e induzem mudanças, temporárias ou permanentes, em todos os níveis funcionais de determinado organismo (LACHER, 2000, MORAIS, 2017, GONTIJO, MONTEIRO, ROSA, 2017). Desse modo, as alterações ambientais tendem a ser desvantajosas pois afetam negativamente o metabolismo vegetal ocasionando desvio energético de funções vitais para tolerar o fator estressante (MORAIS, 2018).

Os agente estressores podem ser classificados em bióticos (bactérias, fungos, vírus, herbivoria) ou abióticos (disponibilidade hídrica, temperatura, umidade relativa, irradiação solar, substâncias tóxicas) (SOUZA; BARBOSA, 2015) (Figura 2). A natureza complexa do ambiente associadas às rápidas mudanças climáticas e os

impactos gerados pelas atividades antrópicas criam condições ambientais desfavoráveis para as planta a partir de pertubações na homeostase celular (SREENIVASULU et al., 2009). Se o fator estressante for intenso e prolongado, leva a uma carga metabólica intolerável nas células vegetais, resultando na morte da planta (HASANUZZAMAN; FUJITA, 2013).

O exarcebado crescimento urbano e industrial vem impactando o meio ambiente resultando, dentre outros problemas, em grave poluição hídrica decorrente do descarte inadequado de efluentes oriundos de atividades sanitárias, industriais, metalúrgicas, entre outros. A liberação de substâncias poluentes em corpos hídricos causam grandes prejuízos aos ecossistemas aquáticos. Nesse contexto destacam-se os metais pesados, cujo elevados níveis de toxicidade causam efeitos deletérios na biota associada a esses ambiente (EMAMVERDIAN et al., 2015).

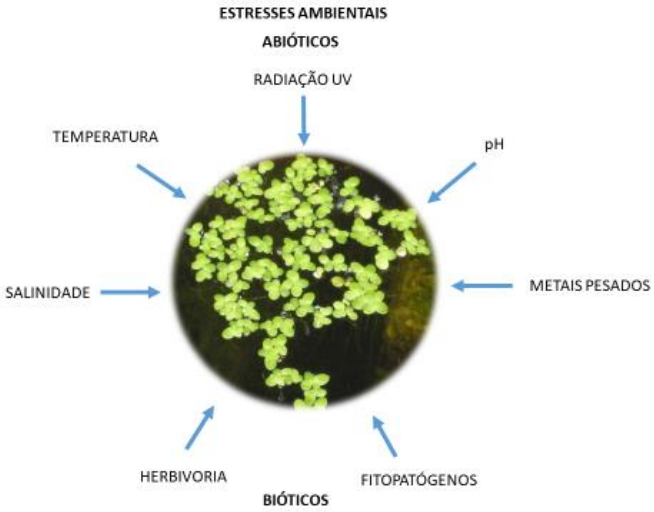

Figura 2 – Esquematização dos diferentes agentes estressores bióticos e abióticos. Fonte: Autor.

2.3.1 Metais pesados

Os metais pesados podem ser definidos como elementos metálicos que possuem as seguintes propriedades químicas: massa atômica ≥ 23 u, número atômico ≥ 20, massa específica (densidade) de 3,5 a 7,0 g/cm³ e a capacidade de formar sulfetos hidróxidos insolúveis em água. Além disso, são elementos não termodegradáveis, não biodegradáveis e tendem a ser acumulativos nos organismos (LIMA, MERÇON, 2011). Dependendo da dose e duração da exposição, quase todos os metais pesados

podem ser tóxicos para a biota, levando a efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (EMAMVERDIAN et al., 2015).

A interação dos metais pesados com os sistemas biológicos é bastante complexa pois esses elementos desempenham diferentes funções biológicas. Alguns metais pesados como o cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni) e zinco (Zn) são considerados essenciais e exercem importantes funções celulares, sendo responsáveis pela biossíntese e funcionalidade de biomoléculas como carboidratos, clorofilas, ácidos nucleicos, enzimas, hormônios de crescimento e metabólitos secundários. Outros metais, como cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As), cobalto (Co), cromo (Cr), alumínio (Al) e mercúrio (Hg) são considerados não-essenciais, pois não possuem atividade biológica conhecida, sendo potencialmente tóxicos em concentrações mínimas (TCHOUNWOU, 2012; ALI, KHAN, ILAHI, 2019).

A dispersão desses elementos no meio ambiente é decorrente de diferentes processos naturais e antropogênicos. Diversas fontes de metais pesados estão presentes na natureza e sob determinados processos, como o intemperismo de rochas ou erupções vulcânicas, estes acabam sendo liberados no ambiente. Entretanto a maior fonte de contaminação é proveniente da ação antrópica, por meio de atividades como mineração, utilização de pesticidas e herbicidas, manufatura de produtos eletrônicos, fabricação de tintas, pilhas e baterias, combustão de petróleo, entre outros (FU, WANG, 2011).

Os ecossistemas aquáticos geralmente detêm elevados índices de contaminação ambiental por metais pesados, pois estes, uma vez disponíveis no ar ou no solo, são facilmente carreados para os corpos hídricos, onde podem ficar disponíveis ou retidos nos sedimentos (MALDONADO, WENDLING, 2009). Normalmente, a concentração dos metais pesados é maior nos sedimentos do que na coluna d´água. Quando liberados nesses ambientes os metais primeiramente são adsorvidos por partículas orgânicas ou inorgânicas e são então incorporados ao sedimento pelo processo de sedimentação, resultando em níveis mais elevados de metais neste compartimento. Assim, as águas intersticiais são capazes de influenciar as concentrações de metais nas águas superficiais (BREKHOVSKIKH et al., 2002; TCHOUNWOU, 2012).

Além da análise dos metais no sedimento e na água, é importante considerar a sua bioacumulação na biota e seu potencial impacto na cadeia trófica. Nem sempre a

concentração de metais pesados encontrados nos sedimentos e coluna d´água está relacionada as concentrações desses elementos nos organismos aquáticos (MAGALHÃES et al., 2015). As macrófitas aquáticas, por exemplo, podem ter concentrações de metais pesados superiores ao meio aquático em que elas estão inseridas. Desse modo, macrófitas aquáticas contaminadas podem ser a fonte de alimento para uma variedade de herbívoros e organismos detritívoros levando à possibilidade de biomagnificação de metais nos níveis tróficos subsequentes (MISHRA et al., 2008; ALI, KHAN, ILAHI, 2019).

A biodisponibilidade de um metal pesado corresponde ao potencial que este tem para ser absorvido pelo organismo. Esse parâmetro está diretamente associado a especiação do metal pesado, ou seja, a forma química na qual esses elementos se encontra no ambiente, sendo um dos principais fatores relacionado a sua toxicidade (PAL, MAITI, 2018). Quando presentes em corpos hídricos, os metais pesados são transformados em diversas estruturas químicas, as quais podem estar na forma de íons livres hidratados, associados a ligantes orgânicos, inorgânicos (cloretos, sulfatos, fosfatos e nitratos), coloidais (substâncias húmicas, argilas, óxido de ferro) e adsorvidos em partículas em suspensão. Após a associação com ligantes orgânicos ou inorgânicos, maior parte dessas dos metais acabam tornando-se insolúveis e consequentemente indisponíveis na água (MAGALHÃES et al., 2015).

A resolução N° 430 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) é a legislação brasileira vigente que dispõe sobre os parâmetros, condições, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de águas receptores. Essa legislação não se aplica a todos os metais pesados conhecidos, apenas aqueles que são ambientalmente relevantes como o Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg e As. Por causa de seu alto grau de toxicidade e alta incidência, o Pb está entre os metais prioritários que são de grande importância para a saúde pública (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011).

2.3.1.1 Chumbo

O chumbo (do latim *plumbum*) é um metal pesado anfótero, divalente, de símbolo Pb, que possui número atômico 82, massa atômica igual a 207,2 u e massa molar de 207,19 $g.L^{-1}$. Pertence ao grupo 14 da classificação periódica dos elementos químicos.

É um metal denso, maleável e de baixa condutividade elétrica, apresentando coloração branco-azulada (ALLOWAY, 2012).

Atualmente, o Pb é classificado como o segundo contaminante ambiental mais relevante de acordo com a Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSRD, 2019). Grande parte da problemática do Pb está relacionado a sua utilização em diversas atividades humanas. Apesar da sua ocorrência natural, as fontes antropogênicas são responsáveis pelo aumento nos níveis ambientais de Pb que ocorreram nos últimos três séculos (OBIORA, CHUKWU, DAVIES, 2016). O extensivo uso do Pb em diversas atividades industriais é devido a algumas características como seu baixo ponto de fusão, alta densidade, facilidade de fundição, resistência ácida e grande estabilidade ambiental. O Pb é bastante utilizado para a produção de baterias elétricas, gasolina, tintas, corantes, munições, vidros e produtos cosméticos (WANG et al., 2013).

Similarmente aos demais metais pesados, a influência da química da água e seus compostos associados é muito importante pois não afeta somente a forma química (especiação) de Pb, mas também sua biodisponibilidade e consequentemente sua toxicidade para organismos aquáticos (CULEN JAY, MCALISTER et al., 2017). A especiação do Pb nos ambientes aquáticos é determinado por algumas características físico-químicas da água, como acidez ou alcalinidade (pH), salinidade, estado de oxidação, sedimentos em suspensão e matéria inorgânica e orgânica. O pH da água é de grande importância na determinação do provável destino químico do Pb em termos de solubilidade, precipitação ou complexação orgânica (CHURCH et al., 2017).

A biodisponibilidade do Pb está associada a sua mobilidade no ambiente. Geralmente a espécie mais tóxica ou biodisponível de chumbo é considerada como sendo sua forma catiônica livre (Pb^{2+}), enquanto as outras espécies, como carbonatos, cloretos, sulfatos, fosfatos, complexos formados com partículas ou matérias orgânicas (húmus, partículas coloidais, sedimento, restos mortais de organismos) em ambientes de água doce ou salgada, não são considerados biodisponíveis (ILA, 2018).

A especiação e biodisponibilidade do chumbo também difere em água doce e salina. Em corpos hídricos de água doce, o chumbo está em maior concentração na sua forma de cátion divalente (Pb^{2+}) sob condições ácidas, e forma carbonato de chumbo ($PbCO_3$) e hidróxido de chumbo ($Pb(OH)_2$) em condições alcalinas. Já em águas salinizadas, devido a maior concentração do cloreto presente no meio, o Pb

tende a formar diferentes espécies de cloretos de chumbo ($PbCl_3$ > $PbCl_2$ > $PbCl^+$) (CHURCH et al., 2017; ILA, 2018).

De acordo com os padrões de lançamento de efluentes do CONAMA, os efluentes descartados devem conter até no máximo 0,5 $mg.L^{-1}$ de Pb (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011).

2.4 TOXICIDADE INDUZIDA POR CHUMBO

Mesmo em concentrações mínimas, o Pb biodisponível nos corpos hídricos é altamente tóxico para a biota aquática e saúde humana. O Pb, como os outros metais pesados não essenciais, exerce toxicidade nas plantas através de quatro mecanismo principais. Estes incluem: (1) semelhanças iônicas com outros elementos essenciais, que resultam na competitividade desses pelos sítios de interação de canais transmembrana; (2) interação direta de metais pesados com o grupo sulfidrila (-SH) de proteínas, ocasionando sua desnaturação e perda de sua funcionalidade; (3) deslocamento de íons essenciais dos seus locais de interação específicos, prejudicando determinadas funções celulares; e (4) a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam estresse oxidativo na célula vegetal a partir da oxidação de macromoléculas dos constituintes celulares (SINGH et al., 2016).

Dessa maneira, a toxicidade do Pb afeta as plantas alterando diversos processos fisiológicos e bioquímicos, como germinação de sementes, crescimento, balanço hídrico, assimilação de nutrientes, fotossíntese, trocas gasosas, equilíbrio hormonal, síntese de biomoléculas, síntese de proteínas e replicação de DNA (SINGH et al., 2013, SINGH et al., 2016) (Figura 3).

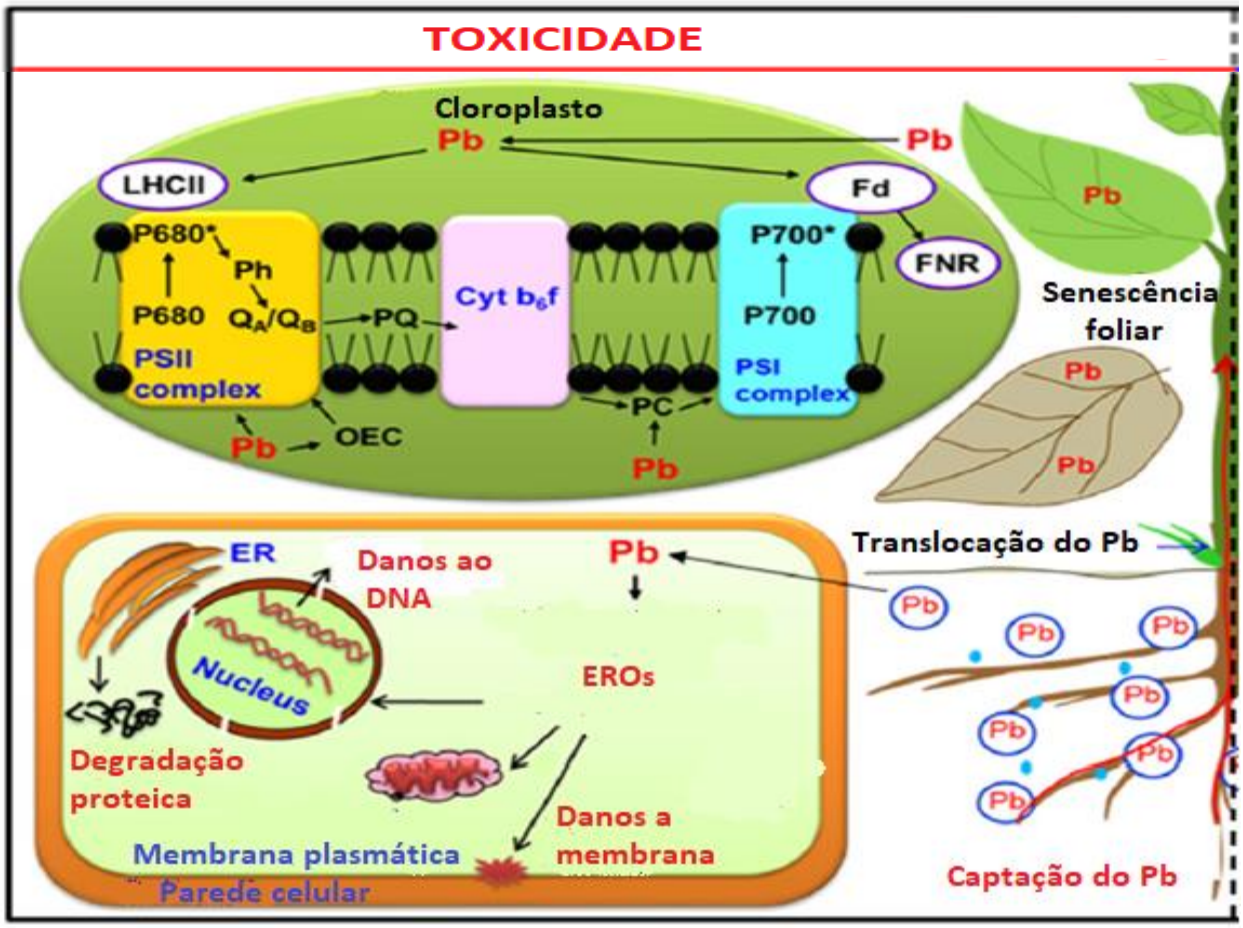

Figura 3 – Visão generalizada da toxicidade intracelular causados pelo Pb. O Pb pode se complexar com os componentes dos fotossistemas causando alterações na fotossíntese, bem como induzir a formação de EROs que gera danos às membranas celulares e material genético, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica. Fonte: Adaptado de KUMAR, PRASAD (2018).

2.4.1 Alterações no crescimento e desenvolvimento vegetal

Elevadas concentrações de Pb são prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Parâmetros de crescimento como tamanho da raiz, peso fresco e seco de partes aéreas e submersas das plantas geralmente diminuem devido ao estresse induzido pelo Pb (CHEN et al., 2016). As raízes geralmente são as primeiras estruturas a serem afetadas. O Pb acumulado resulta no aumento do meristema apical levando ao espessamento da parede celular, dificultando a absorção de nutrientes e consequentemente afetando o seu transporte para as partes aéreas da planta (ZHOU et al., 2016).

Alguns transportadores de membrana das células rizodérmicas possibilitam a captação do Pb, translocando esse metal via xilema para as partes aéreas ou submersas. A toxicidade do Pb resulta na diminuição do caule, alterações no

desenvolvimento e estrutura das folhas, clorose e excisão das folhas mais jovens após exposição prolongada, inibição do desenvolvimento de flores, reduções no diâmetro dos vasos do xilema e floema, retardo no crescimento de plântulas e diminuição do índice de germinação das sementes (KUMAR et al., 2013).

2.4.2 Desequilíbrio do metabolismo oxidativo

A fitotoxicidade do Pb é causada pela ocorrência de estresse oxidativo oriundo do aumento produção de EROs, como o radical hidroxila (·OH-), ânion superóxido (O_2.-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (·O_2), resultando em desequilíbrio na homeostase redox celular (GUPTA et al., 2016). As EROs desempenham importantes papéis como segundos mensageiros durante a sinalização celular, regulando uma série de processos fisiológicos (SYTAR et al., 2013). Porém, perturbações da homeostase redox é capaz de levar a condição de estresse oxidativo na célula vegetal e a persistência dessa situação pode resultar em morte celular programada (PCD) (KAUR et al., 2013).

Nas células vegetais, os cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas constituem as fontes predominantes da produção de EROs. Os cloroplasto e mitocôndrias são os locais preferenciais para a geração de EROs devido à presença de sistemas de transporte de elétrons dentro dessas organelas (KUMAR, PRASAD, 2018). Por serem composto que reagem facilmente com outras moléculas, as EROs podem levar a oxidação e degradação de componentes celulares importantes como membranas celulares, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Essa oxidação leva a desestabilidade das membranas celulares, inibição da atividade enzimática e efeitos genotóxicos, causando a paralisação de processos metabólicos essenciais à sobrevivência da célula (SHARMA, DUBEY, 2011).

2.4.3 Deficiência fotossintética

A fotossíntese é bastante afetada, direta ou indiretamente, pela toxicidade do Pb. Os íons de Pb geralmente diminuem os níveis fotossíntese, e assim, a planta apresenta sintomas como clorose e redução dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas “a” e “b”) (CHEN et al., 2016). A diminuição da eficiência fotossintética está diretamente relacionada à inibição de enzimas que atuam na síntese desses

pigmentos, como a ácido δ-aminolevulínico desidratase (ALAD), bem como produzindo moléculas de clorofilas não funcionais devido a competitividade que Pb^{2+} possui com metais essenciais, como o Mg^{2+}, que se ligam no anel porfirínico impedindo que essa molécula consiga captar energia luminosa de maneira eficiente (CENKCI et al., 2010). Além disso, pigmentos como carotenoides, que fornecem coloração para a planta e desempenham um papel vital na proteção de moléculas clorofila também são afetados. Os carotenoides são bem conhecidos por sua atividade antioxidante e, portanto, têm o potencial de proteger plantas contra condições de estresse oxidativo (KUMAR et al., 2017).

Além do conteúdo dos pigmentos, a deformação da ultraestrutura do cloroplasto, desequilíbrio na plastoquinona e transporte de elétrons são outras importantes sintomas de toxicidade do estresse causado pelo Pb. A deformação da ultraestrutura dos cloroplastos também ocorre devido a alterações na composição das membranas dos tilacóides, levando a inativação funcional dos mesmos devido a problemas no transporte de elétrons. Por fim, o Pb também causa, indiretamente, a redução da fotossíntese a partir da indução do fechamento das estruturas estomáticas, impedindo a captação de CO_2 e transpiração foliar (SHARMA, DUBEY, 2011; KUMAR, PRASAD, 2018)

2.4.4 Genotoxicidade

Elementos que causam danos ao material genético de células são considerados agentes genotóxicos ou mutagênicos. O potencial genotóxico de qualquer metal depende da sua concentração, tempo de exposição, bem como o estado de oxidação do metal. O Pb é um potencial agente genótoxico, induzindo vários tipos de perturbações ao fuso mitótico. O Pb induz danos aos centrossomos, que não conseguem polimerizar e despolimerizar o fuso mitótico adequadamente, ocasionando a formação de micronúcleos a partir de quebras e erros na separação do cromossomos (MALEA et al., 2014; KUMAR et al., 2017).

O Pb diretamente, ou indiretamente através da produção de EROs, induz danos as cadeia polinucleotídicas das moléculas de DNA e RNA. A interação das EROs pode alterar estrutura química da desoxirribose ou bases nitrogenadas, levando à quebra e fragmentação do DNA. Esse processo envolve a adição do radical • OH as bases nitrogenadas, quebrando a interação entre as pontes de hidrogênio ou a pela deleção

do C4´ da pentose. Os danos nos nucleotídeos da molécula de DNA causam sérias consequências para o metabolismo celular, como a inibição da replicação e acúmulo de mutações, nesse caso, devido a impossibilidade de reparo do DNA (KUMAR, MAJETI, 2014). Além disso, o Pb também possui efeito inibitório sobre o proteínas envolvidas no reparo do DNA, topoisomerase e nas proteínas envolvidas em processos transcricionais e traducionais (SIDDIQUI, 2012).

2.4.5 Degradação proteica e inibição da atividade enzimática

Os EROs produzidos durante o estresse do Pb possuem alta afinidade pelo grupo carbonila dos polipeptídeos. Assim, a interação desses radicais livres com as proteínas resultam em modificações das características químicas dos aminoácidos, maior vulnerabilidade à proteólise e fragmentações das cadeias polipeptídicas, levando à desnaturação e perda da sua função (SRIVASTAVA et al., 2014).

O Pb influência no comportamentos da atividade de uma ampla gama de enzimas de diferentes vias metabólicas. O mecanismo de inibição exercida pelo Pb na atividade enzimática resulta da interação do Pb com os grupos enzima -SH. O Pb interage com grupos livres de SH que estão presentes no sítio ativo da enzima e são essenciais para a atividade enzimática, bem como com os grupos –SH que são necessários para a estabilização da estrutura terciária da enzima. Além da reação com os grupos –SH, o bloqueio dos grupos –COOH com íons Pb também parece desempenhar um papel importante na inibição da atividade enzimática sob tratamento com Pb (SHARMA, DUBEY, 2011). A inibição da atividade enzimática devida a Pb não é específica, uma vez que tais inibições são também evidentes com outros metais pesados com afinidades comparáveis para grupos funcionais proteicos (VERMA, DUBEY, 2003; SHARMA, DUBEY, 2011).

2.5 MECANISMOS DE RESPOSTA FRENTE AO ESTRESSE POR CHUMBO

O potencial de fitorremediação das lentilhas-d´água está baseado na sua capacidade de bioacumular elevadas concentrações do Pb biodisponível nos corpos hídricos e tolerar a toxicidade associada ao acúmulo desse metal (HESAMI et al., 2018). Assim, os ecótipos de lentihas-d´água que possuem tais características são classificados como acumuladores/tolerantes ao Pb, enquanto aqueles que não

dispõem desses atributos podem ser classificados como sensíveis ao Pb (RODRIGUES et al., 2016)

As lentilhas-d´água (e plantas no geral) acumuladores/tolerantes são capazes de mitigar os efeitos tóxicos do Pb a partir de elaborados mecanismos responsivos ao estresse causado por esse metal (KIRAN, PRASAD, 2017). Esses mecanismos envolvem principalmente sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que auxiliam essas plantas a tolerar o estresse oxidativo induzido por Pb, além da síntese de proteínas quelantes, como as metalotioneínas e fitoquelatinas, capazes de se associarem ao Pb citoplasmático livre e formar complexos, neutralizando a capacidade do Pb^{2+} em interagir com outras moléculas (KUMAR, PRASAD, 2018).

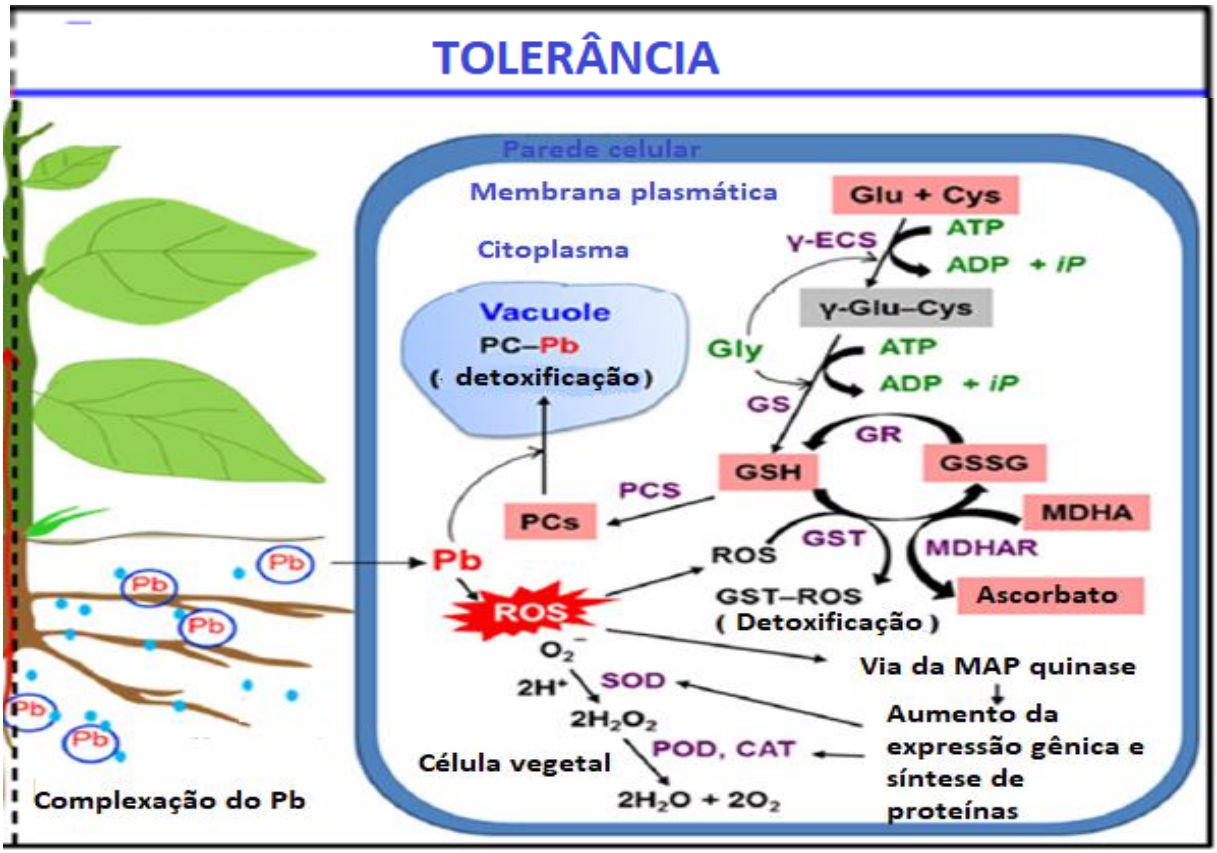

Figura 4 – Visão geral dos mecanismos de resposta (tolerância) frente ao estresse pelo Pb. A detoxificação celular ocorre pela produção de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos e pela síntese de fitoquelatinas e metalotioteínas e posterior compartimentalização em vacúolos. Fonte: Adaptado de KUMAR, PRASAD (2018).

2.5.1 Antioxidantes enzimáticos

Algumas enzimas estão diretamente envolvidas na redução das concentrações EROs a partir de um elaborado sistema enzimático antioxidante. As enzimas que compõe esse sistema são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascobarto peroxidase (APX), glutationa redutase (GR), glutationa peroxidase (GPX), monodesidroascorbato redutase (MDHAR), desidroascorbato redutase (DHAR) e glutationa S-transferase (HATTAB et al., 2016; KHAN et al., 2018).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os radicais livres, desempenhando ação catalítica envolvida na dismutação de radicais superóxidos (O_2•-), formando nesse processo H_2O_2 e O_2. Três tipos SOD já foram descritas em plantas, em diferentes localizações subcelulares: 1) Cu-Zn SOD I (citosol) e Cu-Zn SOD II (cloroplasto); 2) Mn SOD III (mitocôndria); e 3) Fe SOD (cloroplasto) (SINGH et al., 2016, KUMAR, PRASAD, 2018).

A produção de H_2O_2 pela ação da SOD é danosa pois pode se difundir facilmente através da membrana e danificar outros compartimentos celulares. Assim, as peroxidases como APX e GPX, presentes em quases todos os compartimentos celulares, são responsáveis pela detoxificação do H_2O_2 , catalisando a redução de H_2O_2 em H_2O e O_2. As APX também são importantes sinalizadores celulares, indicando a presença do radical H_2O_2 na célula (SINGH et al., 2010). Outras enzimas como MDHAR, DHAR e o GR estão implicadas na detoxificação do H_2O_2. A CAT também é outra importante enzima oxiredutase, localizada nos peroxissomos, que atua catalisando o H_2O_2 em H_2O e O_2 (POTTERS, HOREMANS, JANSEN, 2010).

As enzimas APX e CAT, são responsáveis pela eliminação da maior parte de H_2O_2 intracelular, possuem diferentes afinidades por esse radical livre. A APX tem alta afinidade e está presente em praticamente todos os compartimentos subcelulares, enquanto a CAT, que está localizada nos peroxissomos/glioxissomos, possui baixa afinidade (MITTLER, 2002). Além disso, as APX podem eliminar H_2O_2 que estão inacessíveis à CAT, como no caso dos cloroplastos (FOYER; NOCTOR, 2011).

Nas lentilhas-d´água, o sistema antioxidante enzimático é bastante eficiente e diferentes estudos demonstram aumento significativo na atividade de enzimas como APX, CAT, SOD, GPX quando as plantas são expostas a rescentes concentrações de metais pesados como Zn, Cd, Cu, Pb (DONGANLAR, 2013; JAYASRI, SUTHINDHIRAN, 2017; PARLAK, YILMAZ, 2012).

2.5.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Juntamente com antioxidantes enzimáticos, a célula vegetal também possui mecanismo antioxidante não enzimáticos para combater lesões mediadas por EROs. Esses mecanismos envolvem a síntese de compostos fenólicos, ácidos orgânicos, aminoácidos, carotenoides, vitaminas, entre outros (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Compostos fenólicos, como os precursores de lignina e flavonóides, são eficientes moléculas antioxidantes. A maior produção de compostos fenólicos sob estresse por metais pesados deve-se a sua alta tendência a quelar metais, devido presença de grupos hidroxila e carboxila nessas moléculas (PAWLAK-SPRADA et al., 2011).

O α-Tocoferol (vitamina E) é o mais abundante antioxidante lipossolúvel presente nas membranas celulares atuando portanto na proteção contra a lipoperoxidação (MUNNE-BOSCH, 2005). Podem reagir diretamente com uma variedade de EROs, como o superóxido, a hidroxila e o oxigênio singlet e/ou destruir a cadeia de lipoperoxidação nas membranas (KUMAR et al., 2012).

Ácidos orgânicos como o malato, citrato e oxalato são descritos como moléculas quelantes que tem a capacidade de sequestrar íons metálicos intracelulares e transportá-los até vacúolos (RAUSER, 1999).

A prolina é um osmólito orgânico conhecido e seu acúmulo nas plantas frequentemente mostra uma correlação positiva com as intensidades de estresse. Entre todos os aminoácidos, o acúmulo de prolina solúvel, sob vários estresses ambientais, incluindo metais pesados, é um dos mais estudados na perspectiva das respostas de defesa das plantas. Também reflete seu papel potencial em sistemas de defesa inespecíficos contra a fitotoxicidade induzida pelo Pb (KUMAR, PRASAD, 2018).

O ácido ascórbico (AsA) é um dos mais importantes metabólitos do ciclo ascorbato-glutationa e um antioxidante onipresente em todos os componentes celulares. Desse modo, o AsA é considerado um potencial eliminador de EROs, desempenhando papel importante nas vias de eliminação de H_2O_2 , atuando tanto nos cloroplastos como no citosol (HASANUZZAMAN et al., 2017).

Alguns desses mecanismos antioxidantes não-enzimáticos são melhores descritos descritos em lentilhas-d´água, como a prolina e o ácido ascórbico. Bassi et al., (1993) e Jonh et al., (2008) identificaram aumentos significativos nos teores de

prolina de clones de *L. minor* cultivadas sob a presença de Cd, Pb, Zn e Cu. De maneira similiar, Torok et al., (2015) identificaram elevadas concentrações de ácido ascórbico e dihidorascorbato em clones de *L. minor* submetidos ao cultivo com soluções de metais (Cd + Zn + Cu). Já Salah-ud-Din et al., (2017) constataram que clones de *L. minor* possuiam maiores taxas de absorção tolerância ao Cr quando tratados previamente com ácido ascórbico.

2.5.3 Glutationa, fitoquelatinas e metalotioneínas

As glutationas, fitoquelatinas e metalotioneínas são proteínas que exercem grande importância na tolerância das lentilhas-d´água aos metais pesados devido a alta afinidade dessas proteínas a íons metálicos, principalmente ao Pb^{2+}, formando complexos que neutralizam a toxicidade associada ao metais (FAN et al., 2016; HESAMI et al., 2018)

A glutationa é um tiól não proteico intracelular que ajuda a manter a homeostase do status redox, além de atuar como sequestrador de EROs. Nas células vegetais atua, além de antioxidante, como elemento quelante responsável pela detoxificação de metais pesados. A glutationa existe em duas formas, isto é, sua forma reduzida (GSH) - quelante, e a sua forma oxidada (GSSG) – não quelante. Essas duas formas de glutationa são mantidas através da enzima glutationa redutase (GR) que converte a forma oxidada da glutationa para forma reduzida. A manutenção da relação GHS/GSSH é de extrema importância, pois em condições celulares normais, a GHS pode quelar e inativar metais essenciais (HESAMI et al., 2018, KUMAR, PRASAD, 2018).

As fitoquelatinas pertencem a grupo de proteínas de ligação a metais com estrutura geral (c-Glu-Cys) e bem caracterizados em plantas. As fitoquelatinas são sintetizadas pela enzima fitoquelatina sintase a partir da transpeptidação da porção γ-Glu-Cys da glutationa (GSH) (FAN et al., 2016). O aumento da síntese de fitoquelatinas reduz rapidamente o Pb livre no citoplasma. Devido à presença de um grupo tiol, as fitoquelatinas tem a capacidade de quelar metais e formar complexos que são então sequestrados nos vacúolos, compartimento subcelular onde ocorre a detoxificação ativa do Pb (HATTAB et al., 2016). Essas proteínas também desempenham papel importante na homeostase dos outros metais metálicos e,

portanto, regulam a disponibilidade de íons metálicos nas células vegetais (JIANG et al., 2017).

As metalotioneínas também são proteínas quelantes de metais pesados pertencentes a uma família de proteínas de baixo peso molecular com peptídeo de ligação a metal rico em cisteína. As metalotioneínas são codificadas por genes e não são sintetizadas a partir da glutationa como as fitoquelatinas. Além de quelar eficientemente íons metálicos, também atuam como mecanismo de proteção antioxidante e no reparo de membranas (SINGH et al., 2016).

2.6 ANÁLISE PROTEÔMICA

As respostas das plantas aos estresses ambientais envolvem a ativação de mecanismos de expressão gênica diferencial, resultando em mudanças a níveis transcricionais, traducionais e consequentemente alterando o metabolismo vegetal (SINGH et al., 2016). Diferentes mecanismos regulatórios podem modificar um transcrito até que esse se traduza em uma proteína. Desse modo, análises transcriptômicas, apesar de gerarem valiosas informações sobre a expressão gênica, não conseguem afirmar se os níveis de expressão do transcrito será o mesmo do produto proteico a ser sintetizado e nem se esse peptídeo será de fato funcional. Assim, para melhor entendimento e compreensão das respostas relacionadas aos estresses ambientais, é necessário uma analíse que se aproxime mais do fenótipo (PAPPIREDI, MARTIN, WUHR, 2019).

Nesse sentido, a análise proteômica surge como uma ferramenta de análise molecular que tem como intuito caracterizar qualitativa e quantitativamente o proteoma (conjunto de proteínas expressas por um genoma) de um organismos numa determinada condição, o que permite compreender as respostas geradas por diversos estímulos ambientais (SALVATO; CARVALHO, 2010).

O proteoma de um organismo é dinâmico, e diferente do genoma, e se modifica constantemente (KOSOVÁ et al., 2011). Os avanços tecnológicos permitiram o aumento da cobertura do proteoma e a inferência de aspectos quantitativos de expressão de proteínas, dando suporte a proteômica quantitativa, a qual vem se destacando nas pesquisas com plantas de interesse biotecnológico e comercial (DALCORSO et al., 2013). A análises proteômica oferece uma nova plataforma para identificar proteínas essenciais na detoxificação de metais pesados, e no estudo de

processos biológicos e redes de interações entre as possíveis proteínas e suas vias metabólicas envolvidas na respostas diante estresse por metais pesados (KOSOVÁ et al., 2011).

O progresso da proteômica tem sido impulsionado pelo desenvolvimento de novas tecnologias para separação de peptídeos / proteínas, análise de espectrometria de massa, marcação de isótopos para quantificação e análise de dados a partir da bioinformática. A espectrometria de massa emergiu como uma ferramenta central para a análise de proteínas em larga escala (BARBOSA et al., 2012). Na década passada, houve um rápido avanço na resolução, precisão de massa, sensibilidade e taxa de varredura de espectrômetros de massa usados para analisar proteínas. Além disso, os analisadores de massa híbrida (LC-MS/MS) foram introduzidos recentemente e tem um significante avanço na análise proteômica (DALCORSO et al., 2013).

As abordagens metodológicas utilizadas para as análises do perfil proteico podem ser classificadas no tipo *botton-up* ou *top-down*. A proteômica *botton-up* também conhecido como shotgun, inclui separação por cromatografia dos peptídeos obtidos pela digestão tríptica da amostra (DALCORSO et al., 2013). Porém essa abordagem apresenta algumas limitações, como a cobertura incompleta dessas proteínas e o não reconhecimento das modificações pós-traducionais. Já na proteômica *top-down*, a análise se dá através a partir das proteínas intactas, ou seja, as proteínas não são previamente tripsinizadas antes de serem fragmentadas e analisadas por espectrometria de massas (BARBOSA et al., 2012).

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) é um método eficiente para a separação de misturas complexas de proteínas para análise proteômica. Esse método é baseado na separação das proteínas a partir do seu ponto isoelétrico (pI) e da massa molecular e é capaz de separar várias proteínas intactas em um único gel. Após a separação em 2D-PAGE, as proteínas podem ser identificadas como proteínas ou peptídeos a partir de espectrometria de massas utilizando espectrometros como MALDI-MS ou com LC-MS/MS após uma digestão em gel (BANKS et al., 2000; ZHANG et al., 2013).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica utilizada para identificar moléculas de interesse por meio da medição da sua massa e da caracterização de sua estrutura química. O princípio físico básico de um espectrômetro de massas consiste em criar íons de compostos orgânicos por um método adequado, separá-los de acordo com a sua taxa de massa/carga (m/z) e, por conseguinte, detectá-los

qualitativa e quantitativamente por sua respectiva taxa m/z e abundância (ZHANG et al., 2013). Com o avanço dessa técnica, vários instrumentos híbridos foram desenvolvidos com diferentes analisadores de massa e fontes de fragmentação. Essas combinações melhoraram a fragmentação dos peptídeos, tornando-os mais informativos (GROSSMANN et al., 2007).

A informação da sequência de aminoácidos dos peptídeos fragmentados (MS/MS), bem como os dados da massa molecular dos peptídeos originados da digestão enzimática (Peptide Mass Fingerprint - PMF), são analisados por meio de programas da bioinformática, como o MASCOT, que comparam essas informações confrontando-as em bancos de dados que contém sequências de proteínas ou genoma de organismos correlatos ao organismo de estudo do pesquisador (ZHANG et al., 2013).

As resposta das plantas pelo estresse por metais pesados possuem alguns mecanismos moleculares bem descritos. Estes inicialmente ocorrem pela presença de proteínas-quinases que atuam, dentre outras funções, como sinalizadores intracelulares do estresse, estímulando a modificação da expressão gênica e síntese proteica para ativação de mecanismos em resposta ao estresse oxidativo (MEITEI et al., 2014). A maioria dos genes que apresentam aumento nos níveis de expressão , e consequentemente acúmulo de proteínas, diante o estresse por Pb estão relacionados com as enzimas antioxidantes, transportadores de metal, compostos quelantes e as proteínas de choque térmico (HSP) (WANG et al., 2015). O Pb também induz o acúmulo diferencial de proteínas envolvidas no ciclo de Krebs, ciclo de Calvin, fotossíntese, biossíntese de proteínas, via das pentose fosfato, síntese de ATP e metabolismo da glutationa (LI et al., 2017).

A literatura referente a análise proteômica de lentilhas-d´água ainda é escassa e os trabalhos publicados possuem como enfoque a proteômica relacionada a processos de produção de biomassa e bioenergia. Desse modo, faz-se necessário o estudos proteômicos voltados aos processos de fitorremediação para identificação de mecanismos moleculares associados (HUANG et al., 2014; HUANG et al., 2015; TAO et al., 2017; HARKESS et al., 2020).

O laboratório de genômica e proteômica de plantas (LGPP), vinculado ao departamento de Genética (Centro de Biociências, UFPE) tem realizado um trabalho pioneiro com isolados de lentilhas-d´água do estado de Pernambuco com o objetivo de identificar peptídeos e genes codificantes relacionados a mecanismos fisiológicos,

bioquímicos e moleculares que estejam associados a processos biotecnológicos, principalmente a fitorremediação e produção de biomassa. Previamente realizou-se a coleta de isolados de lentilhas-d´água de diferentes locais da região metropolitana do Recife, os quais foram identificados como sendo da espécie *Lemna aequinoctialis*. Dentre estes, o isolado M1 (coletado na ETE Mangueira - S 8º4’37”, O 34º55’30”) demonstrou grande capacidade de crescimento em meios de cultura contendo efluentes sanitário e salino associado ao acúmulo diferencial de proteínas sob essas condições de cultivo (BARBOSA-NETO et al., 2017; BARBOSA-NETO et al., 2019; MORAIS et al., 2017; MORAIS et al., 2019).

O entendimento da modulação de respostas das lentilhas-d´água a processos de fitorremediação, mais especificamente o Pb^{2+}, permite identificação de biomarcadores funcionais que podem ser utilizados na seleção de clones que sejam potenciais fitorremediadores desse metal. Diante do exposto, o presente projeto visa identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) do proteoma de lentilhas-d´água, presumivelmente em resposta ao chumbo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO*

O material vegetal utilizado foi o *Lemna aequinoctialis* clone M1 (RDSC5570), pertecente a coleção de lentilhas-d´água do Laboratório de Genômica e Proteômica Plantas da Universidade Federal de Pernambuco (LGPP/UFPE), cultivado sob condições axênicas em meio de cultura SH 0,5X (Schenk and Hildebrandt Basal Salt Mixture, SIGMA) suplementado com sacarose (10 $g.L^{-1}$), inositol (0,1 $g.L^{-1}$) e solução de vitaminas - tiamina e peridoxina (1 $mL.L^{-1}$) em pH 5,8. As populações clonais do isolado foram mantidas em 20 mL de meio de cultura autoclavado dentro de recipientes esterilizados de policarbonato com capacidade volumétrica de 250 mL e área circular de 28,26 cm^2, incubados em sala de crescimento com controle da intensidade luminosa (57,2 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$), fotoperíodo (16h/8h – luz/escuro) e temperatura (23°C).

3.2 CULTIVO SOB ESTRESSE POR CHUMBO (Pb^{2+})

O cultivo do clone M1 de *L. aequinoctialis* sob estresse por Pb^{2+} foi realizado mediante a adição do nitrato de chumbo II - $Pb(NO_3)_2$ (SIGMA) em meio SH 0,5x suplementado com sacarose (10 $g.L^{-1}$), inositol (0,1 $g.L^{-1}$) e solução de vitaminas - tiamina e peridoxina (1 $mL.L^{-1}$) em pH 5,8, utilizando os mesmos parâmetros de cultivo *in vitro* para manutenção das populações clonais. Aproximadamente 15 frondes (0,040 g) de populações clonais previamente cultivadas foram escolhidas aleatoriamente e propagadas em diferentes concentrações de $Pb(NO_3)_2$ (**0 $mg.L^{-1}$ – 0 mM**, **50 $mg.L^{-1}$ – 150 mM**, **100 $mg.L^{-1}$ – 301 mM**, **150 $mg.L^{-1}$ – 452 mM**, **200 $mg.L^{-1}$ – 603 mM**), em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x7 (5 tratamentos e 7 tempos), durante 12 dias. No decorrer do período experimental, triplicatas biológicas de cada tratamentos foram coletadas a cada 2 dias para a mensuração dos pesos frescos e secos das frondes afim de determinar suas respectivas taxas de crescimentos. Ao final da período experimental, o material foi coletado, congelado em N_2 líquido e armazenado em – 80 ºC.

3.3 TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO, RENDIMENTO DE BIOMASSA, TAXA DE INIBIÇÃO E TEMPO DE DUPLICAÇÃO

As análises referentes as taxas de crescimento foram realizadas a partir da mensuração dos pesos frescos e secos do material vegetal coletado ao longo do período experimental, utilizando os valores obtidos nas equações descritas por Ziegler et al. (2014). A taxa de crescimento relativo (TCR), foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{Taxa de crescimento relativo} = (\ln PS_{t2} - \ln PS_{t1}) / (T2 - T1)$$

onde ln = logaritmo neperiano, PS_{t1} e PS_{t2} representam o peso seco em T1 e T2, respectivamente com um ponto inicial (0 dias) e final (12 dias). O rendimento de biomassa (RB) foi avaliado a partir da equação (2):

$$\text{Rendimento de biomassa} = (PS2 - PS1) / S / (T2 - T1)$$

onde PS1 e PS2 representa o peso seco no tempo inicial T1 (0 dias) e tempo final T2 (12 dias) e "S" representa a área (0,002826 m^2) superficial de crescimento dos clones no recipiente contendo meio de cultura. A taxa de inibição (TI) foi mensurada pela equação (3):

$$\text{Taxa de inibição} = (1 - PS_{tratamento} / PS_{controle})$$

onde $PS_{tratamento}$ é o peso seco do condição tratada e $PS_{controle}$ é o peso seco da condição controle. O tempo de duplicação (TD) foi calculado a partir da equação (4):

$$\text{Tempo de duplicação} = \ln(2) / TCR$$

onde a ln(2) = logaritimo neperiano multiplicado por 2 é dividido pelo valor da TCR.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES

O teor de clorofila “a”, “b” e total (a+b) e de carotenoides foi determinado a partir do método de extração em acetona 80% (LICHTENTHALER, 1987). Todo procedimento foi realizado em ambiente fechado, na presença de luz verde, evitando assim a degradação da clorofila. Nessa metodologia, 200 mg do tecido vegetal foram macerados em N_2 líquido e depois solubilizados em 10 mL de acetona 80%. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo e as seguintes absorbâncias (ABS) foram mensuradas: 470, 646.8, 663.2 e 710 nm. Esses valores foram utilizados nas equações abaixo para calcular a concentração dos pigmentos fotossintetizantes:

$$\text{Clorofila “a”} \ (C_a) = 12{,}25.\ ABS_{663.2} - 2{,}79.\ ABS_{646.8}$$

$$\text{Clorofila “b”} \ (C_b) = 21{,}50.\ ABS_{646.8} - 5{,}10.\ ABS_{663.2}$$

$$\text{Clorofilas totais } C_{(a+b)} = 7{,}15.\ ABS_{663.2} + 18{,}71.\ ABS_{646.8}$$

$$\text{Carotenoides}_{\text{(xantofilas + caroteno)}} = (1000.\ ABS_{470} - 1{,}82.\ Ca - 85{,}02.\ Cb) / 198$$

3.5 QUANTIFICAÇÃO DO BIOACÚMULO DE Pb^{2+} E DETERMINAÇÃO DO FATOR DE BIOCONCENTRAÇÃO

A quantificação dos teores de Pb^{2+} presente na biomassa das populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1 foram realizadas em espectrometria de absorção atômica em chamas. Cerca de 0,1 g de massa seca das amostras foram digeridas em ácido nítrico dentro de forno digestor. Posteriormente, as amostras tiveram seus teores de chumbo quantificados no espectrômetro de absorção atômica em chamas modelo aparelho VARIAN 220 com limite de detecção para Pb^{2+} de 3 $mg.kg^{-1}$. Os valores obtidos foram utilizados para cálculo do fator de bioconcentração (BFC) utilizando a equação descrita por Zayed et al. (1998):

$$\text{Fator de bioconcentração} = Pb^{2+}_{\text{planta}} \ (mg.kg^{-1}) \ / \ Pb^{2+}_{\text{meio de cultura}} \ (mg.\ L^{-1})$$

onde Pb^{2+}_{planta} é a quantidade de metal presente na biomassa da planta e $Pb^{2+}_{\text{meio de cultura}}$ é a quantidade de metal adicionado ao meio de cultura.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSICAS

Os dados referentes as taxas de crescimento e quantificação dos pigmentos fotossínteticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey e teste t-student a 5% de significância, utilizando o software GraphPad Prisma 9.

3.7 EXTRAÇÃO PROTEICA

A extração das proteínas solúveis totais do material vegetal foi realizada a partir do método SDS/Denso (PIROVANI et al., 2008). Utilizou-se 0,5 g do tecido vegetal macerado em N_2 líquido juntamente com 20% de PVPP, o qual foi acondicionado em tubo *falcon* de 15 mL e adicionado 10 mL de tampão de extração SDS/Denso (Sacarose 30 %, SDS 2 %, Tris-HCl pH: 0,1 M, β-mercaptoetanol 5 %). As amostras foram mantidas sob agitação constante (70 rpm) a 4ºC por 30 minutos em banho de gelo. Após incubação, foram adicionados 10 mL de fenol saturado em Tris-HCL (pH 8,5) e, posteriormente, os tubos foram novamente. O homogeneizado foi centrifugado em 7.850 rpm, a 4 ºC por 30 minutos e após esse processo, o sobrenadante fenólico foi cuidadosamente removido e colocado em novo tubo *falcon* de 50 mL, no qual adicionou-se 25 mL de acetato de amônio em metanol gelado e em seguida foi deixado *overnight* em freezer a - 20 ºC. Posteriormente, a solução foi novamente centrifugada em 7.850 rpm a 4 ºC e o sobrenadante descartado. O *pellet* proteico então passou por sucessivas lavagens com 2 mL de metanol (3X), acetona 80% (3X) e etanol (1X) e em seguida foi solubilizado/ressupendido em 150 uL de tampão de ureia e tioureia (7M:2M).

3.8 QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DAS PROTEÍNAS

A quantificação das proteínas foi realizada a partir do método colorimétrico descrito por Bradford (1976), utilizando a curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) para determinação das concentrações das proteínas. Para a dosagem das proteínas, 5 uL do extrato proteico foi adicionado a 2 mL do reagente de Bradford em tubos de ensaio que foram vortexados e incubados no escuro por 15 minutos. Após esse período, a quantificação das proteínas foi realizada em espectrofotômetro

utilizado comprimento de onda de 595 nm, e as ABS obtidas foram utilizadas juntamente com os valores obtidos da equação da curva da padrão para determinação da concentração dos extratos proteícos.

A análise da integridade das proteínas extraidas foi realizada por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) em cuba de eletroforese vertical (20 x 20 cm) e gel de poliacrilamida a 12 %. As proteínas foram aplicadas na concentração de 50 ug misturadas com tampão de amostra 2x (azul de bromofenol – 0,04 %; TRIS-HCl – 1,25 mM, pH 6,8; SDS – 4 %; glicerol – 23%; B-mercaptoetanol – 10 %, H2O milliQ q.s.q) na proporção de 1:1. Utilizou-se o marcador de baixo peso molecular (*LMW Calibration, GE life Sciences*) As condições de corridas foram: 1) Empilhamento - 300 W, 17 mA, 120 V por 50 minutos e 2) Separação - 300 W, 34 mA, 120 V por 2 horas e 30 minutos. Após o término da eletroforese, o gel foi imerso em solução de fixação (etanol 40%; ácido acético 10%) por 30 minutos e posteriomente em solução corante (metanol 20%, ácido acético 5%, H_2O destilada, solução de azul de Coomassie (Phastgel Blue G, GE *Life Sciences*) – 50 %]. Após esse período, o gel foi descorado em solução descorante (etanol 20 %, ácido acético 5 %) até alcançar um gel de fundo translucido e com visualização das bandas. Após a descoloração, os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético 5 %).

3.9 ANÁLISE PROTEÔMICA POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)

3.9.1 Focalização isoelétrica (1º dimensão)

A focalização isoelétrica (IEF) foi realizada no sistema IPGphor III (GE *Life Sciences*) utilizando fitas (*Dry strips*) de 13 cm e gradiente de pH 3-10 linear (GE *Life Sciences*) com 250 µg do extrato proteico. As fitas foram reidratadas por 15 horas na IPG-Box (GE Life Sciences) à temperatura ambiente, contendo tampão de reidratação (ureia – 6M; tioureia – 2M; Chaps – 2%; azul de bromofenol – 1%; H20 MilliQ q.s.q), DTT (ditiotreitol) e IPG *buffer* pH 3-10 e a amostra, completando um volume total de 250 µL. Logo após o período de reidratação, a IEF foi realizada durante 4 etapas, utilizando as seguintes condições: 500 V - 50 V/h, 1.000 V - 800 V/h, 8.000V – 11.300 V/h e 800V – 2.900V/h. Foi utilizado óleo mineral para evitar a danificação das fitas durante a IEF. Durante toda a focalização, foram mantidas condições constantes de

corrente (200 mA). Após a focalização isoelétrica, as fitas foram armazenadas a -80°C até a realização da segunda dimensão.

3.9.2 2D-PAGE (2º dimensão)

Para a segunda dimensão (eletroforese), as fitas focalizadas anteriormente foram equilibradas em dois processos consecutivos. Inicialmente foi realizada a redução e, em seguida, a alquilação das fitas. Estas foram submetidas à redução através da imersão em tampão de equilíbrio contendo 2% DTT (ditiotreitol) e traços de corante bromofenol por 30 minutos. Posteriormente, as fitas foram transferidas e imersas em nova solução de equilíbrio contendo 4% de IAA (iodoacetamida) e traços do corante bromofenol por mais 30 minutos.

A segunda dimensão, ou eletroforese bidimensional, foi realizada no sistema Omniphor MV 20 (Biosystems) em SDS-PAGE 12.5%, utilizando uma fita da IEF por gel, constando das seguintes etapas: 40 mA por 15 min, 80 mA por 30 min, 100 mA por 2,5 h; com voltagem fixa de 300 W e potência de 120 V. Foram obtidos géis em triplicata para cada tratamento analisado. Os géis foram mantidos por 30 minutos em solução fixadora e, posteriormente, imersos na solução corante durante 48 horas. Em seguida, os géis foram submetidos à imersão em solução descorante por 30 minutos. Após a descoloração, os géis foram armazenados em solução de preservação.

3.10 DIGITALIZAÇÃO DOS GÉIS

Os géis foram digitalizados utilizando no ImageScanner III a partir do software LabScan (GE *LifeSciences*). Os seguintes parâmetros foram utilizados para a calibração do scanner: modo de transparência, resolução de 300 dpi e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com azul de Coomassie blue. O scanner foi previamente calibrado com uma fita de calibração Kodak 3, que apresenta valores de densidade ótica ou difusa definidos, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante.

3.11 ANÁLISE DAS IMAGENS

As imagens dos géis foram analisadas no software de análise ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE *Life Sciences*) o qual fornece informações dos spots como sua

localização no gel, o ponto isoelétrico (pI), a massa molecular (MM) e porcentagem (%) de volume, além de informar as comparações e inferências estatísticas, como a razão da % de volume (ratio), referente a razão entre dois spots correspondentes em um match, o valor da ANOVA e o índice de correlação dos géis entre tratamentos (*scatter plot* ≥ 0.7). Todas as triplicatas de géis de cada tratamento foram submetidas aos mesmos parâmetros de análise comparativa para detecção e seleção de spots, com verificação visual para eliminação de interferentes como bolhas e artefatos da coloração. Foi realizada uma comparação binária entre os diferentes tratamentos. Nas comparações das triplicatas entre os tratamentos, foram selecionados como spots diferenciais aqueles que apresentaram razão de variação no parâmetro normalizado porcentagem de volume (%vol) ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05. Estes spots selecionados foram denominados DAPs (proteínas diferencialmente acumuladas), os quais são comuns entre tratamentos ou exclusivos de cada tratamento.

3.12 DIGESTÃO DOS SPOTS COM TRIPSINA

Os spots selecionados foram excisados manualmente dos géis e incubados em uma solução de descoloração contendo 25 mM de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) + acetonitrila 50 % durante 12 horas. Após esse período os *spots* foram imersos em 100 µL de acetonitrila 100 % para desidratação do gel, incubados por 5 min à temperatura ambiente e depois levados ao *speed vac* para secagem dos *spots*. Finalizadas estas etapas, adicionou-se cerca de 15 µL de solução de tripsina na concentração de 20 $ng.\mu L^{-1}$ + solução contendo 25 mM de NH_4HCO_3 nos spots, os quais foram incubado a 37 ºC em banho seco, overnight (16h), garantindo a máxima tripsinização da proteína. Em seguida, após um spin, o excesso de tripsina foi removido e transferido para um novo tubo. Ao spot foi adicionada a solução de extração de peptídeos (5 % de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50 % de acetonitrila), o qual foi mantido durante 30 minutos sob agitação leve, em seguida a solução foi retirada e adicionada à solução remanescente de tripsina. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. Por fim, as amostras foram totalmente evaporadas, utilizando evaporadores centrífugos tipo Speed-Vac (Eppendorf) e armazenadas a - 20 ºC até a realização das análises por espectrometria de massas.

3.13 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros MS foram obtidos em espectrômetro AutoFlex III ToF/ToF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), baseado na ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI/ToF), localizado no CETENE (Centro de Tecnologia de Nordeste). Para tanto, os peptídeos concentrados e secos foram eluidos em solução de matriz (1% ácido α-ciano-4-hidrocinâmico). Os espectros MS foram obtidos de acordo com os parâmetros do método reflexivo (RP_Proteomics), excluindo-se da análise íons com m/z menor que 700 Da e maiores que 5000 Da. Os espectros obtidos foram analisados no programa Flex Analysis (BRUKER).

3.14 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

3.14.1 Identificação das proteínas

Para a análise de PMF (*peptide mass fingerprint*), os espectros obtidos tiveram seus arquivos peaklist.xml analisados no software Mascot (Matrix Science) usando o método PMF contra os bancos de dados que estão disponíveis na versão online do software (http://www.matrixscience.com). Os parâmetros utilizados para as comparações foram: 1) base de dados: NCBIprot, SwissProt; 2) taxonomia: *Viridiplantae*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e Other Green Plants; 3) modificação fixa: carbamidometil (C); 4) modificação variável: oxidação (M); e 5) tolerância (peptide tol) de: 0,1 - 1,2 Da ou 50, 100, 150, 200 ppm. Também foram realizadas buscas no banco de dados da UWPR - University Washington Proteomics Resource (https://proteomicsresource.washington.edu/mascot/cgi/login.pl), utilizando os seguintes parâmetros: 1) base de dados: *Lemnoideae* e Database_Araceae; 2) taxonomia: All entries; e 3) modificação fixa: carbamidometil (C); 4) modificação variável: oxidação (M); e 5) tolerância (peptide tol) de: 0,1 - 1,2 Da ou 50, 100, 150, 200 ppm.

3.14.2 Ontologia gênica (GO)

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta Retrieve ID e submetidas à análise de distribuição

de ontologia gênica (GO) por processo biológico, função molecular e localiação subcelular no programa OmicsBox (https://www.biobam.com/omicsbox/), utilizando as ferramentas InterProScan e GO-Slim (MITCHELL et al., 2019). A distribuição de termos GO, ou categorias funcionais, do conjunto das DAPs de cada tratamento foram utilizadas em todas as comparações.

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO ASSOCIADOS AO CULTIVO COM $Pb(NO_3)_2$

Os bioensaios realizados com diferentes concentrações de Pb demonstraram alterações na dinâmica de crescimento de *L. aequinoctialis* clone M1 (Figura 5). Observou-se diminuição no crescimento das populações clonais quando submetidas as concentrações crescentes de Pb.

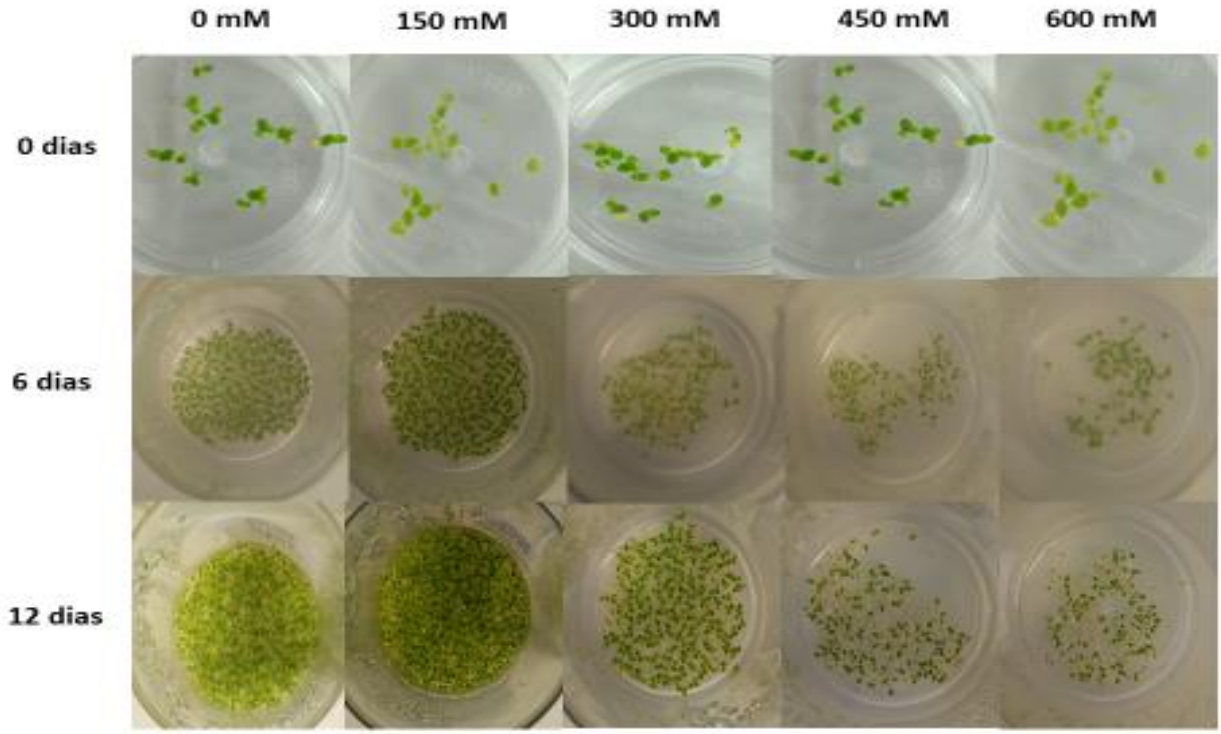

Figura 5 – *L. aequinoctialis* clone M1 em meio de cultura SH 0,5X com adição de Pb $(NO_3)_2$. Bioensaio realizado a partir do inoculo de populações clonais submetidas a diferentes concentrações de Pb durante 12 dias.

A taxa de crescimento relativo (TCR), parâmetro de crescimento que mensura o incremento de massa na matéria por num determinado intervalo de tempo, apresentou diferenças significativas nos tratamentos com 300 mM (100 $mg.L^{-1}$), 450 mM (150 $mg.L^{-1}$) e 600 mM (200 $mg.L^{-1}$) de $Pb(NO_3)_2$ em relação a condição controle. Em contrapartida, os clones cultivados com 150 mM (50 $mg.L^{-1}$) não obtiveram diferenças significativas na TCR, e em determinados momentos do período experimental, a TCR foi maior que o tratamento controle. Os valores médio das TCR entre os tratamentos, no 12º dia do experimento, foram de 0 mM (controle) – 0,234

gPS.dia^{-1}**;** 150 mM - 0,226 gPS.dia^{-1}**;** 300 mM – 0,164 gPS.dia^{-1}**;** 450 mM – 0,109 gPS.dia^{-1}**;** 600 mM – 0,051 gPS.dia^{-1} (Figura 6).

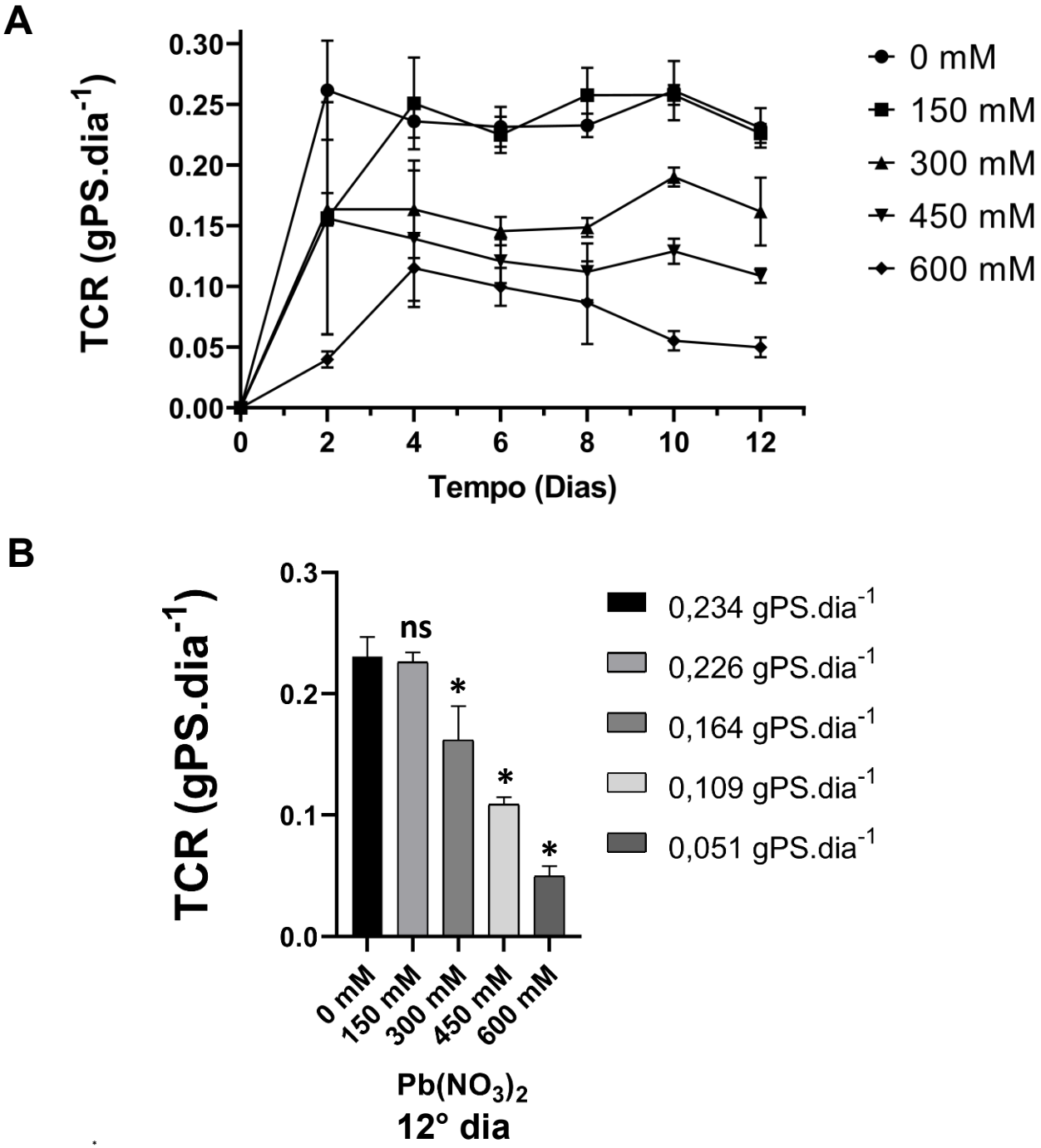

Figura 6 – Taxa de crescimento relativo de *L. aequinoctialis* clone M1 em resposta a diferentes concentrações de $Pb(NO_3)_2$ ao longo (A) e no final (B) do período experimental. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p<0,05$, onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle.

As diferenças nos valores da TCR entre os tratamentos com 300 mM (100 mg.L^{-1}), 450 mM (150 mg.L^{-1}) e 600 mM (200 mg.L^{-1}) representam, em relação a

condição controle, uma taxa de inibição do crescimento (TI) de aproximadamente 55,2 % em 300 mM, 77 % em 450 mM e 85,9 % em 600 mM de Pb^{2+} no 12º dia de tratamento (Figura 7)

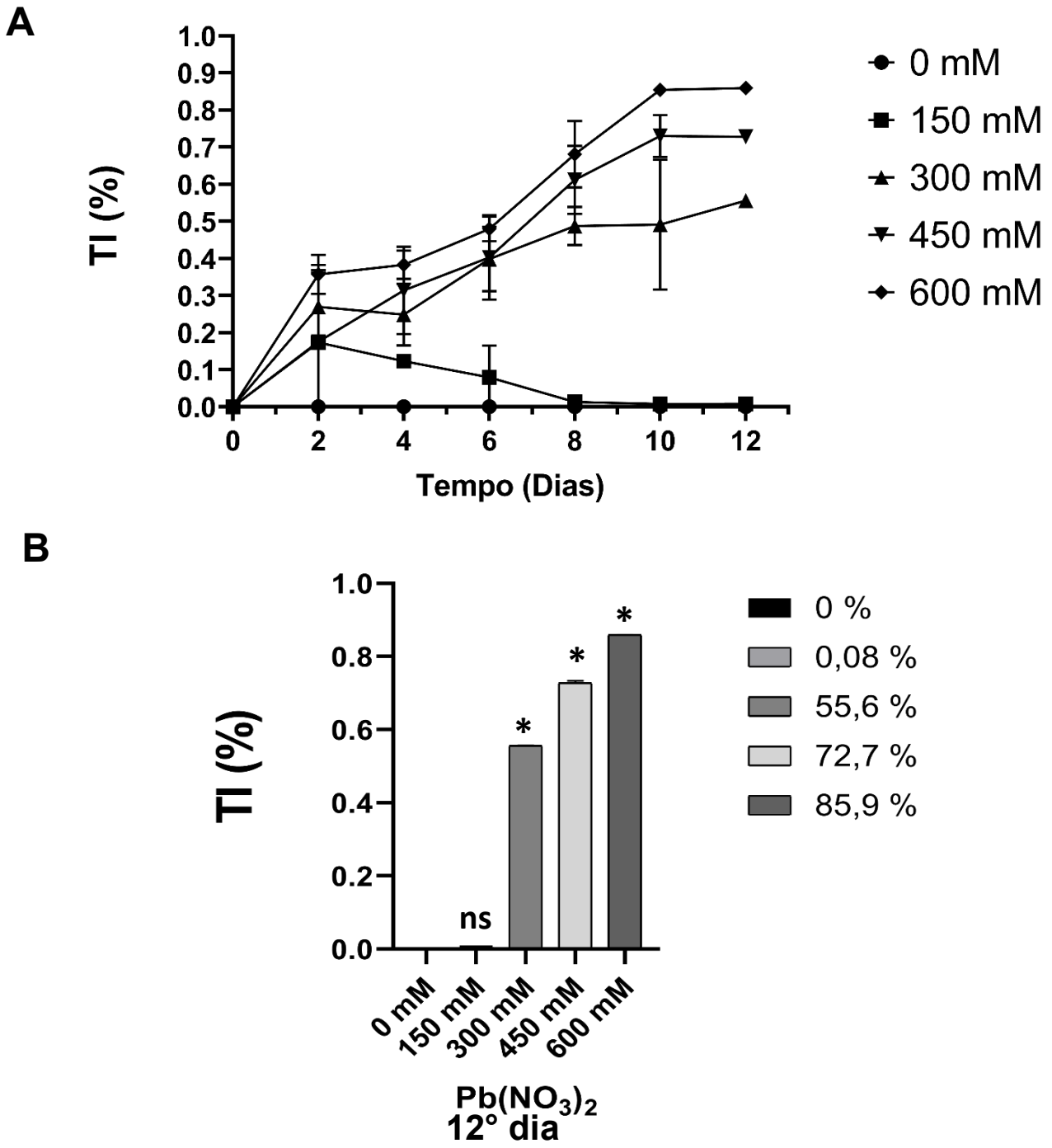

Figura 7 – Taxa de inibição do crescimento de *L. aequinoctialis* clone M1 resposta a diferentes concentrações de Pb $(NO_3)_2$ ao longo (A) e no final (B) do experimento. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p<0,05$, onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle.

Já o tempo de duplicação (TD) também teve aumento bastante significativo entre a condição controle e o tratamento com 600 mM (200 $mg.L^{-1}$). As populações clonais

apresentaram TD médio de 2,9 dias no controle, enquanto o TD médio dos clones no tratamento com 600 mM foi de 14,1 dias, representando aproximadamente aumento de 4 vezes do TD entre os tratamentos, demonstrando o potencial de inibição de crescimento do Pb em elevadas concentrações. Os demais TDs médios são: 150 mM – 3,06 dias, 300 mM – 4,2 dias, 450 mM – 6,3 dias e 600 mM – 14,1 dias no 12º dia de tratamento (Figura 8).

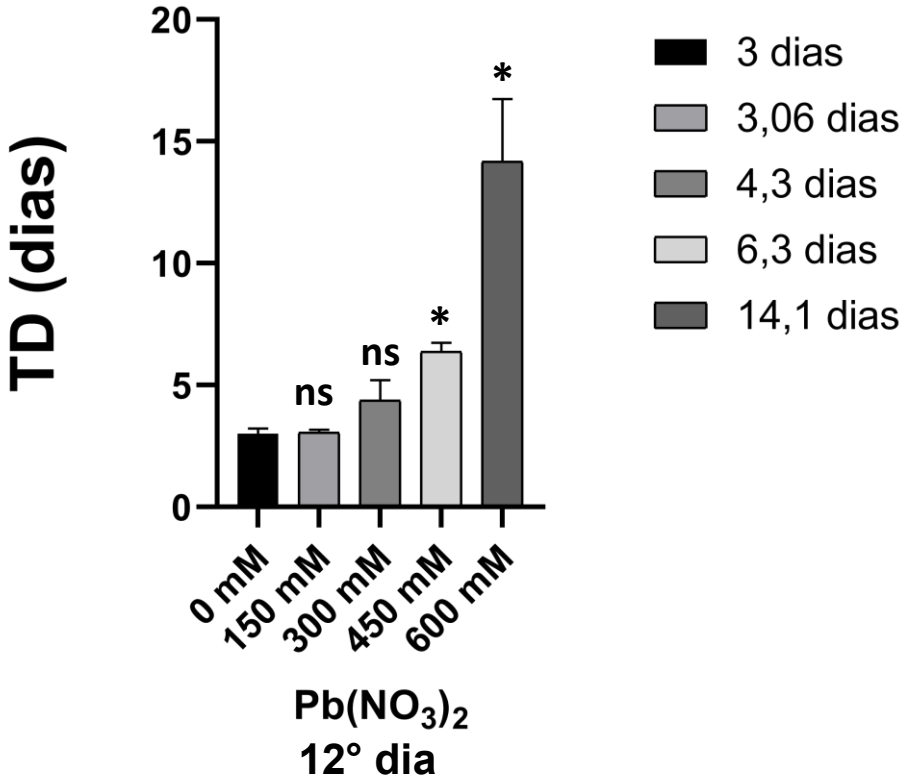

Figura 8 – Tempos de duplicação de *L. aequinoctialis* clone M1 sob diferentes concentrações de $Pb(NO_3)_2$ ao final do período experimental. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p<0,05$, onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle.

O rendimento de biomassa (RB), que calcula o incremento da biomassa por área e intervalo de tempo, também teve decréscimo significativo. O RB das populações clonais na ausência de Pb foi de 1,768 $gPS.d^{-1}.m^{-1}$, enquanto os clones cultivados nos tratamentos com 300 mM (100 $mg.L^{-1}$), 450 mM (150 $mg.L^{-1}$) e 600 mM (200 $mg.L^{-1}$) obtiveram, ao final do período experimental, um RB de 0,7333 $gPS.d^{-1}.m^{-2}$, 0,3185 $gPS.d^{-1}.m^{-2}$ e 0,0973 $gPS.d^{-1}.m^{-2}$ respectivamentes (Figura 9), representando aproximadamente um RB 17 vezes menor entre as populações cultivadas na condição controle em relação tratamento com 600 mM de Pb.

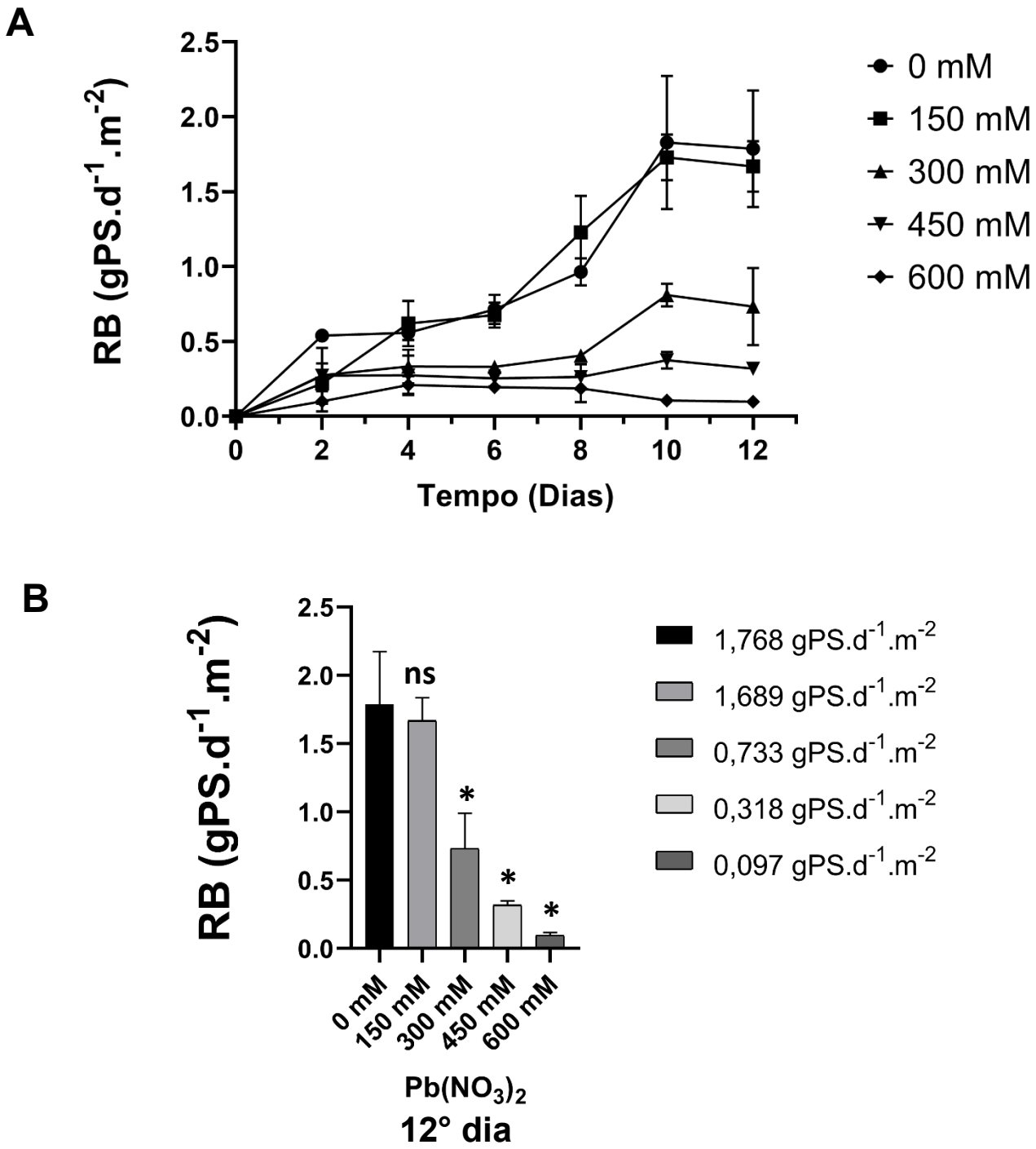

Figura 9 – Rendimento de biomassa de *L. aequinoctialis* clone M1 sob resposta a diferentes concentrações de $Pb(NO_3)_2$ ao longo (A) e no final (B) do período experimental. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p<0,05$, onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle.

Após a análise dos parâmetros de crescimento avaliados, optou-se por utilizar a concentração de Pb que foi considerada a subletal como condição contrastante (300 mM) para a análise proteômica diferencial subsequente.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DO BIOACÚMULO DE Pb^{2+}

As populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1 bioacumularam cerca de 8.570 mg.kgPS^{-1} de Pb^{2+} ao final do período experimental, indicando um fator de bioacumulação do Pb^{2+} (BFC) de 85,7.

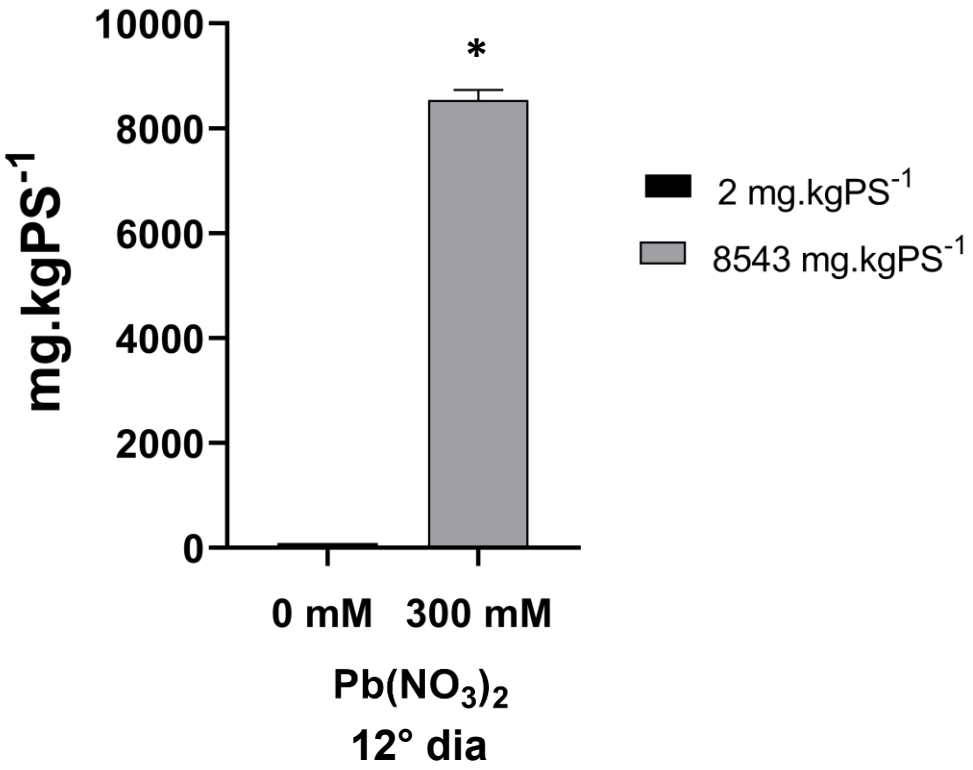

Figura 10 – Bioacumulação de Pb^{2+} nas populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1 cultivadas na concentração de 300 mM de de $Pb(NO_3)_2$ ao final do período experimental. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Teste t-student estabelecidos em $p<0,05$, onde * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

A quantificação dos pigmentos fotossintéticos revelou acentuada clorose nas frondes das populações clonais após 12 dias de tratamento (Figura 11), com diferenças significativas para os teores de clorofila “a”, clorofila “b” e clorofilas totais entre a condição controle e o tratamento com 300 mM (100 mg. L^{-1}) de Pb. A clorofila “a” reduziu de 0,234 g. kgPS^{-1} para 0,143 g. kgPS^{-1} após o tratamento, enquanto a clorofila “b” teve redução de 0,074 g. kgPS^{-1} para 0,041 g. kgPS^{-1} e a clorofila total reduziu de 0,309 g. kgPS^{-1} para 0,184 g. kgPS^{-1}. Os teores de carotenoides não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

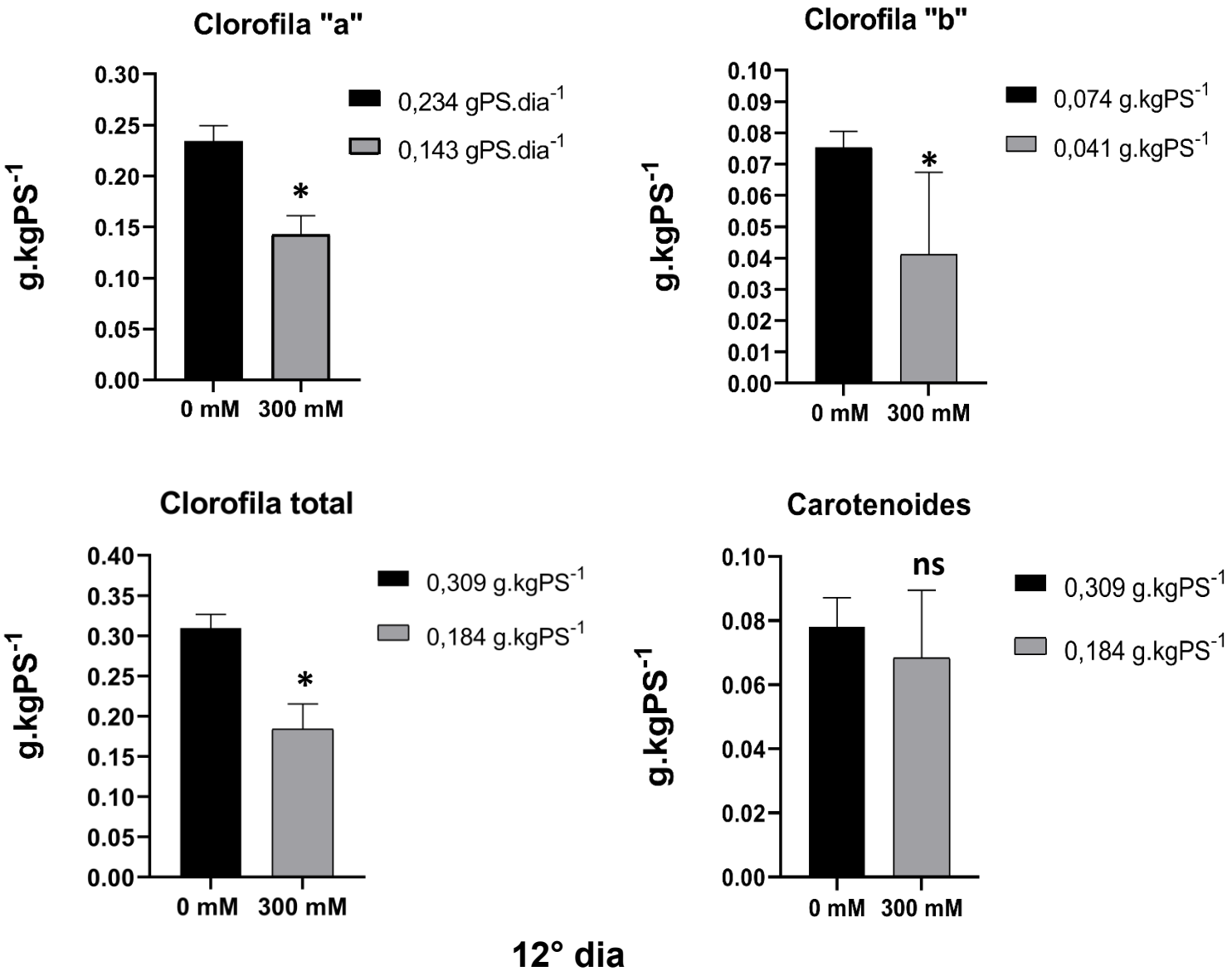

Figura 11 – Teores globais de clorofila “a”, “b”, totais e carotenoides das populações de *L. aequinoctialis* clone M1 submetidas ao tratamento com 0 mM x 300 mM de $Pb(NO_3)_2$. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Teste t-student estabelecido em $p<0,05$, onde onde ns = não significativo e * = significativo a 5% em relação ao tratamento controle.

4.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

O método de extração proteico por SDS-Denso (PIROVANI, 2011) permitiu obter proteínas totais solúveis em uma grande faixa de massa molecular. A eficiência do método e a integridade das proteínas podem ser observadas através do perfil de migração eletroforética em gel SDS-PAGE. Além disso, pode-se notar a ausência de interferentes (Figura 13).

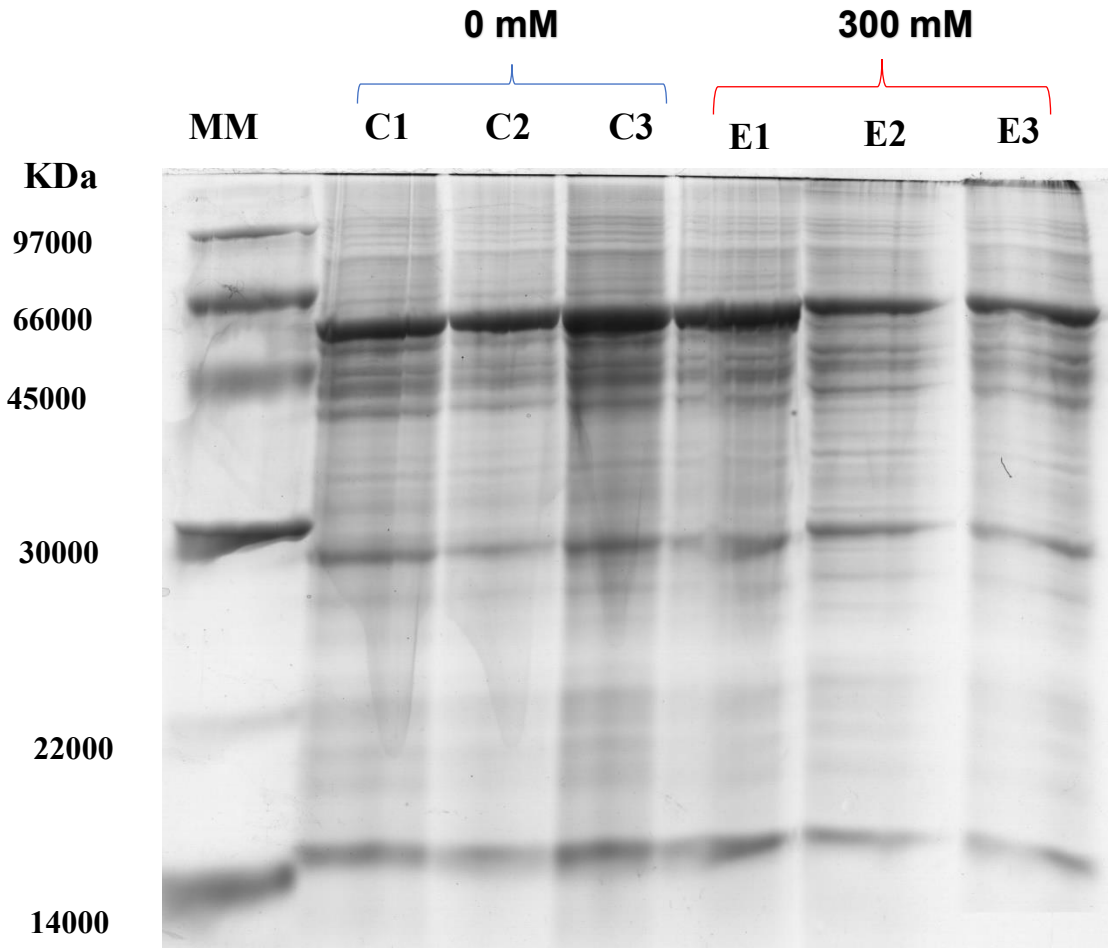

Figura 12 – SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5% das proteínas solúveis totais de *L. aequinoctialis* clone M1 submetidas a dois tratamentos: [0 mM] (C-1, C-2, C-3) X [300 mM] (E-1,E-2,E-3). Marcador de baixo peso molecular (MM) em KDa.

A eletroforese bidimensional permitiu a detecção de uma média de 328 *spots* no controle [0 mM] e 210 *spots* no tratamento com [300 mM]. O coeficiente de correlação (*scatter splots*) entre as três réplicas dos géis 2D de cada tratamento foi significativo (≥0.7), na qual a correlação ficou entre 0,929 e 0,989, demonstrando assim a baixa variação experimental entre as réplicas de um mesmo tratamento. A massa molecular das proteínas variou de 97,0 a 14,4 KDa com concentração mais frequente das proteínas entre 30 a 66 KDa e pI de 5-8 (Figura 14).

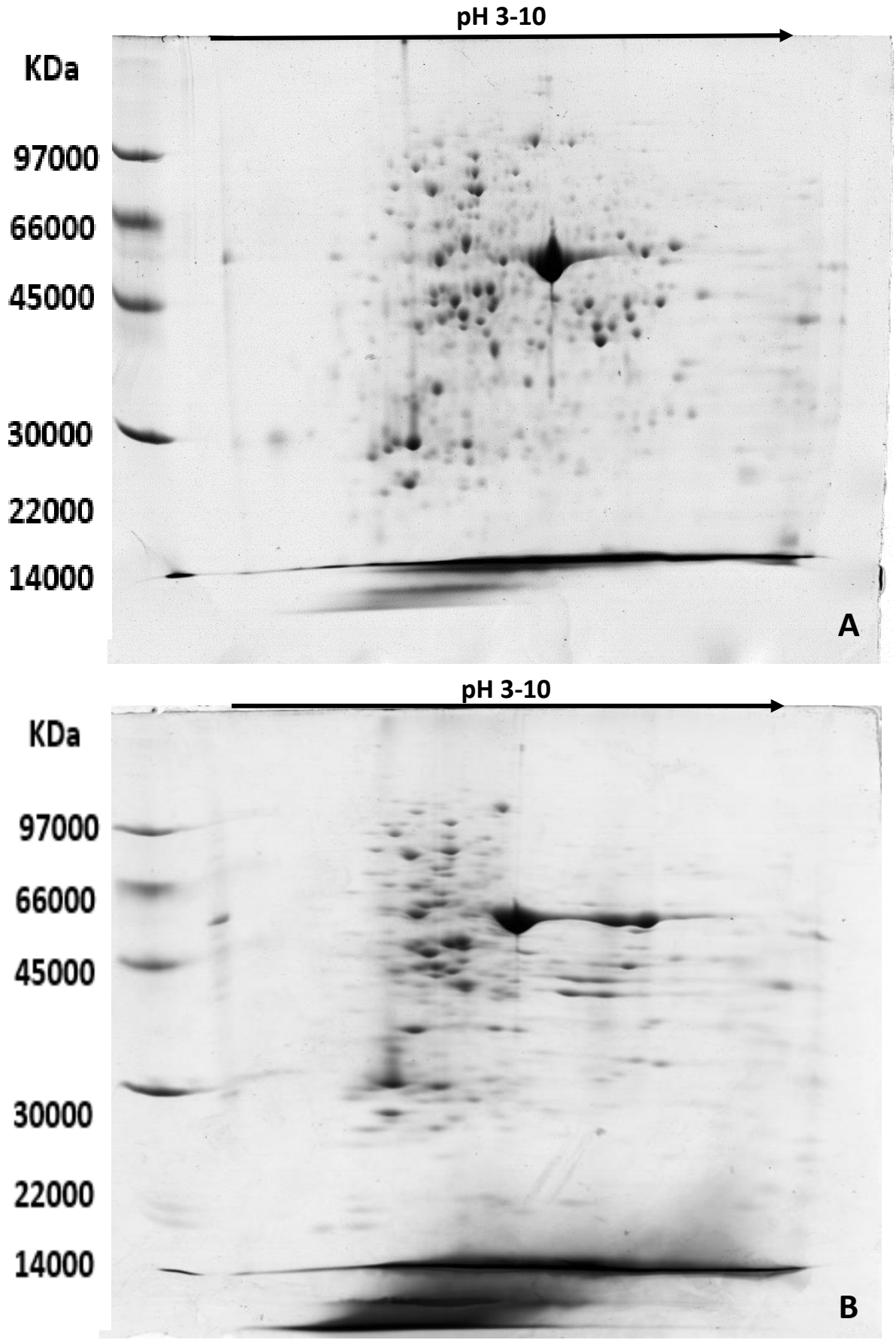

Figura 13 – Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* em diferentes massas moleculares e pontos isoéletricos: A - 0 mM e B – 300 mM. Marcador de baixo peso molecular (MM) em KDa.

Foram identificadas 157 proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs), totalizando 121 *spots* exclusivos: 100 *spots* no tratamento de 0 mM e 21 *spots* no tratamento de 300 mM. Os demais 36 *spots* foram detectados em ambos os tratamentos (comuns), destes 15 desse foram mais acumulados na condição controle e 18 apresentaram maior acúmulo nas amostras provenientes do tratamento 300 mM de Pb^{2+} (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição e categorização das DAPs identificadas do proteoma diferencial das populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1.

Tratamento	Número de *spots*	DAPs Comuns	DAPs Exclusivos	DAPs Total
Controle	328	14	100	114
Estresse	210	18	21	39
Total	538	36	121	157

As DAPs identificadas estão localizadas nas faixas de pI de pH 3-10 e peso molecular de 30,0 a 90,0 KDa. Em relação ao pI, houve maior variação das DAPs entre os tratamentos na faixa de pH 4-7, enquanto em relação a peso molecular, a variação das DAPs entre os tratamentos ocorreu de maneira uniforme em todas as faixas de massa (Figura 15 e 16).

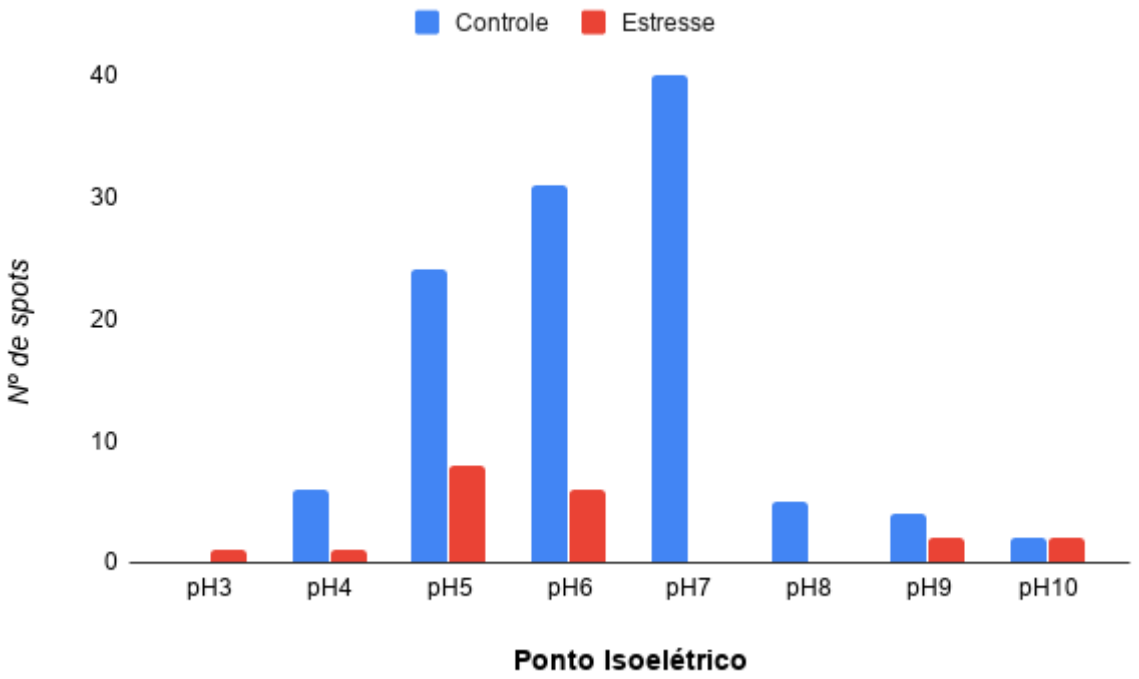

Figura 14 – Distribuição das DAPs identificadas do proteoma diferencial das populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1 em diferentes faixas pontos isoelétricos.

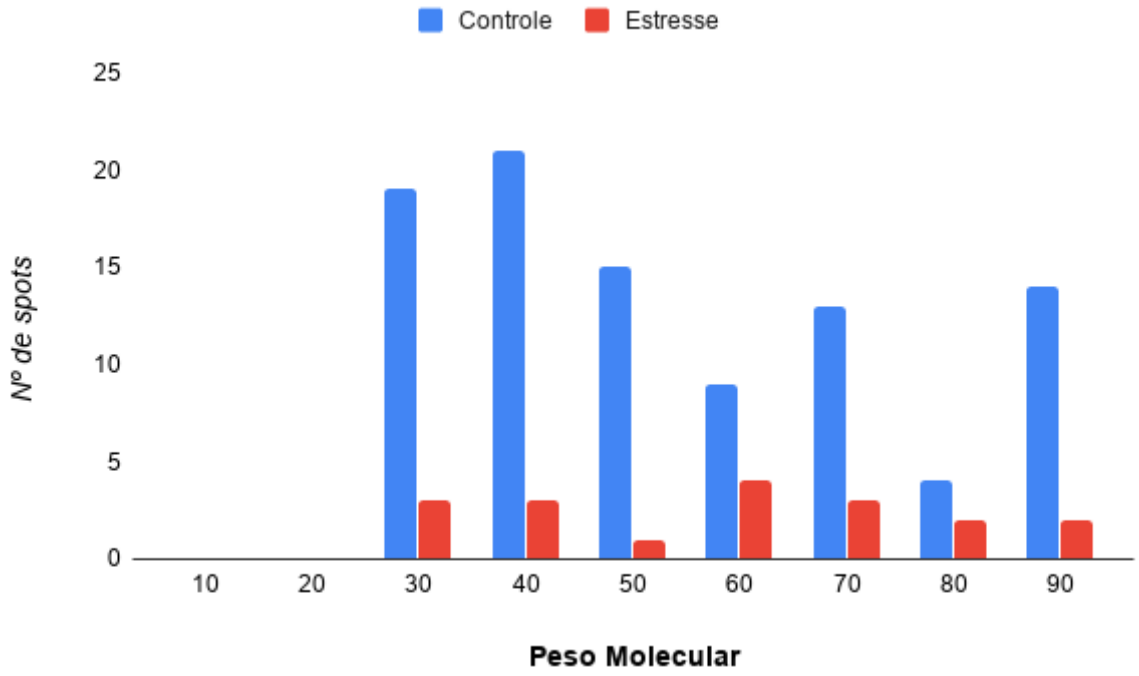

Figura 15 – Distribuição das DAPs identificadas do proteoma diferencial das populações clonais de *L. aequinoctialis* clone M1 em diferentes faixas de peso molecular.

A análise por espectrometria de massas das 157 DAPs permitiu a identificação de 41 proteínas. Foram identificadas 16 proteínas entre as DAPs comuns das quais 2 foram redundantes, 15 proteínas entre as DAPs exclusivas do tratamento controle (0 mM - Pb $(NO3)_2$) e 10 proteínas entre as DAPs exclusivas do tratamento com 300 mM $Pb(NO_3)_2$. Dentre o total proteínas identificadas, duas tiveram similaridade com proteínas que ainda não foram totalmente caracterizadas nos bancos de dados, e por isso não possuem função biológica bem definida, enquanto as outras 39 proteínas foram presumivelmente anotadas, permitindo assim inferir aspectos do proteoma diferencial, bem como sua associação a processos fisiológicos mensurados. As proteínas identificadas (comuns e exclusivas) foram agrupadas em dois grupos: proteínas do tratamento controle e proteínas do tratamento sob estresse (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Identificação presumível das DAPs do tratamento controle de *L. aequinoctialis* clone M1 cultivado em meio de cultura SH 0,5X**.** Anotação putativa realizada de acordo com os padrões de similaridade (p≤0.05) da plataforma Mascot.

Spot	Ratio	Anova	Acesso Uniprot	Proteína	Score	Massa/PI experimental	Massa/PI teórica	Função molecular	Espécie
3	4,13216	0,002	O80885	Metaloprotease de membrana	56	52235/9.67	48696/8.59	Ligação a proteína/ hidrolase (meteloendopeptidase)	*Arabidopsis thaliana*
33	1,56664	0,036	P29305	Proteína 14-3-3	56	31875/5.72	29448/4.83	Atividade regulatória enzimática/hidrolase	*Hordeum vulgare*
63	1,52943	0,009	Q9LVG2	Fator de transcrição responsivo ao etileno	58	45198/7.45	53473/6.77	Ligação ao DNA (fator de transcrição)	*Arabidopsis thaliana*
90	2,89855	0,001	A0A3P6BN59	Proteína contendo domínio dioxigenase Fe2/OG	83	56154/7.18	41668/6.43	Atividade catalítica (oxidoredução)	*Brassica rapa*
147	1,87299	0,019	P40392	Proteína relacionada a Ras RIC1	52	14405/6.57	22690/5.15	Ligação ao nucleotídeo/ hidrolase (GTPase)	*Oryza sativa*
15	2,24815	0,011	O80885	Metaloprotease de membrana	64	37123/8.12	48696/8.59	Ligação a proteína/ hidrolase (metaoendopeptidase)	*Arabidopsis thaliana*
163	1,56789	0,001	Q14FF9	Proteína S14 ribossomal 30S	56	59475/5.61	11789/11.50	Atividade molecular estrutural/ligação ao RNA	*Populus alba*

175	1,56789	0,044	Q01KS3	OSIGBa0146I21.5	70	64058/7.27	91817/7.62	Hidrolase	*Oryza sativa*
179	1,78709	0,017	A0A078J558	Formyltetra-hidrofolato deformilase, isoforma X2	84	15307/6.63	37344/8.37	Hidrolase/transferase	*Brassica rapa*
180	1,80669	8,86E-04	Q9FVR3	Celulose sintase	56	45876/5.96	110267/5.77	Transferase	*Arabidopsis thaliana*
271	Exclusivo	0,001	B9FTR1	Cinesina KIN-14M	52	41314/5.31	130305/7.67	Ligação ao nucleotídeo/atividade motora/ligação a proteína	*Oryza sativa*
247	Exclusivo	3,31E-06	Q39442	Subunidade catalítica A da ATPase de prótons do tipo V	62	29761/4.71	68790/5.10	Ligação ao nucleotídeo/atividade de transporte/hidrolase	*Beta vulgaris*
248	Exclusivo	0.015	P49100	Citocromo b5	51	28603/5.87	15330/5.10	Atividade catalítica/ligação	*Oryza Sativa*
292	Exclusivo	1,86E-04	Q3ZJ93	RNA polimerase subunidade beta	61	53100/4.45	25380/10.09	Ligação ao DNA/transferase	*Tupiella akineta*
305	Exclusivo	8,46E-04	Q9AR19	Histona acetiltransferase	87	71310/6.51	61163/5.90	Ligação a proteína/transferase	*Coffea arabica*
306	Exclusivo	1,88E-04	Q9LX19	Proteína semelhante à repetição de tetratricopeptídeos	85	72395/7.40	179841/6.27	Ligação a proteína	*Zea mays*

310	Exclusivo	2,00E-03	Q0WTK9	Nucleotidase 3 '(2'), 5'-bisfosfato	83	67449/9.54	45684/6.22	Hidrolase	*Striga asiatica*
314	Exclusivo	4,37E-06	Q9FM93	Proteína F-box associada a FBD At5g56380	61	75930/6.43	50670/8.89	Liase	*Arabidopsis thaliana*
315	Exclusivo	6,56E-06	Q6YZ52	Cinesina KIN-7D	66	77350/6.98	51596/5.50	Ligação ao nucleotídeo/atividade motora/ligação a proteína	*Oryza Sativa*
329	Exclusivo	5,76E-06	F4KFT6	Proteína similar a REM contendo domínio B3	60	98349/6.91	61648/9.44	Ligação ao DNA	*Arabidopsis . thaliana*
365	Exclusivo	0,001	A6MME5	Proteína L20 ribossomal 50S	57	31418/7.35	14178/12.08	Ligação ao RNA/atividade molecular estrutural	*Chloranthus spicatus*
342	Exclusivo	0,001	P53684	Proteína quinase dependente de cálcio	53	33541/4.93	61627/5.50	Ligação ao nucleotídeo/ligação a proteína/atividade de quinase	*Oryza sativa*
375	Exclusivo	9,92E-04	Q9ZQE5	Proteína contendo repetição dos pentatricopeptídeos At2g15690	96	63990/6.25	68423/7.06	Ligação a proteína	*Arabidopsis thaliana*
377	Exclusivo	0,001	Q42404	Ribonucleoproteína nuclear de 70 KDa	85	53571/7.35	21759/6.68	Ligação ao RNA	*Glycine max*

Tabela 3 - Identificação presumível das DAPs do tratamento sob estresse de *L. aequinoctialis* clone M1 cultivado em meio de cultura SH 0,5X**:**300 mM $Pb(NO_3)_2$. Anotação putativa realizada de acordo com os padrões e similaridade (p≤0.05) da plataforma Mascot.

Spot	Ratio	Anova	Acesso Uniprot	Proteína	Score	Massa/PI experimental	Massa/PI teórica	Função molecular	Espécie
39	1,54742	0,011	Q37145	Canal de cálcio	58	35674/5.41	92219/6.92	Atividade de transporte (íons)/transferase/hidrolase	*Arabidopsis thaliana*
57	1,59998	0,001	A0A178UXM4	Quinase citoplasmática de ligação à calmodulina	66	44683/5.82	46341/9.39	Ligação ao nucleotídeo/quinase	*Arabidopsis thaliana*
46	1,53286	0,044	Q8S7M7	Proteína LRR intracelular relacionada ao grupo RAS	54	40498/ 5.54	59510/5.15	Ligação a proteína	*Oryza sativa*
71	1,54681	0,033	Q53JK3	Transposon	72	47755/7.79	57689/7.76	Hidrolase	*Oryza sativa*
79	1,59998	0,017	Q84NR9	Proteína hipotética	68	48638/5.79	20628/12.24	Não definido	*Oryza sativa*
144	2,24567	0,012	A0A1D1Y912	Proteína supressora de silênciamento gênico 3	61	65709/9.15	10982/5.50	Ligação ao RNA	*Anthurium amnicola*
145	Exclusivo	0,003	Q852U6	Ubiquitina-proteína ligase E3 RHY1A	83	91907/6.10	91907/10.32	Ligação a proteína/hidrolase	*Arabidopsis thaliana*

185	Exclusivo	0,038	Q9LUP5	Proteína de repetição Kelch/F-Box	56	35594/5.15	44807/7.43	Ligação a proteína	*Arabidopsis thaliana*
189	Exclusivo	0,006	Q8M9A9	Maturase K	56	18167/4.38	60711/9.53	Ligação ao RNA	*Manilkara zapota*
190	Exclusivo	0,001	O65023	Proteínas transportadoras de ADP, ATP	57	39890/8.97	41976/9.70	Atividade de transporte (ATP)	*Arabidopsis thaliana*
191	Exclusivo	0,035	Q7XLN1	OSJNBa0049H08.10	68	25294/5.75	87893/6.74	Hidrolase	*Oryza sativa*
192	Exclusivo	0,012	P31843	Transcriptase reversa	56	26093/4.81	16960/6.90	Ligação ao RNA	*Oenothera berteroana*
196	Exclusivo	9,9E-06	C5H8J1	Endonuclease de recombinação homóloga EME1B	57	50318/5.95	62554/8.79	Ligação ao DNA/ligação ao nucleotídeo/nuclease	*Arabidopsis thaliana*
206	Exclusivo	3,00E-03	Q0IRB0	Glutaredoxina-C13	51	26126/9.83	11580/8.57	Atividade catalítica (oxidoredução)	*Oryza sativa*
207	Exclusivo	6,00E-04	P32746	Diidroorotato desidrogenase (quinona)	58	65519/6.22	48801/9.26	Atividade catalítica (oxidoredução)	*Arabidopsis thaliana*
209	Exclusivo	4,10E-04	Q657X6	Proteína EXECUTORA 2,	52	73278/8.64	68273/4.94	Ligação ao nucleotídeo	*Oryza sativa*
217	Exclusivo	0,029	P20238	Metalotioneína	56	20170/5.05	8027/4.55	Ligação a íons metálicos	*Erythranthe guttata*

As proteínas identificadas foram distribuidas e classificadas em diferentes categorias de ontologia gênica - GO (processo biológico, função molecular e localização subcelular) para análise do enriquecimento funcional do proteoma diferencial. Essas proteínas foram classificadas e agrupadas nos seguintes subgrupos de cada categoria GO:

- **Processo biológico** - processos biossintéticos, organização dos componentes celulares, processos metabólicos de compostos contendo nucleobases, processos celulares, processos metabólicos, processos metabólicos de proteínas, ciclo celular, transporte, resposta a estresse, transcrição, tradução, metabolismo dos carboidratos, processos biológicos, transdução de sinais, resposta a estímulo abióticos, resposta a luz, desenvolvimento pós-embrionário, desenvolvimento multicelular do organismo, geração de precursores metabólicos e energia, processos metabólicos do DNA, resposta a químicos e não definido - (Figura 17);
- **Função molecular** – ligação a proteína, ligação a RNA, atividade da molécula estrutural, ligação a DNA, atividade motora, atividade catalítica, ligação, atividade quinase, atividade regulatória enzimática, atividade de nuclease, atividade do transportador, atividade de liase, ligação a íons metálicos e não definido - (Figura 18);
- **Localização subcelular** – membrana plasmática, citoplasma, cloroplasto, mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, citoesqueleto e núcleo (Figura 19).

As categorias GO de algumas proteínas foram classificadas em dois ou mais grupos funcionais. Nas plantas submetidas ao tratamento com 300 mM de $Pb(NO_3)_2$ observa-se maior acúmulo de proteínas associadas a respostas a estresses, metabolismo do DNA e metabolismo de proteínas na categoria GO referente a processo biológico. Já na categoria GO referente a função molecular, evidencia-se maior acúmulo de proteínas associadas a atividades catalíticas, transporte e ligação a íons metálicos. Por fim, na categoria GO referente a localização subcelular, nota-se maior acúmulo de proteínas associados e/ou presentes no núcleo e citoplasma.

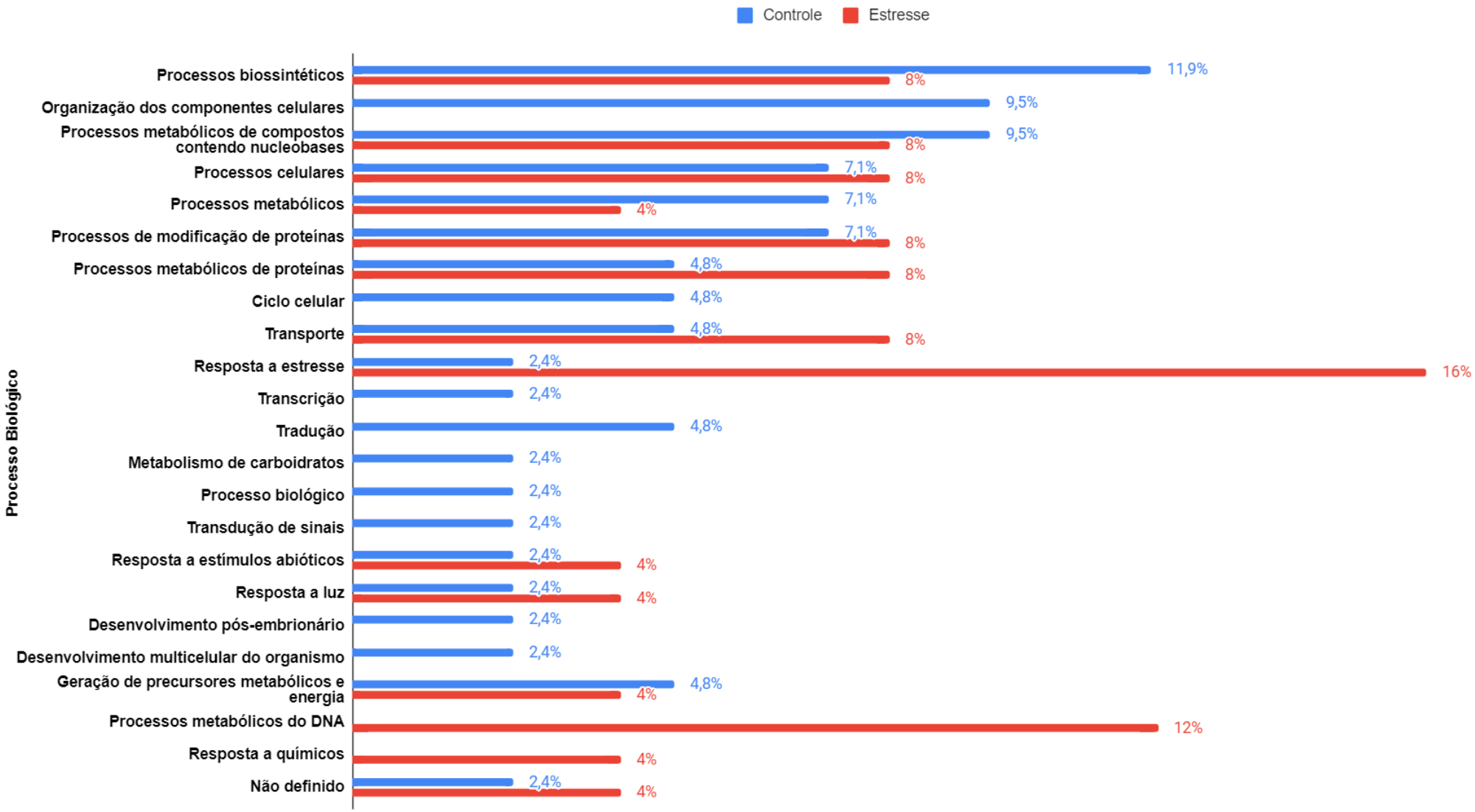

Figura 16 – Categorização das DAPs identificadas de *L. aequinoctialis* clone M1 em processo biológico. Comparação entre as DAPs do tratamento controle (0 mM - $Pb(NO_3)_2$) e estresse (300 mM - $Pb(NO_3)_2$).

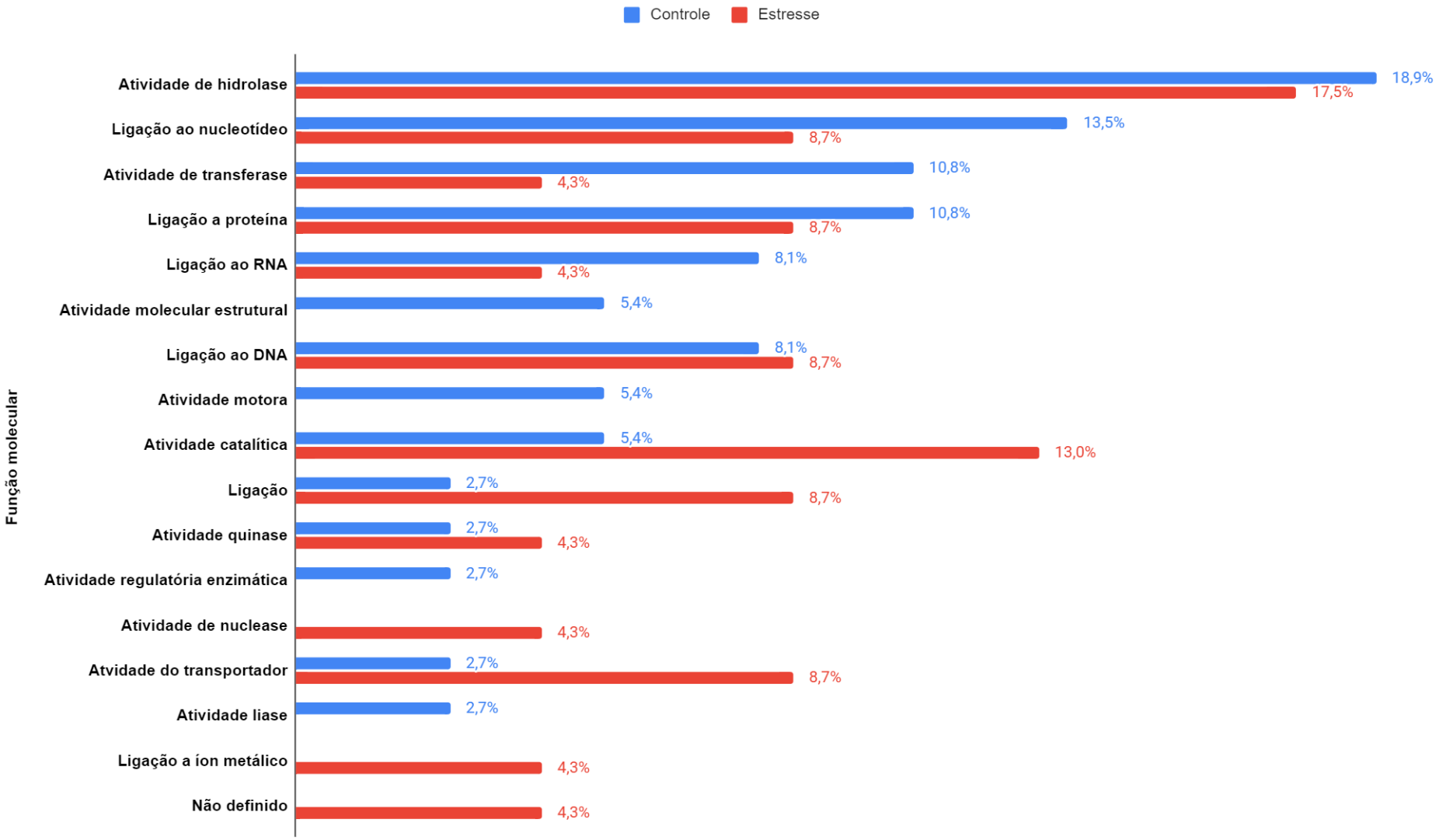

Figura 17 – Categorização das DAPs identificadas de *L. aequinoctialis* clone M1 em função molecular. Comparação entre as DAPs do tratamento controle (0 mM - $Pb(NO_3)_2$) e estresse (300 mM - $Pb(NO_3)_2$).

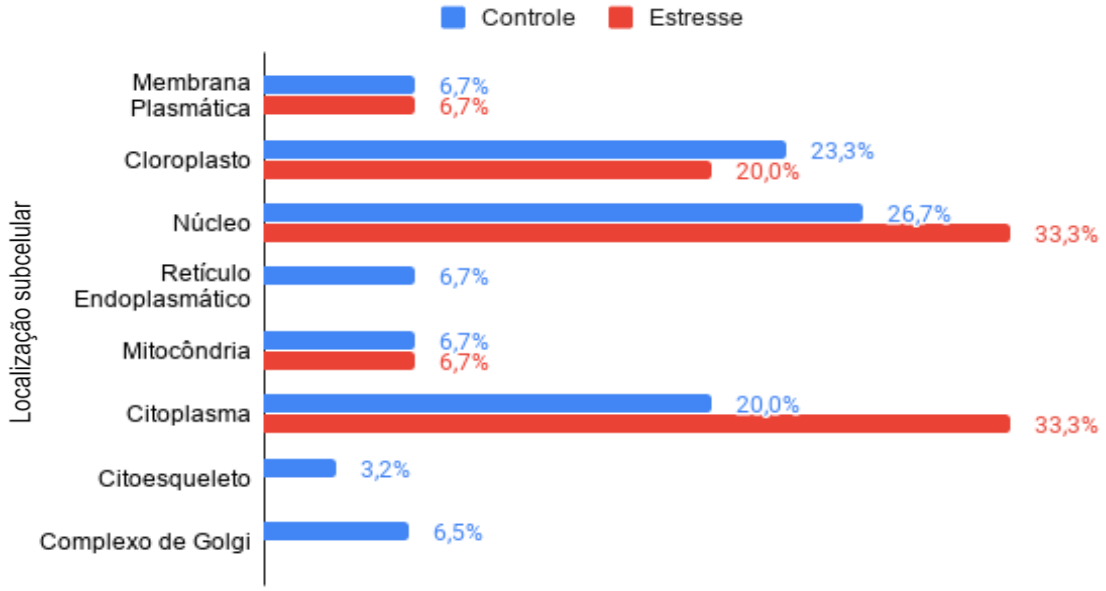

Figura 18 – Categorização das DAPs identificadas de *L. aequinoctialis* clone M1 em localização subcelular. Comparação entre as DAPs do tratamento controle (0 mM - $Pb(NO_3)_2$) e estresse (300 mM - $Pb(NO_3)_2$).

A análise da rede de interação das proteínas (interatoma) mostra a relação das proteínas baseadas em suas vias de atuação catalítica e dependência funcional. Observa-se a associação entre proteínas cloroplastidiais que estão relacionadas com a maquinaria de transcrição e síntese proteica (RNA polimerase, maturase K, proteínas da subunidade maior (50S) e menor dos ribossomos (30S)) com sinalização a morte celular programada (proteína executora 2) e a relação dessas com uma proteína envolvida na regulação da expressão gênica (histona acetiltransferase). Também houve associação entre duas proteínas mitocôndriais relacionadas com fotorespiração e síntese dos aminoácidos Gly/Ser (formiltetrahidrofolato derfomilase) e com a síntese de nucleotídeos de pirimidina (diidrorotato desidrogenase) (Figura 20).

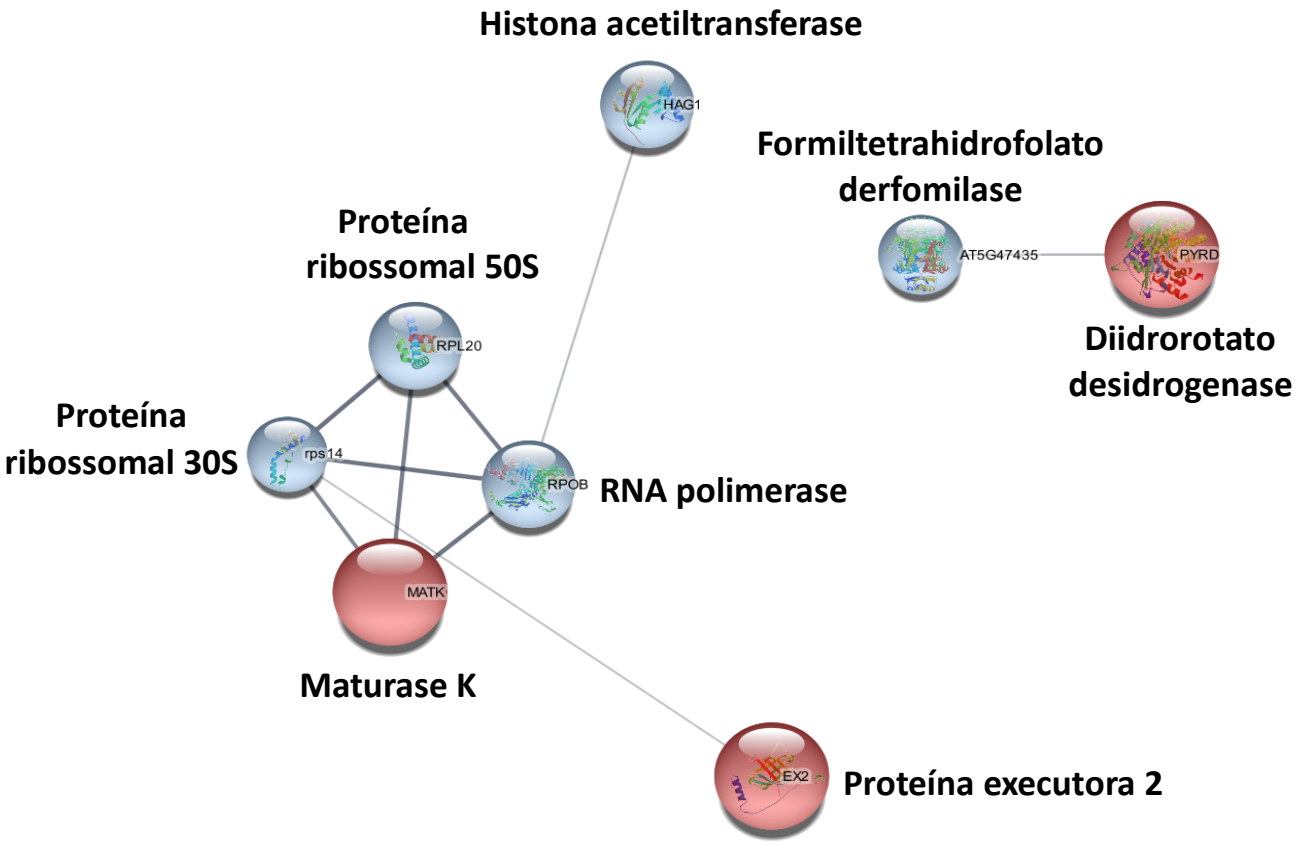

Figura 19 – Rede de interação proteína-proteína analisada pelo software CYTOSCAPE das proteínas diferencialmente acumuladas de *L. aequinoctialis* M1 submetidas as diferentes condições de cultivo. Cores: Azul - proteínas da condição controle/ Vermelho: proteínas do tratamento com Pb^{2+}.

O modelo biológico funcional revela que várias proteínas foram responsivas ao tratamento com 300 mM $Pb(NO_3)_2$, demonstrando assim a plasticidade do proteoma de *L. aequinoctialis* clone M1 em se modificar, buscando promover sua adaptação a condição/meio de cultivo (Figura 21).

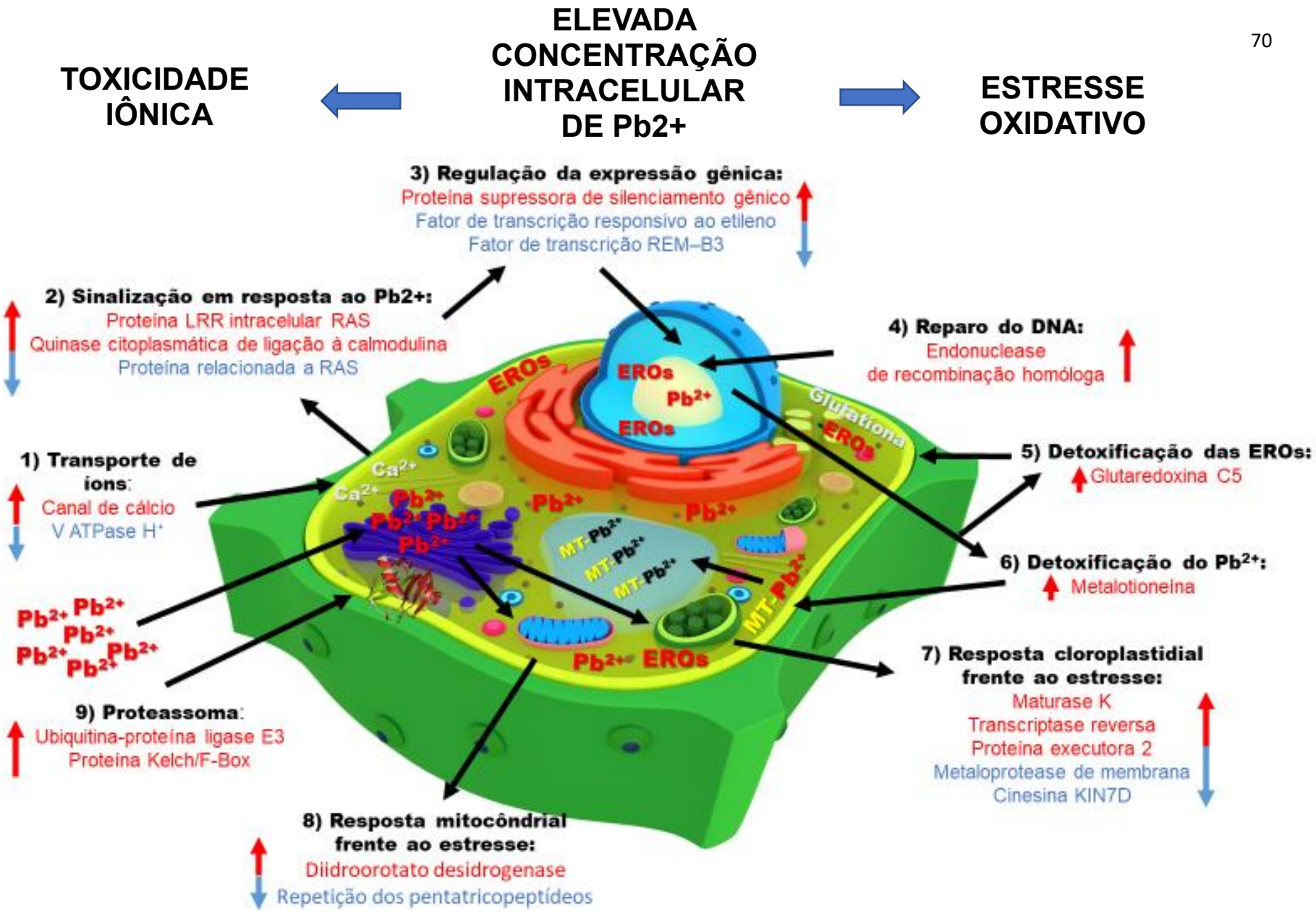

Figura 20 – Modelo biológico dos processos de regulação de proteínas de *L. aequinoctialis* M1 (RDSC5500) submetido ao estresse por Pb^{2+}. As setas em vermelho e azul indicam, respectivamente, as proteínas com maior e menor acúmulo diferencial no tratamento com 300 mM de $Pb(NO_3)_2$.

5 DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO ASSOCIADOS AO ESTRESSE POR CHUMBO

Diante dos parâmetros de crescimento analisados, observa-se que o crescimento de *L. aequinoctialis* clone 5500 é afetado negativamente devido aos efeitos deletérios gerado pelo Pb nas concentrações acima de 300 mM (100 $mg.L^{-1}$) exceto quando esses foram submetidos as concentração de 150 mM (50 $mg.L^{-1}$) e apresentaram performance de crescimento igual ou até, em determinados momentos do período experimental, melhor do que o tratamento controle, indicando um efeito sinérgico deste metal no clone quando presente em concentrações mínimas.

John et al. (2008) e Soares (2013) também observaram a indução do Pb no crescimento em outros clones de *L. aequinoctialis* e *L. polyrrhiza* quando esses foram submetidos a concentrações de 20 $mg.L^{-1}$ a 80 $mg.L^{-1}$ de Pb. Alguns autores sugerem que esse fenômeno acontece devido a produção de fitohomônios de crescimento, principalmente a giberilina e o etileno, que são sintetizados como uma das resposta iniciais ao estresse gerado pelo Pb^{2+} (KHAN et al., 2015; BUCKER-NETO et al., 2017).

Contudo, o Pb geralmente possui efeito inibitório no crescimento e vários estudos demonstram essa inibição em lentilhas-d´água submetidas a doses abaixo de 50 $mg.L^{-1}$ (UYSAL, TURNER, 2007; APPENROTH et al. 2009; LEBLICI, AKSOY, 2011; DIRILGEN, 2011; LEBLICI, KAR, YALÇIN, 2018). Outros autores destacam a grande tolerância de alguns clones submetidos a doses acima de 200 $mg.L^{-1}$ de Pb sem que essa exposição tenha gerado efeitos significativos no crescimento (WOZNY et al., 1990; SOBRINO et al., 2010).

A dinâmica de crescimento das lentilhas-d´água a nível intraespecífico é muito variável. Assim, estudos voltados para a avaliação do crescimento das lentilhas-d´águas sob condições naturais ou experimentais é essencial para a caracterização e seleção de potenciais clones que poderão ser utilizados em processos de fitorremediação (ZIEGLER et al., 2014). Esses dados poderam ajudar validar o clone M1 como um potencial fitorremediador de Pb^{2+}.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

A análise dos teores dos pigmentos fotossintéticos (clorofila “a”, “b” e totais) servem como um bioindicativo para avaliar a toxicidade do Pb^{2+}, e está diretamente associado as taxas de inibição do crescimento dos clones e clorose das frondes. Muitos estudos constatam que elevadas concentrações o Pb^{2+} resulta na redução dos teores totais de clorofila em diferentes espécies de lentilhas-d´água (HOU et al., 2007; CENKCI et al., 2010; SINGH et al., 2012; KUMAR, PRASAD, 2018).

Os resultados demonstram maior redução nos teores de clorofila “a” em relação a clorofila “b”. A clorofila “a” é um dos pigmentos centrais e mais abundantes e importantes na fotossíntese e, por isso seu decréscimo tende a ser mais significativo. Além disso, o fato dos carotenoides não sofrerem redução significativa entre os tratamentos pode estar associados a sua importância (e dai a sua manutenção) como mecanismo de proteção antioxidante (HERNÁNDEZ et al., 2009; PAWLAK-SPRADA et al., 2011; KUMAR et al., 2012; SINGH et al., 2016; KUMAR, PRASAD, 2018).

A literatura descreve que os efeitos antagônicos do Pb^{2+} sob os teores clorofila também pode ocorrer devido a inibição de importante enzima da biossíntese da clorofila, o ácido aminolevulínico desidratase (ALAD), impossibilitando a atividade da ALAD de sintetizar o porfobilinogênio a partir da ligação do Pb^{2+} com os grupos sufidrilas (–SH) do domínio catalítico dessa enzima; e pela capacidade do Pb^{2+} de competir com outros íons metálicos, como Mg, que também são essenciais na biossíntese desse pigmento (HOU et al., 2007; SHARMA, DUBEY, 2011; ALI et al., 2016).

Além disso, Pb^{2+} também pode atuar na redução dos teores dos pigmentos fotossintéticos pela tendência em se acumular nos cloroplasto, resultando na geração de EROs que causam danos as membranas dos tilacoides (ZHOU et al., 2017). Os cloroplasto e mitocôndrias são os locais preferenciais para a geração de EROs devido à presença de sistemas de transporte de elétrons dentro dessas organelas Corroborando com o descrito na literatura, os dados proteômicas apresentaram acentuada inibição nas proteínas de membrana dos cloroplastos, destacando-se as metaloprotease intramembranares (spot 3 e 33) que foram 4,3 vezes mais inibidas no tratamento com 300 mM, demonstrando o potencial oxidativo promovido pelos altos índices intracelulares de EROs.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DO BIOACÚMULO DE Pb^{2+}

As populações clonais de *L. aequinoctialis* M1 comprovaram ser eficientes bioacumuladoras de Pb^{2+}, demonstrando seu potencial em fitorremediar elevadas concentrações desse metal (8570 $mg.kgPS^{-1}$) nas condições experimentais as quais foram submetidas, apesar desse acúmulo estar associado a déficits nas taxas de crescimento e teores de pigmentos fotossintéticos do clone em questão.

Diversos estudos relacionados a capacidade de bioacúmulo de metais pesados nas lentihas-d´água já foram realizados, estes utilizando diferentes gêneros e espécies de lentilhas-d´água em distintas condições experimentais (UYSAL, TARNER, 2009; SINGH, TIWARI, GUPTA, 2012; VERMA, SUTHAR, 2015; PUTRA, CAYANA, NOVARITA, 2015; HEGAZY et al., 2017; DAUD et al., 2018; VELICHKOVA, 2019), indicando forte influência da temperatura, pH, concentração inicial e tempo de exposição ao metal no capacidade das lentilhas-d´água em fitorremediar esses elementos.

Especificamente em relação ao Pb^{2+}, Uysal, Turner (2009), Singh, Gupta, Tiwari (2012) e Verma, Surthar (2015) demonstraram que *L. gibba* e *L. minor* possuem maior capacidade de remoção do Pb^{2+} em condições de cultivo contendo pH variando entre 4.5 – 7 (neutro), temperaturas entre 28 – 30ºC, concentração de Pb^{2+} entre 5 - 50 $mg.L^{-1}$ e tempos de exposição ao metal de 10 – 12 dia refletindo assim um acúmulo máximo de 8.622 $mgPb.kg^{-1}$ em *L. minor* e 8.234 $mgPb.kg^{-1}$ em *L. gibba*.

Entretanto os valores referentes ao BFC, cálculo que revela a capacidade da planta em acumular metais em relação à concentração de metal no substrato (ZAYED et al., 1998), foi baixo (85,7). O valor do BFC é inversamente proporcional a concentração de metal presente no meio. Esse resultado indica que o clone M1 de *L. aequinoctialis* possa ter melhor performance no acúmulo de Pb se propagado em concentrações menores desse metal, como demonstra Hegazy et al. (2015) e Bokhari et al. (2015), indicando BFCs de 370 e 570 respectivamentes em condições experimentais utilizando concentrações de 10 $mg.L^{-1}$ de Pb^{2+}.

Associado ao acúmulo de chumbo, a análise proteômica diferencial revela aumento significativo de metalotioneínas nas populações clonais submetidas ao tratamento com 300 mM indicando um dos prováveis mecanismos utilizados para tolerar altos níveis intracelulares de Pb.

5.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

A análise do proteoma diferencial revela que várias proteínas foram responsivas ao tratamento com 300 mM $Pb(NO_3)_2$, demonstrando a plasticidade do proteoma de *L. aequinoctialis* clone M1 em se modificar, buscando promover sua adaptação a condição/meio de cultivo. A maioria das proteínas identificadas são oriundas dos cloroplastos, núcleo e citoplasma, sugerindo maior relevância desses compartimentos subcelulares na modulação da resposta das populações clonais ao estresse por Pb^{2+}.

5.4.1 Cloroplasto

Controle

Dentre as proteínas cloroplastidiais reguladas negativamente no estresse, destacaram-se por sua elevada inibição no tratamento com 300 mM, as metaloprotease de membrana (spots 3 e 151). Essas metaloproteases são presentes na membrana interna dos cloroplastos e estão envolvidas na proteólise intramembranar regulada (PIR), mecanismo fundamental no desenvolvimento e controle de funções essenciais executadas por essa organela, como a fotossíntese, biossíntese de ácidos graxos e aminoácidos, atuando assim também diretamente no desenvolvimento geral da planta (BOLTER et al., 2006, CHEN et al., 2011). A inibição dessas proteínas sob estresse, sendo 4,1 vezes (spot 3) e 2,2 vezes (spot 151) menos abundantes em relação a condição de cultivo com 300 mM, reflete o potencial de degradação das membranas e proteínas intramembranares dos cloroplastos devido ao estresse oxidativo (SHAPIGUZOV et al., 2019). Lopes et al., (2018) descreveram efeito similar na inibição de um tipo de protease presente na membrana dos tilacoides de *A. thaliana* frente a diferentes tipos de estresses abióticos.

Parte da maquinaria de transcrição e síntese proteica dos cloroplastos também foi afetada negativamente diante do estresse. As proteínas identificadas que fazem parte dessa maquinaria compreendem a RNA polimerase (rpoB) (spot 292) e proteínas que constituem a subunidade maior (50S) (spot 163) e subunidade menor (30S) (spot 365) dos ribossomos cloroplastidiais. Yu et al. (2012) verificou a inibição da proteína ribossomal cloroplastidial S1 (RPS1) de *A. thaliana* frente a estresse térmico, indicando que determinados fatores ambientes podem inibir a síntese de proteínas ribossomais. Tardini et al. (2012) cita que diante de situações de estresse,

o cloroplasto tende a direcionar seu gasto energético em mecanismos que mantém integridade dos fotossistemas. Desse modo, sugere-se que o cloroplasto está desviando energia de funções básicas como transcrição e síntese de proteínas que demandam grande gasto energético para garantir o funcionamento normal dos fotossistemas durante o período de estresse.

Estresse

Dentre as proteínas cloroplastidiais responsivas no estresse, a maturase K (matK) (spot 189) é uma proteína plastidial responsável pelo *splicing* dos introns do grupo II e assim atua no processamento pós-transcricional do genoma cloroplastidial, regulando vários genes relacionados ao funcionamento do cloroplasto, principalmente a fotossíntese (UDENSI et al., 2017). Análises proteômicas identificaram o matK como proteína responsiva ao estresse salino em *L. aequinoctialis* (MORAIS, 2017) e *Arachis duranensis* (CARMO et al., 2019) indicando uma possível participação da matK na tolerância dessas espécies frente ao estresse salino (e aos estresses associados a este, como o estresse oxidativo e osmótico).

As proteínas transportadoras ADP, ATP (spot 190) são transportadores de membrana presentes no tilacoides envolvidas no fluxo ativo do transporte ATP entre o estroma e o citosol (RUPRECHT, 2019). Alguns estudos relatam a regulação positiva desses transportadores diante de estresses ambientais, os quais estão associados a proteção do fotossistema II. Além disso, possuem papel fisiológico essencial durante a biogênese e renovação dos tilacoides (YIN et al., 2010).

A proteína executora 2 (E2) (spot 209) é uma proteína que permite que as plantas superiores percebam a EROs como um sinal de estresse oxidativo no plastídeo, ativando assim um programa nuclear de resposta nuclear que desencadeia a morte celular programada (PCD). Essa transferência de sinais induzidos por EROs que vão do plastídeo para o núcleo e desencadeia a via PCD é exclusiva dos eucariotos fotossintéticos e opera sob condições de estresse moderado, impedindo o fotossistema II (PSII) sem causar danos fotoxidativos na planta (LEE et al., 2007; WANG et al., 2014).

5.4.2 Núcleo

Controle

As proteínas presente no núcleo que foram inibidas diante do estresse por Pb^{2+} estão associadas a regulação da expressão gênica e são categorizadas em fatores de transcrição, ribonucleoproteínas e proteínas associadas a acetilação do DNA. Dentre estas, os fatores de transcrição responsivos ao etileno (TOE2) (spot 63) foi 1,5 vezes menos acumuladas no controle em relação a condição estresse. KLAY et al., (2014) demonstraram a regulação negativa desses fatores de transcrição em tomates cultivados sob estresse salino, e sugerem que a regulação do TOE2 pode ser positiva ou negativa dependendo da intensidade e do tempo de duração do estresse.

Os fatores de transcrição REM com domínio de ligação B3 (REM-B3) (spot 329), são proteínas que desempenham papel central na regulação do ciclo de vida da planta desde a embriogênese da semente até o desenvolvimento a fase adulta, também foram regulados negativamente diante do estresse. A modulação do REM-B3 diante dos estresses abióticos ainda não está totalmente caracterizada (MANTEGAZZA et al., 2018).

As ribonucleoproteínas nucleares de 70 KDa U1 (U1-70KD) (spot 377), exclusivas do controle, são uma das três proteínas específicas do conjunto do spliceossomo snRNP U1, que atuam no splicing alternativo de pré-mRNAs nucleares. Amorim et al. (2018) destacam que o conjunto snRNP U1 é essencial para o desenvolvimento da planta e que a regulação negativa dos constituintes desse sistema prejudicam a funcionalidade do snRNP U1, afetando o splicing alternativo e consequentemente a formação do RNAm maduro. Golovkin e Reddy (1996) descreveram que a repressão do processamento do RNAm, ou seja, da atividade da snRNP U1, pode ser um provável mecanismo de sinalização de estresse nas plantas.

As histonas aciltransferases (GCN5) (spot 305) são transferases que atuam na modificações das histonas, sendo um dos principais mecanismos epigenéticos que regulam a expressão gênica e o crescimento e desenvolvimento das plantas (KOTAK et al., 2018). Hu et al. (2015) descrevem que determinados estresses abióticos podem ocasionar a perda da função da GCN5 de *Arabidopsis*, prejudicando consideravelmente a ativação transcricional de genes responsivos a esses estresses.

Estresse

Dentre as proteínas reguladas positivamente no tratamento com 300 mM, destacou-se pelo seu elevado acúmulo (2,2 vezes), a proteína supressora de silênciamento gênico 3 (SGS3) (spot 144). Essa proteína está envolvida no silênciamento gênico pós-transcricional (SGPT), elaborado mecanismo de regulação de microRNAs (miRNA) (LI, WANG, ZHOU, 2017). Inicialmente este era conhecido como um mecanismo de defesa contra a infecção por patôgenos virais em plantas, porém estudos mais recentes demonstram a importância do SGPT na mediação de respostas adaptativa ao estresses abióticos (PEGLER et al., 2019). Diferentes classes de miRNAs já foram descritos como responsivos a metais pesados. Estudos apontam que a maioria dos alvos dos miRNA responsivos ao Cd, Al, Hg, Cr, Mg estão relacionados a fatores de transcrição, que por sua vez, regulam genes que estão associados a processos celulares de detoxificação de metais, como a biossíntese de glutationa, fitoquelatinas e metalotioneinas (GUPTA, SHARMA, 2013; NOMAN et al., 2017; GONG et al., 2019).

As endonucleases de junção Holliday (spot 196) contituem um complexo de endonucleases (MUS81-EMEB1) específicas do DNA. São enzimas necessárias na mitose, atuando na correção de forquilhas de replicação não funcionais, e desempenham um papel no reparo do DNA e na recombinação homóloga induzida por estresse genotóxico em células somáticas. Essas endocluneases são essenciais na manutenção da integridade dos cromossomos de vários organismos diante da genotoxicidade induzida por estresse oxidativo (GEUTING et al., 2009).

Os transposon (TE) (spot 71 e 191) representam um grupo de elementos genéticos móveis capazes de “saltar” dentro de diferentes regiões do genoma. Geralmente essa atividade é considerada deleteria e pode resultar em alelos mutantes, alterando a estrutura de ORFs, afetando negativamente a função do gene (TÜFEKÇİ, İNAL, 2019). Porém, determinados grupos de TEs podem ser “ativados” quando a planta está em situação de estresse. Pesquisas indicam o potencial do TE na regulação da expressão gênica, e desse modo os elementos móveis desempenham importante papel nas respostas das plantas a estresses ambientais pois genes próximos a inserção dos TEs podem ter aumentos nos seus níveis transcricionais. Assim genes responsivos a determinados estresses ambientais podem ter aumentos nos seus níveis transcricionais (MAKAREVICH et al., 2015).

5.4.3 Citoplasma

Controle

Dentre as proteínas das citoplasmáticas que foram inibidas na tratamento com Pb^{2+} estão presentes proteínas de interação proteína-proteína e proteínas que possuem atividade nucleosidica. A proteína de repetição de tetratricopeptídeo (TPR) (spot 306) consiste em pequenos peptídeos de 34 aminoácidos que forma diversas estruturas para mediar as interações proteína-proteína e consequentemente a montagem de complexos multiproteicos que regulam diversas funções celulares (SHARMA, PANDEY, 2016).

Outra proteína que realiza função similar a TRP é a proteína 14-3-3 (spot 33). Essas proteínas são componentes essenciais nas vias de transdução de sinais e estão relacionados a multiplos processos biológicos através da mediação de interações proteína-proteína, possuindo a capacidade de ligar-se a proteínas de sinalização funcionalmente diversas, incluindo quinases, fosfatases e receptores transmembranares (KELLER, RADWAN, 2019). A inibição do TRP e da 14-3-3 no tratamento com 300 mM sugere uma possível degradação dessas proteínas devido ao estresse oxidativo (DUMONT, RIVOAL, 2019).

As nucleotidases 3 '(2'), 5'-bifosfato (spot 310) são enzimas que pertence à família das hidrolases , especificamente aquelas que atuam nas ligações monoéster fosfóricas, realizando a quebra da adenosina 3',5'-bisfosfato (PAP) em adenosina monofosfato (PARK et al., 2012). Kruse et al. (2007) relatam que essa proteína é regulada positivamente diante estresses bióticos, porém sua função frente aos estresses abióticos ainda não é bem descrita.

Estresse

As quinase citoplasmática de ligação à calmodulina (CRCK) (spot 57) também apresentaram regulação positiva diante do estresse, sendo 1,6 vezes mais abundante em relação ao tratamento controle. A CRCK faz parte de um grupo de proteínas de ligação a calmodulina (CaMBPs) que interage como o complexo calmodulina – Ca^{2+}(CaM- Ca^{2+}). Como é descrito na literatura, o CaM - Ca^{2+}é um dos principais sinalizadores intracelulares que modulam as respostas iniciais aos estresses ambientais (ZENG et al., 2015). Cada grupo de CaMBPs é responsivo a determinados estímulos ambientais, e assim são capazes de modular respostas específicas para

cada um desses estímulos. Desse modo, a modulação da resposta ao estresse irá variar dependo da CaMBPs que irá se ligar ao complexo CaM - Ca^{2+} (VIRDI, SINGH, SINGH, 2015). No contexto do estresse por metais pesados, a CRCK é responsiva a altos níveis intracelulares de H_2O_2. A CRCK atua modulando os níveis de expressão de genes relacionados a síntese de enzimas antioxidante (YANG et al., 2004).

Também participando da sinalização intracelular, as proteínas LRR intracelulares Ras (PIRL) (spot 46) foram 1,5 vezes mais abundantes sob estresse. Essas proteínas são estruturalmente ricas em repetições de leucina e estão envolvidas na transdução de sinais (FORSTHOEFEL et al., 2013). Estudo em *A. thaliana* demonstra que a tolerância ao Pb^{2+} mediada por PIRL está associada a regulação positiva na expressão do gene AtPDR12, um transportador cassete de ligação ao ATP conhecido pela sua atividade remoção do Pb^{2+} intracelular (ZHU et al., 2013).

A ubiquitina-proteína ligase E3 (spot 376) é uma proteína que está envolvida na via ubiquitinação realizando modificação pós-traducionais em proteínas bem como a degradação das mesmas no complexo proteossoma-ubiquitina 26S. Estudos demonstraram que a ubiquitinação das proteínas desempenham papéis importantes em vários estágios de desenvolvimento das plantas (por exemplo, dormência e germinação das sementes, crescimento radicular, controle do tempo de floração e desenvolvimento de cloroplasto) (SHU, YANG, 2017; SERRANO, CAMPOS, RIVAS, 2018). Vários estudos indicam a participação da E3 diante de várias respostas o estresse abióticas, regulando a abundância, atividades ou localizações subcelulares de uma variedade de polipeptídeos e enzimas reguladores. (DUMONT, RIVOAL, 2019).

Associada a ubiquitina-proteína ligase E3, a subfamíia de proteínas de reptição Kelch/F-Box (spot 185) estão envolvidas no complexo proteossomo-ubiquitina 26S, desempenhando funções relacionadas a degradação seletiva e específica de proteínas (HASSAM, ZAINAL, ISMAIL, 2015). Song et al., (2015), demonstraram que as proteínas F-Box/Kelch desempenham papéis críticos na regulação e modulação de respostas relacionadas a detoxificação de metais pesados em *Medica trunculata* .

A glutarredoxina (Grx) (spot 209) é uma pequena enzima redox que está associada ao metabolismo da glutationa. Essa proteína atua de maneira não enzimática reduzindo a glutationa e causando assim sua oxidação. A glutationa oxidada é então regenerada pela glutationa redutase e volta a ser funcional. Juntos,

estes componentes dão forma ao sistema da glutationa (YADAV, 2010). A Grx é uma das peças centrais que participam do sistema da glutationa, que por sua vez está relacionado ao sistema antioxidante e ao sistema de detoxificação de metal pesado da célula vegetal (NOCTOR et al., 2018). Diversos estudos transcriptômicos e proteômicos já analisaram a resposta sinérgica da expressão e acúmulo da Grx diante de estresse por metais pesados em diversas espécies de plantas (CHAKRABARTY et al., 2009; VERMA et al., 2017; TIWARY, LATA, 2018).

As metalioneínas (MTs) (spot 217) contituem uma família de proteínas de baixo peso molecular que possuem domínio de ligação a metal rico em cisteína. As MTs estão diretamente relacionadas ao controle das concentrações intracelulares de íons metálicos, participando ativamente na detoxificação desses elementos. Além disso, as MTs também atuam como um mecanismo não enzimático de ação antioxidante, demonstrando a importância dessa proteína no contexto da tolerância aos metais pesados (SINGH et al., 2016.; SHARMA et al., 2016; HASSAN et al., 2017).

5.4.4 Membrana plasmática

Controle

A superfamília de proteínas RAS (RIC1) (spot 147) engloba uma família de GTPase aderidas a parte citosólica da membrana plasmática, conservada em todos os eucariotos, que regulam ampla gama de funções celulares, como proliferação celular, diferenciação, organização citoesquelética e apoptose (HOLSTEIN, HOHL, 2003).

As ATPases de prótons do tipo V (V-ATPase) (spot 247) são canais de transporte ativo (bombas) presentes na membrana plasmática e em quase toda extensão do sistemas de endomembranas, constiuindo a via secretoras das célula vegetais. A V-ATPase-H^+, em relação a outras canais de transporte ativo, são as mais presentes na membranas, sendo indispensáveis para o crescimento das plantas em condições normais, devido ao seu papel na energização do transporte secundário e manutenção da homeostase do soluto (MORTH et al., 2011). A inibição da V-ATPase no tratamento com 300 mM de Pb^{2+} indica possível degradação dessas proteínas devido ao estresse oxidativo (DUMONT, RIVOAL, 2019).

Estresse

Associada indiretamente a sinalização intracelular, os canais de cálcio (spot 39) foram 1,5 vezes mais acúmulados no tratamento com 300mM. A superexpressão desses canais provavelmente está associada ao aumento do Ca^{2+} livre intracelular que atua como segundo mensageiro na sinalização de respostas ao estresse por metais pesados, regulando assim as expressões dos genes envolvidos no transporte e detoxificação desses elementos (DUTTA et al., 2018, JALMI et al., 2018). Alguns estudos realizados em diferentes espécies de plantas, como grão de bico, *Glycine max*, *Vitis vinifera* e *Solanum lycopersicum*, destacaram que altos níveis intracelulares de Ca^{2+} resultaram na tolerância aumentada desses cultivares aos metais pesados (LI ZY et al., 2012; DE LA TORRE et al., 2013, AHMAD, 2016). Ahmad et al (2016) também demonstram que elevados níveis intracelulares de Ca^{2+} possuem efeitos sinérgicos na atividade de enzimas do sistema antioxidante, como a APX, GR e SOD.

5.4.5 Mitocôndria

Controle

O formyltetra-hidrofolato deformilase 1 (PURU1) (spot 179) é uma deformilase envolvida na fotorrespiração. Essa enzima desempenha função de evitar o acúmulo excessivo de 5-formil tetra-hidrofolato (THF), um potente inibidor do complexo Gly descarboxilase / Ser hidroximetiltransferase, que causa prejuízos no desenvolvimento e crescimento das plantas (COLLAKOVA et al., 2008). A inibição dessa enzima, as quais foram cerca de 1,7 vezes menos acumuladas na condição estresse, pode estar relacionado com o descréscimo nas taxas de crescimento das populações clonais sob estresse.

Estresse

A dihidrorotato desidrogenase (DHODH) (spot 207) é uma enzima que faz parte do metabolismo da pirimidina e catalisa a oxidação do dihidrotato (DHO) para orotato (OA), sendo este o 1º passo para a biossíntese da UMP (Piridina 5′-monofosfatase). A UMP é um precursor para a formação de outros nucleotídeos de pirimidina e estão envolvidos na biossíntese de DNA e RNA, no metabolismo energético e nos processos de síntese de muitos produtos biossintéticos (GEIGENBERGUER et al., 2005). Alguns estudos identificaram a resposta dessa proteína na tolerância ao

estresse salino em arroz (RABANNI et al., 2003; LIU et al., 2009) e recentemente verificou-se que a DHODH está indiretamente envolvida no desenvolvimento dos cloroplastos (DONG et al., 2019).

5.4.6 Retículo endoplasmático

Controle

As proteínas contendo domínio de dioxigenase Fe^{2+}/2OG (2-ODD) (spot 90) também tiveram acentuada inibição (2,8 vezes) na condição estresse. Essas enzimas estão envolvidas em diversos processos metabólicos como metilação de histonas, modificações pós-traducionais, reparo do DNA, biossíntese e catabolismo de fitohormônios como ácido abscísico, giberelinas e etileno e também de metabólitos secundários, principalmente flavonóides e alcalóides (FARROW, FACCHINI, 2014).

O citocromo B5 (spot 248) é uma oxidoredutase fundamental para o metabolismo celular. Nas plantas, o papel principal do sistema de transferência de elétrons do citocromo b5 é fornecer uma molécula redutora para a síntese dos ácidos graxos poliinsaturados ácido linoléico (18:2) e ácido α-linolênico (18: 3), que são parte constituintes das membranas celulares (WAYNE et al., 2012).

5.4.7 Complexo de Golgi

Controle

A celulose síntase D6 (CSD6) (Spot 180) compreende um grupo de glicosiltransferases responsáveis pela biossíntese dos polissacarídeos presentes na parede celular das células vegetais como celulose e hemicelulose. A variante D6, localizada no complexo de Golgi, polimeriza os polissacarídeos não celulosicos (hemiceluloses) da parede celular da planta (ZHU et al., 2010). A CSD6 foi inibida 1,7 vezes na condição estresse.

5.4.8 Citoesqueleto

Controle

A cinesina 14M (KIN-14M) (spot 171) é uma proteína motora acionada por ATP que desempenha papéis fisiológicos importantes no transporte intracelular, mitose e

meiose, controle da dinâmica dos microtúbulos, morfogênese celular e transdução de sinal (UMEKI et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho leva à observação de que, nas condições experimentais, *L.aequinoctialis* clone M1 pode ser útil no processo de fitorremediação do Pb^{2+}. Apesar da toxicidade causada por esse metal reduzir as taxas de crescimento e teores de pigmentos fotossintéticos da população clonal submetida a concentrações de 300 mM $Pb(NO_3)_2$, esta manteve-se viável até o final do período experimental, mesmo bioacumulando elevadas concentrações de Pb^{2+}.

A manutenção do crescimento das populações clonais sob estresse moderado demonstra a plasticidade do proteoma de *L. aequinoctialis* em se modificar para adaptar-se às condições/meios de cultivo, regulando rigorosamente a expressão de genes de resposta, na tentativa de tolerar o estresse e ajustar a homeostase celular.

Dentre as proteínas identificadas, as endonucleases de recombinação homóloga, metalotioneínas e glutaredoxinas se revelaram como promissoras para desenvolvimento de potenciais biomarcadores moleculares funcionais para a identificação de clones de lentilhas-d´água tolerantes ao estresse por Pb^{2+}.

Novos bioensaios deverão ser realizados em diferentes condições experimentais para validação dos dados proteômicos. Além disso, esses novos bioensaios poderão corroborar com os resultados obtidos neste trabalho, ratificando assim o clone M1 como um potencial fitorremediador de Pb, o qual futuramente poderá ser aplicado em estratégias de recuperação de corpos hídricos contaminadas com Pb^{2+}.

REFERÊNCIAS

AHMAD, P. et al. Calcium and Potassium Supplementation Enhanced Growth, Osmolyte Secondary Metabolite Production, and Enzymatic Antioxidant Machinery in Cadmium-Exposed Chickpea (Cicer arietinum L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016

ALI, G. M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. **Proteome Resolution**, v. 5, p. 396-403, 2006.

ALI, H.; KHAN, E.; ILAHI, I. Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. **Journal of Chemistry**, v. 29, p. 14-20, 2019.

ALI, Z. et al. Duckweed: an efficient hyperaccumulator of heavy metals in water bodies. **Plant Metal Interaction**, p. 411-429, 2016.

ALLOWAY, B.J. Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and Their Bioavailability. **Environmental Pollution**, v. 22, p. 11-50.

AMORIM, M. F. et al. The U1 snRNP Subunit LUC7 Modulates Plant Development and Stress Responses via Regulation of Alternative Splicing. **Plant Cell**, v. 30, n. 11, p. 2838-2854, 2018.

APPENROTH, K. J. et al. Effects of Nickel on the Chloroplasts of the Duckweeds Spirodela polyrhiza and Lemna minor and Their Possible Use in Biomonitoring and Phytoremediation. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 216-23, 2009

ATRSD. Agency for toxic substances and disease registry. Disponível em: https://www.atsdr.cdc.gov/. Acesso em: 9 agost. 2019.

BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

BARBOSA-NETO, A. G. Análise proteômica de Lemnaceae associada à produção de biomassa e bioenergia. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

BARBOSA-NETO, A. G. et al. Biological diversity of Lemna aequinoctialis Welw. isolates influence biomass production and wastewater phytoremediation. Bioresource Technology Reports, v. 6, p. 251–259, 1 jun. 2019. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.03.011

BASSI, R. et al. Changes in Proline Content Accompanying the Uptake of Zinc and Copper by Lemna minor. **Annals of Botany**, v. 72, n. 2, p. 151-154, 1993.

BAZANOV, V. A. et al. The phytoindication method for mapping peatlands in the taiga zone of the west-siberian plain. **International Journal of Environmental Studies**, v. 66, n. 4, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Disponível em:

http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646. Acesso em: 9 agost. 2019.

BANKS, R. E. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. **Lancet**, n. 356, 2000.

BEZERRA, M. G.; FRANÇA, F. Arales de lagoa em uma área do semi-árido baiano. **Sitientibus**, v. 20, p. 45-54, 1999.

BEJARANO, J. R. C. Lenteja de água para el tratamiento de agues residuárias. Fatores que afetam su crescimiento. Facultad de Ingeniaria. Universidade del Valle, Calli-Colômbia, 1998.

BOKHARI, S. H. et al. Phytoremediation potential of Lemna minor L. for heavy metals. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, n. 1, 2015.

BOLTER, B. et al. A chloroplastic inner envelope membrane protease is essential for plant development. **FEBS Letters**, v. 580, n. 3, p. 789-794.

BOG, M. et al. Genetic structure of the genus Lemna L. (Lemnaceae) as revealed by amplified fragment length polymorphism. **Plant**, v. 232, p. 609-619, 2010.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quatities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**; v. 7, p. 2248-2254, 1976.

BRAIN, R. A.; SOLOMON, K. R. A protocol for conducting 7-day daily renewal tests with Lemna gibba. **Nat Protoc**, v. 2, n. 4, p. 979-8, 2007.

BREKHOVSKIKH, Z. V. et al. Heavy Metals in Bottom Sediment in the Upper and Lower Volga. **Water Resources**, v. 29, n. 5, p. 539–547, 2002.

BUCKER-NETO, L. et al. Interactions between plant hormones and heavy metals responses. **Genet. Mol. Biol**, v. 40, n. 1, 2017.

CALICIOGLU, O.; BRENNAN, R.A. Sequential ethanol fermentation and anaerobic digestion increases bioenergy yields from duckweed. **Bioresource Technolnology**, v. 257, p. 344-348, 2018.

CARMO, T.S.L. et al. Comparative proteomics and gene expression analysis in *Arachis duranensis* reveal stress response proteins associated to drought tolerance. **Journal of Proteomics**, v. 192, p. 299-310.

CENKCI, S. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in Brassica rapa. L. **Environ. Exp. Bot**. v. 67, p. 467-473, 2010.

CHAKRABARTY, D. et al. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. **Chemosphere**, v.74, p.688–702, 2009.

CHURCH, B. G. et al. Updated species sensitivity distribution evaluations for acute and chronic lead toxicity to saltwater aquatic life. **Environ Toxicol Chem**, 2017.

CHEN, Q. et al. Research on fractal model of normal contact stiffness between two spheroidal joint sZHAIurfaces considering friction factor. **Tribology International**, v. 97, p. 253-264, 2016.

CHEN, G. et al. EGY2, a chloroplast membrane metalloprotease, plays a role in hypocotyl elongation in Arabidopsis. **Molecular Biology Reports**, n. 39, p. 2147-2155, 2012.
COLAKOVA, E. et al. Arabidopsis 10-formyl tetrahydrofolate deformylases are essential for photorespiration. **Plant Cell**, v. 20, p. 1818-1832, 2008.

CULEN, J. T.; MCALISTER, J. Biogeochemistry of Lead. Its Release to the Environment and Chemical Speciation. **Metal ions in life sciences**, 2017.

DAUD, K. et al. Potential of Duckweed (Lemna minor) for the Phytoremediation of Landfill Leachate. **Journal of Chemistry**, p. 2-9, 2018.

DALCORSO, G. et al. An overview of heavy metal challenge in plants: From roots to shoots. **Metallomics**, v. 5, n. 9, 2013.

DE LA TORRE, F. et al. Tomato Calcium Sensor Cbl10 and Its Interacting Protein Kinase Cipk6 Define a Signaling Pathway in Plant Immunity. **Plant Cell**, v. 25, n. 7, p. 2748–2764.

DE SOUZA, L. A. et al. Tolerância e potencial fitorremediador de Stizolobium aterrimum associada ao fungo micorrízico arbuscular Glomus etunicatum em solo contaminado por chumbo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1441, 2011.

DIRILGEN, N. Mercury and lead: Assessing the toxic effects on growth and metal accumulation by Lemna minor. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 48-54, 2011.

DUMONT, S.; RIVOAL, J.; Consequences of Oxidative Stress on Plant Glycolytic and Respiratory Metabolism. **Frontiers in Plant Sciences**, 2019.

DUTTA, S. Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. **Plant signaling & behavior**, n. 13, v. 6, p. 1-49, 2018.

DONG, Q. et al. UMP Kinase Regulates Chloroplast Development and Cold Response in Rice. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, 2019.

DONGALAR, Z. B. Metal accumulation and physiological responses induced by copper and cadmium in Lemna gibba, L. minor and Spirodela polyrhiza. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 25, n. 2, p. 79-88, 2017.

FAN, T. et al. The PSE1 gene modulates lead tolerance in Arabidopsis. **J. Exp. Bot,** v.67, p. 4685-4695, 2016.

FERREIRA, T. C. R. Macrófitas aquáticas na remoção de microcistinas. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto, 2009.

EMMAVERDIAN, A. Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. **The Scientific World Journal**, v. 15, 2015.

ENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (Eichhornia crassipes, Pistia stratiotes e Salvinia molesta) utilizadas no tratamento de efluentes de aqüicultura. **Acta Sci**, v. 24, n. 2, p. 519-526, 2002.

ESTEVES, B.S.; SUZUKI, M.S. 2008. Typha domingensis Pers. subject to interactions among water level and fire event in a tropical lagoon. **Acta Limnol. Brasil**. v. 20, p. 227-234. 2008.

FARROW, S. C.; FACCHINI, P. J. Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. **Frontiers in Plant Science**, 2014.

FORSTHOEFE, N. R. et al. The Arabidopsis Plant Intracellular Ras-group LRR (PIRL) Family and the Value of Reverse Genetic Analysis for Identifying Genes that Function in Gametophyte Development. **Plants**, n. 2, v. 3, 2013.

FOYER, C. H.; NOCTOR.; G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 2-18, 2011.

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, p. 134-142, 2018.

FU, F.; WANG, Q. Removal of Heavy Metal Ions from Wastewaters: A Review. Journal of Environmental Management, v. 92, n. 3, p. 407-418, 2011.

GEIGENBERGER, P. Inhibition of de novo pyrimidine synthesis in growing potato tubers leads to a compensatory stimulation of the pyrimidine salvage pathway and a subsequent increase in biosynthetic performance. **Plant Cell**, v. 17, p. 2077-2088, 2005.

GEUTING, V. et al. Two Distinct MUS81-EME1 Complexes from Arabidopsis Process Holliday Junctions. **Genetics, Genomics and Molecular Evolution**, v. 150, p. 1062–1071, 2009.

GONTIJO, E. S. J.; MONTEIRO, A. S. C.; ROSA, A. H. Especiação de Metais e Metaloides em Ambientes Aquáticos: Conceitos, Técnicas e Aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 5, p. 1910-1929, 2017.

GRAEFF, A. et al. Avaliação do potencial nutritivo da Macrófta aquática Lemna minor, por meio da análise da composição química e por sua utilização em ração para carpa comum (Cyprinus carpio L.) na fase de recria. **Evidência, Joaçaba**, v. 7, n. 1, p. 37-50, 2007.

GROSSMANN, J. A workflow to increase the detection rate of proteins from unsequenced organisms in high-throughput proteomics experiments. **Proteomics**, v.7, 2007.

GUIMARÃES, M. D. A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, p. 56-66, 2008.

GUPTA, K. et al. Hydrogen Peroxide and Polyamines Act as Double Edged Swords in Plant Abiotic Stress Responses. **Frontiers in Plant Sciences**, v.7, n.1343, 2016.

HARKESS, A. et al. A new *Spirodela polyrhiza* genome and proteome reveal a conserved chromosomal structure with high abundances of proteins favoring energy production. **BioRxiv**, 2020.

HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. Exogenous Sodium Nitroprusside Alleviates Arsenic-Induced Oxidative Stress in Wheat (Triticum aestivum L.) Seedlings by Enhancing Antioxidant Defense and Glyoxalase System**. Ecotoxicology**, v. 22, p.584-596, 2013.

HASANUZZAMAN, M. et al. Exogenous silicon attenuate cadmium-induced oxidative stress in Brassica napus L. by modulating AsA-GSH pathway and glyoxalase system. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p. 1061–1069, 2017.

HASEGAWA, P.M. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual **Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 463-499.

HATTAB, S. et al. Characterization of lead-induced stress molecular biomarkers in Medicago sativa plants. **Environmental and Experimental Botany**, n. 123, p. 1–12, 2016.

HALL J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, 2002.

HASSAN, U. N. M.; ZAINAL, Z.; ISMAIL, I. Plant kelch containing F-box proteins: Structure, evolution, and functions. **RSC Advances**, v. 5, n. 53, p. 42808-42814, 2015;

HASSAN, K. M. et al. Responses of Plant Proteins to Heavy Metal Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-16, 2017

HEGEL, C. G. Z.; MELO, E. F. R. Q. Macrófitas aquáticas como bioindicadores da qualidade da água dos arroios da RPPN maragato. **Rev. Agro. Amb**., v. 9, n. 3, p. 673-693, 2016.

HERNÁNDEZ, I. et al. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? **Trends Plant Sci**, v. 14, p. 125–132, 2009.

HESAMI, R. et al. Lead, zinc, and cadmium uptake, accumulation, and phytoremediation by plants growing around Tang-e Douzan lead–zinc mine, Iran. **Environ. Sci. Pollut. Res**, v. 9, p. 8701-8714 2018.

HOANG, P. T. N. et al. Variation in genome size, cell and nucleus volume, chromosome number and rDNA loci among duckweeds. **Nature Scientifics Reports**, v. 9, n. 3234, 2019.

HOLSTEIN, S. A. HOHL, R. J. Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. **Journal of Lipid Research**, n. 44, v. 6, 2003.

HUANG, M. et al. Proteomic analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (Landoltia punctata) under nutrient starvation. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p.299-308, 2014.

HUANG, M. et al. Using proteomic analysis to investigate uniconazole-induced phytohormone variation and starch accumulation in duckweed (Landoltia punctata). **BMC Biotechnology**, n. 15, v. 1, 2015.

ILA. INTERNATIONAL LEAD ASSOCIATION. Lead in aquatic environments. Disponível em: https://www.ila-lead.org/UserFiles/File/Aquatic_Environment_Report_v6_hi%20res.pdf. Acesso em: 09. Agost. 2019.

JAYASRI, M. A.; SUTHINDHIRAN, S. Effect of zinc and lead on the physiological and biochemical properties of aquatic plant Lemna minor: its potential role in phytoremediation. **Applied Water Science**, v. 7, p.1247–1253, 2017.

JIANG, L. et al. A role for APX1 gene in lead tolerance in Arabidopsis thaliana. **Plant Sciences**, n. 256, p. 94–102, 2017.

JOHN, R. et al. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters, and uptake in Lemna polyrrhiza L. **Plant Soil Environment**, v. 54, n. 6, p. 262–270, 2008.

KAUR, G. Lead (Pb)-induced biochemical and ultrastructural changes in wheat (Triticum aestivum) roots. **Protoplasma**. v. 250, p. 53–62, 2013.

KELLER, C.; RADWAN, O.; The functional role of 14-3-3 proteins in plant-stress interactions. **i-ACES**, v. 1, n. 2, 2015.

KHAN, M. I. R. et al. elenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 173, n. 9-18, 2015.

KHAN, M. M. et al. Pb induced phytotoxicity in para grass (Brachiaria mutica) and castor bean (Ricinus communis L.): antioxidant and ultrastructural studies. **Chemosphere**, v. 200, p. 257–265, 2018.

KHELLAF, N.; ZERDAOUI, M. Development of a kinetic model for the removal of zinc using the aquatic macrophyte, Lemna gibba L. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 5, p. 953-957, 2012.

KIRAN, B. R.; PRASAD, M. N. V. Responses of Ricinus communis L. (castor bean, phytoremediation crop) seedlings to lead (Pb) toxicity in hydroponics. **Agricultural Food Sciences,** v. 31, p. 73–80, 2017.

KLAY, I et al. Ethylene Response Factor Sl-ERF.B.3 Is Responsive to Abiotic Stresses and Mediates Salt and Cold Stress Response Regulation in Tomato. **The Scientific World Journal**, p. 1-12, 2014.

KOSOVÁ, K. Plant proteome changes under abiotic stress--contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 8, p. 1301-1322, 2011.

KOTAK, J. et al. The histone acetyltransferase GCN5 and the transcriptional coactivator ADA2b affect leaf development and trichome morphogenesis in Arabidopsis. **Planta**, v. 243, n. 3, 2018.

KUMAR, A. et al. Elucidation of lead-induced oxidative stress in Talinum triangulare roots by analysis of antioxidant responses and DNA damage at cellular level. **Environmental Science Pollution**. v. 20, p. 4551-4561, 2013.

KUMAR, A.; MAJETI, N. V. P. Proteomic responses to lead-induced oxidative stress in Talinum triangulare Jacq. (Willd.) roots: identification of key biomarkers related to glutathione metabolisms. **Environ. Sci. Pollut**, v. 21, p. 8750–8764, 2014.

KUMAR, A. et al. Glutathione and citric acid modulates lead- and arsenic-induced phytotoxicity and genotoxicity responses in two cultivars of Solanum lycopersicum L. **Acta Physiol. Planta**, v. 39, n. 151, 2017.

KUMAR, A; PRASAD, M. N. V. Plant-lead interactions: Transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.166 p. 401-418, 2018.

LARCHER, W. Ecofisiologia Vegetal. RiMa Editora, São Carlos, 2000.

LAM, E., K. J. et al. Duckweed in bloom: The 2nd International Conference onDuckweed Research and Applications Heralds the Return of a Plant Model for Plant Biology. **Plant Mol. Biol**, v. 84, p. 737-742, 2014.

LANDOLT, E. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae) - the family of Lemnaceae - a monographic study. **Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes**, v. 1, n. 71, p, 1-566, 1986.

LANDESMAN, L.; PARKER, N. C.; FEDLER, C. B.; KONIKOFF, M. Modeling duckweed growth in wastewater treatment systems. **Livestock Research for Rural Development**, v. 17, 2005.

LANDOLT, E.; KANDELER, R. The family of Lemnaceae – a monographic study: hytochemistry, physiology, application and bibliography. In: Biosystematic Investigations in the Family of Duckweeds (Lemnaceae). **Institutes der ETH**, v. 4, 1987.

LANDOLT, E. Lemnaceae. **Proflora,** v. 21, p. 1-8, 1996.

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

LARCHER, W. Ecofisiologia vegetal. São Carlos: RIMA, p. 531, 2000.

LEBLICI, Z.; AKSOY, A. Growth and lead accumulation capacity of Lemna minor and Spirodela polyrhiza (Lemnaceae): interactions with nutrient enrichment. **Water Air Soil Pollut**, v. 214, p. 175-184, 2011.

LEBLICI, Z.; KAR, M.; YALÇIN, V. Comparative Study of Cd, Pb, and Ni removal potential by Salvinia natans (L.) All. and Lemna minor L.: Interactions with Growth Parameters. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 1, 2018.

LEE, P. K. et al. EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. **PNAS**, v. 104, n. 24, 2007.

LI, F.; WANG, Y.; ZHOU, X. SGS3 Cooperates with RDR6 in Triggering Geminivirus-Induced Gene Silencing and in Suppressing Geminivirus Infection in *Nicotiana Benthamiana*. **Viruses**, n. 9, v. 9, 2017.

LI, S. X.; ZHENG, F. Y.; YANG, H.; NI, J. C. Thorough removal of inorganic and organic mercury from aqueous solutions by adsorption on Lemna minor powder. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, n. 1, p. 423-429, 2011.

LI, H. Transcriptome profilings of two tall fescue (Festuca arundinacea) cultivars in response to lead (Pb) stress. **BMC Genome**, v. 18, n. 145, 2017.

LIMA, V. F.; MERÇON, F. Metais Pesados no Ensino de Química. **Química Nova Escola**, v. 33, n. 4, 2011.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v. 148, p.350-382, 1987.

LIU, Y. W. et al. The OsDHODH1 Gene is Involved in Salt and Drought Tolerance in Rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 59, n. 9, p. 825–833.

MAKAREVITCH, I. et al. Transposable Elements Contribute to Activation of Maize Genes in Response to Abiotic Stress. **PLOS Genetics**, n. 11, v. 10, 2015.

MANTEGAZZA, O. et al. Analysis of the *Arabidopsis* REM gene family predicts functions during flower development. **Annals of Botany**, v. 114, n. 7

MALDONALDO, A. C. D;, WENDLING, B. Manejo de ecossistemas aquáticos contaminados por Metais pesados. **Revista Agropecuária Técnica**, v.30, n.1, p. 21-32, 2009.

MALEA, P. et al. Effects of lead uptake on microtubule cytoskeleton organization and cell viability in the seagrass *Cymodocea nodosa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 175-181, 2014.

MEITEI, M. et al. Photosynthetic pigments and pigment-protein complexes of aquatic plants under heavy metal stress. **Russian Academy of Sciences**, p. 314-329, 2014.

MIRZA, N. et al. Plants as Useful Vectors to Reduce Environmental Toxic Arsenic Content. **The Scientific World Journal**, 2014.

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

MISHRA, V. K. et al. Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent. **Environmental Monitoring and Assessments**, v. 141, p.49–58, 2008.

MORAIS, M. B. Proteômica diferencial e resposta do metabolismo antioxidativo no potencial fitorremediador de Lemnaceae. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

MORAIS, M. B. et al. Salt Stress Induces Increase in Starch Accumulation in Duckweed (Lemna aequinoctialis, Lemnaceae): Biochemical and Physiological Aspects. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.38, p. 383-700, 2018.

MORTH, J. P. et al. A structural overview of the plasma membrane Na+,K+-ATPase and H+-ATPase ion pumps. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 60-70.

MUNNÉ-BOSCH, S. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. J **Plant Physiology**, v.162, n. 7, p. 743-8, 2005.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239–250, 2002.

NIEMI, G. J.; MCDONALD, M. E. Application of ecological indicators. Annual **Review of Ecology and Systematic**, v. 35, 2004.

NOMAN, A. et al. miRNAs: Major modulators for crop growth and development under abiotic stresses. **Biotechnology Letters**, n.39, v. 5, 2017.

NEVES, A. L. R. et al. Acumulação de biomassa e extração de nutrientes por plantas de feijão-de-corda irrigadas com água salina em diferentes estádios de desenvolvimento. **Revista Ciência Rural**, v.39, p.758-765, 2009.

NOCTOR, G. et al. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 3-12, 2018.

OBIORA, S. C.; CHUKWU, A.; DAVIES, T. C. Heavy metals and health risk assessment of arable soils and food crops around Pb–Zn mining localities in Enyigba, southeastern Nigeria. **Journal of African Earth Sciences**, v. 116, p. 182-189, 2016.

OLÁH, V.; HEPP, A.; MÉSZÁROS, I. Comparative study on the sensitivity of turions and active fronds of giant duckweed (Spirodela polyrhiza (L.) Schleiden) to heavy metal treatments. **Chemosphere**, v. 132, p. 40-46, 2015.

PAGLIUSO, D. et al. Correlation of Apiose Levels and Growth Rates in Duckweeds. **Frontiers in Chemistry**, 2018.

PAPPIREDDI, N.; MARTIN, L.; WUHR, M. A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics, **CHEMBIOCHEM**, 2019.

PAWLAK-SPRADA, S. et al. Activation of phenylopropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part I. Effects of cadmium and lead on phenylalanine ammonia-lyase gene expression, enzyme activity and lignin content. **Acta Biochimica Polonica,** v. 58, p. 211–216, 2011.

PARKER, H. J. Overexpression of the 3´ (2),5′-bisphosphate nucleotidase gene AtAHL confers enhanced resistance to Pectobacterium carotovorum in Arabidopsis. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 56, p. 21-26, 2013.

PARLAK, K. U.; YILMAZ, D. D. Response of antioxidant defences to Zn stress in three duckweed species. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 85, 2012.

PEDRALLI, G. Macrófitos aquáticos: técnicas e métodos de estudos. **Estudos de Biologia**, v. 26, p. 5-24, 1990.

PEGLER, J. L. et al. Profiling the Abiotic Stress Responsive MicroRNA Landscape of *Arabidopsis thaliana*. **Plants (Basel)**, n. 8, v. 3, 2019.

PEREIRA, S. F.; POTT, V. J.; TEMPONI, L. G. Lemnoideae (Araceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 3, p. 839-848, 2016.

PIO, M.; SOUZA, K.; SANTANA, G. Ability of Lemna aequinoctialis for removing heavy metals from wastewater. **Acta Amazon**, v. 43, 2013.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 15-39, 2005.

PENNINGTON, S.R.; DUNN. M.J. Proteomics: from protein sequence to function. **New York: Springer-Verlag e BIOS scientific Publishers**, v.1, 2001.

POTTERS, G.; HOREMANS, N.; JANSEN, M. A. K. The cellular redox state in plant stress biology – a charging concept**. Plant Physiol. Biochemistry**, v. 48, p. 292–300, 2010.

QUIRINO, B. F.; CANDIDO, E. S.; CAMPOS, P. F.; FRANCO, O. L.; KRUGER, R. H. Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. **Phytochemistry**, v. 7, p. 351-362, 2010.

RABANNI, M. A. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. **Plant Physiology**, n. 133, p. 1755–1767.

RAUSER, W. E. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. **Cell Biochem Biophys**, v. 31, n. 1, p. 19-48, 1999.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e o efeito das reativas de oxigênio no meio biológico, **Biosc J**, v. 21, n. 3, p. 133-139, 2005.

RODRIGUES, A. C. D. et al. Mecanismos de Respostas das Plantas à Poluição por Metais Pesados: Possibilidade de Uso de Macrófitas para Remediação de Ambientes Aquáticos Contaminados. **Revista Virtual de Química**., v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016.

ROCHA, T. L. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Comunicado Técnico – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 136, p. 1-12, 2005.

RUPRECHT, J. J. et al. The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. **Cell**, v. 179, n. 3, p. 435-447, 2019

SALAH-UD-DIN, R. et al. Citric acid enhanced the antioxidant defense system and chromium uptake by Lemna minor L. grown in hydroponics under Cr stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 21, 2017.

SIDDIQUI, S. Lead induced genotoxicity in Vigna mungo var. HD-94. **J. Saudi Soc. Agric. Sci**, v. 11, p.107–112, 2012.

SREENIVASULU, Y. et al. Endosperm delays seed germination in Podophyllum hexandrum Royle - an important medicinal herb. **Seed Science & Technology**, v. 37, p.10-16, 2009.

SRIVASTAVA, R. K. et al. Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and antioxidative responses in rice seedlings. **Protoplasma,** v. 251, p. 1047–1065, 2014.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. G. C. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Cienc. Rural**, v. 40, n. 3, 2010.

SILVA, J. P. et al. Influence of photoperiod on carbon dioide and methane emissions from two pilot-scale stabilization pond. **Water Science Technology**. v. 66, n. 9, p. 1930-1940.

SCHILLER, A. P. et al. Post treatment of domestic sewage with Spirodela polyrhiza macrophyte. **Revista Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 3, 2017.

SHARMA, M.; PANDEY, G. K. Expansion and Function of Repeat Domain Proteins During Stress and Development in Plants. **Frontiers in Plants Science**, 2016.

SHARMA, R. et al. Responses of Phytochelatins and Metallothioneins in Alleviation of Heavy Metal Stress in Plants: An Overview. **Plant Metal Interaction**: Emerging Remediation Techniques, p. 263-283, 2016.

SILVEIRA, J. A. G. et. al. Salt resistance in two cashew species is associated with accumulation of organic and inorganic solutes. **Acta Physiologia e Plantarum**, v.34, n.5, p.1629-1637, 2012.

SERRANO, I.; CAMPOS, L.; RIVAS, S. Roles of E3 Ubiquitin-Ligases in Nuclear Protein Homeostasis during Plant Stress Responses. **Frontiers in Plant Science**, n. 9, 2018.

SINGH, R. et al. Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte Najas indica are related to antioxidant system. **Bioresource Technology**, v.101, p. 3025–3032, 2010.

SINGH, S. et al. Nitric oxide alleviates arsenic-induced toxic effects in ridged Luffa seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 71, p.155-163, 2013.

SINGH, S. et al. Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. **Frontiers in Plant Sciences**, v.6, n.1143, 2016.

SINGH, D.; TIWARI, A.; GUPTA, A. Phytoremediation of lead from wastewater using aquatic plants. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2012.

SOARES, J. B. P. Modelagem do crescimento de lemna aequinoctialis Welw. (lemnoideae - araceae). Dissertação (mestrado). UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA, 2013.

SOBRINO, A. S. Bioaccumulation and toxicity of lead (Pb) in Lemna gibba L (duckweed). **Journal of Environmental Science and Health**, v. 45, n. 1, 2010.

SONG, B. J.; The F-box family genes as key elements in response to salt, heavymental, and drought stresses in *Medicago truncatula*. **Functional Integrative Genomics**, v. 15, p. 495-507, 2015.

SULMON, C. et al. Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in Arabidopsis thaliana. **Environmental Pollution**, v. 145, p. 507-515, 2007.

SUOKKO A. et al. ClpL is essential for induction of thermotolerance and is potentially part of the HrcA regulon in Lactobacillus gasseri. **Proteomics,** v. 8, p. 1029-1041, 2008.

SURESH, B.; RAVISHAKAR, G.A. Phytoremediation--a novel and promising approach for environmental clean-up. **Crit Rev Biotechnol**, v. 24, n. 3-4, p. 97-124.

SOUZA, M. G.; BARBOSA, A. M. Fatores de estresse no milho são diversos e exigem monitoramento constante. **Visão Agricola**, v.13, 2015.

SYTAR, O. et al. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. **Acta Physiol. Planta**, v.35, p.985–999, 2013.

TAO, X. et al. High flavonoid accompanied with high starch accumulation triggered by nutrient starvation in bioenergy crop duckweed (Landoltia punctata). BMC Genomics, v. 18, n. 166, 2017.

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 414-429, 2010.

TOROK, A. et al. Phytoremediation capacity of aquatic plants is associated with the degree of phytochelatin polymerization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 299, p. 371-378, 2015

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TIPPERY, N. P; LES, D. H; CRAWFORD, D. J. Evaluation of phylogenetic relationships in Lemnaceae using nuclear. **Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 50-58, 2015.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy metal toxicity and the environment**. Exp. Suppl**., v. 101, p. 101-133, 2012.

TÜFEKÇİ, D. E.; İNAL, E. In silico analysis of drought responsive transposons and transcription factors in Solanum tuberosum L. **Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi**, n. 23, n. 2, 2019.

UDENSI, O. et al. Sequence analysis of Maturase K (matK): A chloroplast-encoding gene in some selected pulses. **Global Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 23, p. 213-230, 2017.

UMEKI, N. et al. Preparation and Characterization of a Novel Rice Plant–Specific Kinesin. **The Journal of Biochemistry***, v. 139, n. 4, p.* 645–654.

UYSAL, Y.; TURNER, F. Effect of pH, Temperature, and Lead Concentration on the Bioremoval of Lead from Water Using Lemna Minor. **International Journal of Phytoremediation**, v. 11, n. 7, 2009.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals, and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAN ASSCHEF, F.; CLIJSTER, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant Cell and Environ**, v. 13, p. 195-206, 1990.

VASCONCELLOS, M. C.; PAGLIUSO, D.; SOTOMAIOR, V. S. Fitorremediação: Uma proposta de descontaminação do solo. **Estud. Biol. Ambiente Divers**, v. 34, n. 83, p. 261-267, 2012.

VELICHKOVA, K. N. et al. Bioacumulação, Crescimento e Resposta Fotossintética de Duas Novas Espécies Invasivas Encontradas na Bulgária, Lemna minuta e L. valdiviana, à Poluição de Metal Pesado. **Planta daninha**, v. 37, 2019.

VERMA, K. P. et al. Overexpression of Rice Glutaredoxin OsGrx_C7 and OsGrx_C2.1 Reduces Intracellular Arsenic Accumulation and Increases Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in Plant Science, v. 7, 2017.

VERMA, R.; SUTHAR, S. Lead and cadmium removal from water using duckweed – Lemna gibba L.: Impact of pH and initial metal load. **Alexandria Engineering Journal**, v.54, n. 4, p. 1297-1304, 2015.

VIRDI, A.S.; SINGH, S.; SINGH, P. Abiotic stress responses in plants: roles of calmodulin-regulated proteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

WANG, L. et al. Singlet oxygen- and EXECUTER1-mediated signaling is initiated in grana margins and depends on the protease FtsH2. **PNAS**, v. 113, n. 26, 2016.

WANG, W. et al. DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. **BMC Plant Biology**, n. 10, 2010.

WANG, X.; SHEN, J.; LIAO, H. Acquisition, or utilization, wich is more critical for enhancing phosphorus efficiency in modern crops. **Plant Science**, Limerick, v. 179, p. 302-306, 2010.

WANG, S. et al. Heavy metal pollution in coastal areas of South China: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 76, n. 1-2, 2013.

WANG, Y. et al. Response to nickel in the proteome of the metal accumulator plant Brassica juncea. **Journal Plant Interact**, v. 7, p. 230-237, 2012.

WANG, L. et al. Detoxification strategies and regulation of oxygen production and flowering of Platanus acerifolia under lead (Pb) stress by transcriptome analysis. **Environ. Sci. Pollut. Res**, v. 22, p. 12747-12758, 2015.

WAYNE, L. L. Cytochrome b5 Reductase Encoded by CBR1 Is Essential for a Functional Male Gametophyte in Arabidopsis. **Plant Cell**, n. 25, v. 8, p. 3052–306, 2013.

WOZNY, A.; MANIKOWASKA, M. The toxic effect of lead on the Lemna minor L. **Bull. Soc. Amis. Sci. Lett. Poznan D Sci. Biol**, v. 28, p. 3-12, 1990.

XU, J.; Production of High-starch Duckweed and Its Conversion to Bioethanol. **Biosystems Enginnering**, v. 110, n. 2, p. 67-72, 2011.

XUE, H. et al. Genetic diversity and geographic differentiation analysis of duckweed using inter-simple sequence repeat markers. **Molecular Biology Reporters**, v. 39, n. 1, p. 547-554, 2012.

YADAV, S. Heavy Metals Toxicity in Plants: An Overview on the Role of Glutathione

and Phytochelatins in Heavy Metal Stress Tolerance of Plants. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 2, v. 167-179, 2010.

YIN, L. et al. Role of thylakoid ATP/ADP carrier in photoinhibition and photoprotection of photosystem II in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, n. 153, p. 666-667, 2010.

ZAYED, A. Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. ***Planta***, n. 206, p. 239-299, 1998;

ZENG, H. Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, 2015.

ZHANG, Y. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. **Chem Rev**, v. 113, n. 4, p. 2343–2394, 2013.

ZHAO, H. et al. Duckweed rising at Chengdu: summary of the 1st International Conference on Duckweed Application and Research. **Plant Molecular Biology**, v. 78, n. 6, p. 627-632, 2012.

ZHOU, C. et al. Changes in subcellular distribution and antioxidant compounds involved in Pb accumulation and detoxification in Neyraudi reynaudiana. **Environ. Sci. Pollut. Res**, v. 23, p. 21794–21804, 2016.

ZHU, J. et al. A cellulose synthase-like protein is required for osmotic stress tolerance in Arabidopsis. **Plant Journal**, n. 63, v. 1, p. 128–140, 2010

ZIEGLER, P. et al. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. **Plant Biology**, v. 1, p. 33-41, 2014.