



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE Centro de
Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética - PPGG

José Mogahid Fachine

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Lemna aequinoctialis* SOB ESTRESSE POR
CÁDMIO**

**Recife
2020**

JOSÉ MOGAHID FECHINE

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Lemna aequinoctialis* SOB ESTRESSE POR
CÁDMIO**

Dissertação apresentado ao Curso de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Júnior

Coorientadora: Dr.^a Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB 4/1788

Fechine, José Mogahid

Proteômica diferencial de *Lemna aequinoctialis* sob estresse por cádmio / José Mogahid Fechine. - 2020.

105 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Júnior. Coorientadora:

Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2020. Inclui referências.

1. Plantas. 2. Proteínas de plantas. 3. Bioinformática. I. Calsa Júnior, Tercilio (orientador). II. Silva, Fabiana Aparecida Cavalcante (coorientadora). III. Título.

581

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-018

JOSÉ MOGAHID FECHINE

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Lemna aequinoctialis* SOB ESTRESSE POR
CÁDMIO**

Dissertação apresentado ao Curso de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Genética.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Kátia Castanho Scortecchi
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Prof. Dr. Marcus Vinícius Loss Sperandio
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. Éderson Akio Kido
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Recife, ____ de _____ de 2020.

Às minhas filhas Alice e Lívia, que me fizeram ser alguém muito melhor do que sou hoje. À minha família que me apoiou na medida do possível. À minha namorada, Amanda, pelo carinho e amor verdadeiro em todos os momentos. Aos colegas de trabalho, que passaram a ser minha segunda família. Aos amigos e amigas, que um dia acreditaram aonde eu poderia chegar, divido com imensa gratidão esta conquista.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A minha família, que me ensinou o quanto a gratidão deve ser algo essencial na vida de qualquer pessoa.

Ao Professor Dr. Tercilio Calsa Jr., pela confiança e inspiração de buscar cada dia novos desafios e conquistas.

À minha amiga e coorientadora Dra. Fabiana Aparecida Cavalcanti, que me mostrou o caminho certo nas horas em que eu mais precisava.

À família LGPP/UFPE, que não consigo encontrar palavras para descrever o quanto sou grato.

À Lucas, Geise, Elton, Rayssa, Rodrigo, Tainara, Heloísa e Adauto, pelo companheirismo e ótimas lembranças que levarei por toda minha vida.

À Dra. Ana Jacqueline, Adriana, Roberta e toda equipe Sinos, que me ajudaram a trilhar esse caminho e sempre acreditaram em mim.

À Gilson, Leonardo, Ezequiel, Márcio, Damião e todos os amigos, pela alegria de compartilhar bons momentos.

Ao professor Dr. Emmanuel Damilano Dutra, pela parceria e disponibilidade de análises no Centro de Ciências Nucleares da UFPE.

Ao CETENE, pelo acesso e disponibilidade da estrutura do Maldi-ToF/ToF.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética da UFPE, pela aceitação e confiança de desenvolver esse projeto.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, possibilitando projetos e contribuindo para o desenvolvimento da ciência.

Aos órgãos de fomento FACEPE e CAPES, por possibilitar o desenvolvimento de pesquisas.

Aos professores Éderson Kido, Marcus Sperandio, Kátia Scortecci, Ana Christina e Túlio Diego por prontamente atenderem o convite para minha defesa de mestrado.

“Acredite que você pode, assim você já está no meio do caminho.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

As lentilhas-d'água são plantas aquáticas com potencial biotecnológico devido a sua capacidade fitorremediadora aliada ao seu crescimento exponencial. Tem potencial em ser utilizada no tratamento de efluentes contaminados por metais pesados, dentre eles o cádmio, que possui alta toxicidade, mesmo em concentrações baixas, além de efeito acumulativo. Diante disso, a análise proteômica surge como uma ferramenta que permite a identificação de mecanismos moleculares envolvidos na fitorremediação de cádmio, sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) em lentilhas-d'água cultivadas na presença de cádmio. Foram utilizadas 10 frondes de *Lemna aequinoctialis* clone RDSC5570 cultivadas por 12 dias em meio SH de cultura suplementado com Cloreto de Cádmio (CdCl_2) em diferentes concentrações. Foi observado acumulação significativa de 97,3 mg/kg-1 de Cd por *Lemna aequinoctialis*. Condições contrastantes foram selecionadas para extração de proteínas. As amostras obtidas foram quantificadas e separadas por eletroforese bidimensional, identificadas por espectrometria de massas. Foram identificados 248 proteínas diferencialmente acumuladas, dentre as quais foram identificadas 153 proteínas, classificadas e categorizadas em termos de ontologia gênica, houve maior variação das proteínas relacionadas aos processos fotossintéticos, expressão, tradução e regulação gênica relativa a proteínas de resposta à estresse, cujas categorias podem ajudar a entender os mecanismos funcionais, metabólicos e bioquímicos das lentilhas-d'água, contribuindo para pesquisas sobre melhoramento genético e aplicações biotecnológicas.

Palavra-chaves: Lemnoideae. Fitorremediação. Estresse abiótico. MALDI-ToF-ToF. Bioacumulação.

ABSTRACT

Lentils are aquatic plants with biotechnological potential due to their phytoremediation capacity combined with their exponential growth. It has the potential to be used in the treatment of effluents contaminated by heavy metals, including cadmium, which has high toxicity, even at low concentrations, in addition to its accumulative effect. Therefore, proteomic analysis emerges as a tool that allows the identification of molecular mechanisms involved in phytoremediation of cadmium, therefore, the objective of the present work was to identify differentially accumulated proteins (DAPs) in duckweed grown in the presence of cadmium. Ten fronds of *Lemna aequinoctialis* clone RDSC5570 were used, cultivated for 12 days in SH culture medium supplemented with Cadmium Chloride (CdCl₂) in different concentrations. A significant accumulation of 97.3 mg / kg-1 of Cd was observed by *Lemna aequinoctialis*. Contrasting conditions were selected for protein extraction. The samples obtained were quantified and separated by two-dimensional electrophoresis, identified by mass spectrometry. 248 differentially accumulated proteins were identified, among which 153 proteins were identified, classified and categorized in terms of gene ontology, there was a greater variation of proteins related to photosynthetic processes, expression, translation and gene regulation relative to stress response proteins, whose categories can help to understand the functional, metabolic and biochemical mechanisms of duckweed, contributing to research on genetic improvement and biotechnological applications.

Keyword: Lemnoideae. Phytoremediation. Abiotic stress. MALDI-ToF-ToF. Bioaccumulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura foliar de <i>Lemna gibba</i>	21
Figura 2 – Morfologia dos 5 diferentes gêneros de lentilhas-d'água	22
Figura 3 – Cladograma representativo das lentilhas-d'água	22
Figura 4 – Relação Filogenética dos grupos de lentilhas-d'água.....	24
Figura 5 – Cariótipos de 11 espécies de lentilhas-d'água.....	25
Figura 6 – Ciclo de produção de biogás promovido pelas lentilhas	27
Figura 7 – Mecanismo catalítico da catalase	34
Figura 8 – Síntese da glutatona.....	36
Figura 9 – Quelação de Cádmio e complexação no vacúolo	37
Figura 10 – Categoria de poluentes remediados por <i>Lemna minor</i>	38
Figura 11 – Esquema da eletroforese bidimensional	40
Figura 12 – Dinâmica de crescimento de <i>Lemna aequinoctialis</i>	48
Figura 13 – Tamanho médio das frondes de <i>Lemna aequinoctialis</i>	50
Figura 14 – Capacidade fitorremediadora de <i>Lemna aequinoctialis</i>	51
Figura 15 – Taxa de crescimento relativo de <i>Lemna aequinoctialis</i>	52
Figura 16 – Taxa de inibição de <i>Lemna aequinoctialis</i>	53
Figura 17 – Rendimento de biomassa de <i>Lemna aequinoctialis</i>	53
Figura 18 – Tempo de duplicação de <i>Lemna aequinoctialis</i>	54
Figura 19 – Teores de clorofila e carotenoides	55
Figura 20 – SDS-PAGE de <i>Lemna aequinoctialis</i>	57
Figura 21 – SDS-PAGE bidimensional de <i>Lemna aequinoctialis</i>	59
Figura 22 – Quantitativo de <i>spots</i> dos géis	60
Figura 23 – Relação pH e massa molecular dos <i>spots</i>	61
Figura 24 – Ontologia gênica localização subcelular	62

Figura 25 – Ontologia gênica função molecular	63
Figura 26 – Ontologia gênica processo biológico	63
Figura 27 – Ontologia gênica resumos das categorias	64
Figura 28 – Enzimas diferenciais identificadas	65
Figura 29 – Rede de interação de proteínas do controle	76
Figura 30 – Rede de interação de proteínas do estresse	77
Figura 31 – Rede de interação de proteínas de ambos os tratamentos	78
Figura 32 – Modelo biológico de <i>Lemna aequinoctialis</i> expostas ao cádmio	90

TABELAS

Tabela 1 – Níveis de cádmio no ambiente	29
Tabela 2 – Proteínas diferenciais de <i>Lemna aequinoctialis</i> ambas as condições	66
Tabela 3 – Proteínas diferenciais de <i>Lemna aequinoctialis</i> condição controle	69
Tabela 4 – Proteínas diferenciais de <i>Lemna aequinoctialis</i> condição estresse	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Cd	Cádmio
TCR	Taxa de crescimento relativo
RB	Rendimento de Biomassa
TI	Taxa de inibição
TD	Tempo de duplicação
DAP	Proteína diferencialmente acumulada
PC	Fitoquelatinas
MT	Metalotioneínas
REDOX	Reação de oxirredução
CAT	Catalase
APx	Ascorbato Peroxidase
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione
SOD	Superóxido dismutase
GSSH	Glutathione oxidada
GRx	Glutaredoxina
MDA	Malondialdeído
2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida unidimensional
GO	Ontologia gênica
IEF	Focalização isoeletrica
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

MALDI	Ionização por dessorção à laser
ToF	Tempo de voo
SH	Meio de cultura Schenk and Hildebrandt
ABS	Absorbâncias
TFA	Ácido trifluoroacético
BLAST	Ferramenta de base local de alinhamento
RNA _t	RNA transportador
miRNA	Micro RNA
BCF	Fator de bioconcentração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo geral	19
1.1.2	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	LENTILHAS-D'ÁGUA: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	20
2.2	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LENTILHAS-D'ÁGUA.....	21
2.3	CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DAS LENTILHAS-D'ÁGUA	23
2.4	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DAS LENTILHAS-D'ÁGUA	26
2.5	ESTRESSES AMBIENTAIS	27
2.5.1	Metais pesados	28
2.5.2	Cádmio (Cd).....	29
2.6	TOXICIDADE DO CÁDMIO EM PLANTAS	31
2.6.1	Alterações no metabolismo das plantas induzidas pelo cádmio.....	32
2.7	SISTEMA ANTIOXIDANTE	33
2.7.1	Mecanismos de controle enzimático	33
2.7.2	Mecanismos de controle não-enzimático	35
2.8	FITOQUELATINAS	36
2.9	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	37
2.10	USO DE LENTILHAS-D'ÁGUA PARA FITORREMEDIAÇÃO DE METAIS	38
2.11	ANÁLISE PROTEÔMICA	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO.	42
3.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO (CD)	42
3.3	PARÂMETROS DE CRESCIMENTO.....	42

3.4	DETERMINAÇÃO DA TAXA DE BIOACUMULAÇÃO E FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO	43
3.5	QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES	44
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
3.7	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	44
3.8	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	45
3.9	ANÁLISE PROTEÔMICA POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE).....	45
3.10	ONTOLOGIA GÊNICA (GO)	47
3.11	REDE DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO.....	48
4.1.1	Tamanho das Frondes	49
4.1.2	Análises de fitorremediação de Cádmio	50
4.1.3	Taxa de crescimento relativo (TCR)	51
4.1.4	Taxa de Inibição (TI).....	52
4.1.5	Rendimento de Biomassa (RB).....	53
4.1.6	Tempo de duplicação (TD)	54
4.2	QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTETICOS.....	55
4.3	ANÁLISE PROTEÔMICA.....	56
4.3.1	Proteínas diferenciais	62
4.3.2	Ontologia Gênica	62
4.3.3	Rede de interação proteína-proteína.....	76
4.3.4	Proteínas envolvidas no mecanismo fotossintético	79
4.3.5	Mecanismos de síntese proteica	81
4.3.6	Mecanismos de prevenção de estresse oxidativo	83
4.3.7	Resposta à estresse	84

4.3.8	Proteínas de resposta ao cádmio	88
4.4	MODELO BIOLÓGICO DE <i>LEMNA AEQUINOCTIALIS</i> SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM CD.	90
5	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais pertencentes à subfamília Lemnoideae, geralmente denominadas por lentilhas-d'água, são as menores angiospermas do mundo, mas apresentam a maior taxa de duplicação de biomassa e, juntamente com sua capacidade natural de se adaptar e colonizar água residual antropogênica, tem grande potencial de aplicação para resolver questões climáticas, hídricas e energéticas urgentes neste século. Essas plantas tem despertado o interesse da comunidade científica devido às suas potenciais aplicações biotecnológicas, dentre as quais destacam-se a atividade fitorremediadora, podendo ser utilizadas o tratamento de efluentes; a fitoindicadora, prescrevendo a qualidade ambiental da água; e a produção de biomassa, que pode ser convertida para a produção de biocombustíveis.

Utilizada há séculos devido à sua importância na alimentação de aves, peixes e mesmo humanos, principalmente no leste e sudeste asiático, estas plantas têm sido estudadas de forma crescente nas últimas décadas pelo alto teor inerente de proteínas (30-35% massa seca), entretanto, a demanda por biomassa alternativa para produção de etanol tem focalizado também o incremento no teor de amido, aliado a sistemas de cultivo e processamento ambientalmente sustentáveis.

Diversas pesquisas estão desenvolvendo e testando sistemas de cultivo de lentilha-d'água usando águas residuais, efluentes sanitários ou participando de ciclos sustentáveis de produção. Suas propriedades de biorremediação, por naturalmente extrair da água poluentes como metais pesados, são úteis no tratamento de efluentes industriais, e para remediação de ambientes contaminados, além de diminuir o crescimento de algas, coliformes e larvas de mosquito. Os metais pesados, assim como os diversos agentes estressores, estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que tendem a potencializar os efeitos tóxicos dos poluentes. Por outro lado, as plantas possuem um complexo mecanismo de defesa constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes que previnem e buscam reduzir o acúmulo de ROS e consequentemente o estresse oxidativo.

O cádmio (Cd) é um metal pesado normalmente encontrado na natureza em baixas concentrações e ainda assim altamente tóxico para microrganismos, vegetais e animais. As plantas são as principais vias de entrada do Cd na cadeia alimentar e o acúmulo desse metal em determinados tecidos pode levar a rejeição comercial de cultivares, diminuição da produtividade, além de ser perigoso à saúde humana. As

plantas não possuem um sistema próprio de absorção de Cd, o qual pode ser absorvido pelos transportadores de cátions por possuir grande semelhança química com outros elementos essenciais à planta como o ferro Fe^{2+} , cálcio Ca^{2+} e o zinco Zn^{2+} , os quais apresentam ampla especificidade de substrato.

Os estudos ao nível do proteoma permitem entender melhor as respostas moleculares das plantas ao estresse ocasionado por metais pesados, tais como o funcionamento das vias de desintoxicação, translocação ou exclusão e transformação desses metais. Dessa forma o principal objetivo desta proposta é avaliar o potencial biorremediador de isolados de Lemnoideae na presença de cádmio, identificar proteínas diferencialmente acumuladas correlacioná-las com os mecanismos de resposta da planta.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- ✓ Compreender a resposta bioquímica, morfofisiológica e molecular de *Lemna aequinoctialis* (clone RDSC5570) sob estresse por cádmio.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os parâmetros de crescimento dos isolados de *L. aequinoctialis* sob estresse por cádmio.
- ✓ Identificar o percentual de fitorremediação de cádmio em *L. aequinoctialis*.
- ✓ Entender as modulações de origem bioquímica de *L. aequinoctialis* frente ao estresse provocado pela acumulação de cádmio.
- ✓ Estabelecer o perfil eletroforético das proteínas totais do isolado de *L. aequinoctialis* com resposta diferencial ao estresse por cádmio.
- ✓ Identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) por espectrometria de massas (MS).
- ✓ Determinar a função, processo biológico e localização celular das DAPs através de ontologia gênica
- ✓ Correlacionar as proteínas identificadas com vias metabólicas de *Lemnoideae* utilizando ferramentas de bioinformática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LENTILHAS-D'ÁGUA: CARACTERÍSTICAS GERAIS

As lentilhas-d'água ou Duckweeds, “do inglês”, são angiospermas monocotiledoneas da família Araceae, denominada antigamente de Lemnaceae, e que atualmente estão classificadas na sub-família Lemnoideae. Estas plantas constituem um grupo de origem vegetal com origem monofilética, sendo pequenas plantas, macrófitas aquáticas flutuantes de vida livre, vivendo em suspensão na coluna d'água (LANDOLT, 1986).

As lentilhas-d'água são plantas estritamente aquáticas que possuem estrutura morfológica característica do grupo, não havendo diferenciação entre caule e folha, conhecida como fronde, estrutura táloide fotossintetizante e corpo reduzido, dotada de raízes, nervuras e papilas pigmentares, sendo estas características usadas para classificação e determinação taxonômica. São as menores angiospermas conhecidas e possuem a menor flor já relatada (0,2 mm) (LANDOLT, 1986).

São espécies cosmopolitas, colonizam preferencialmente ambientes lênticos e eutrofizados, podendo ocorrer também em ambientes lóticos, ou seja, com baixíssimo volume de água. As lentilhas-d'água não são encontradas nas regiões árticas e são bem raras em regiões secas e com baixa incidência de precipitações. (LANDOLT, 1986; SREE et al 2016).

A forma de crescimento das lentilha-d'água é de maneira vegetativa; as novas frondes brotam por botões germinativos, dando origem a duas ou até mais linhagens germinativas (Figura 1), de maneira praticamente exponencial o crescimento da população pode dobrar em menos de 24 horas (SREE et al, 2016; ZIEGLER et al. 2015). Alguns trabalhos definem o sucesso reprodutivo das lentilha-d'água como um exemplo hipotético de um “demônio- darwiniano”, ou seja, organismos que iniciam o período reprodutivo quase que imediatamente após nascerem e potencialmente vivem para sempre (KUTSCHERA, 2015).

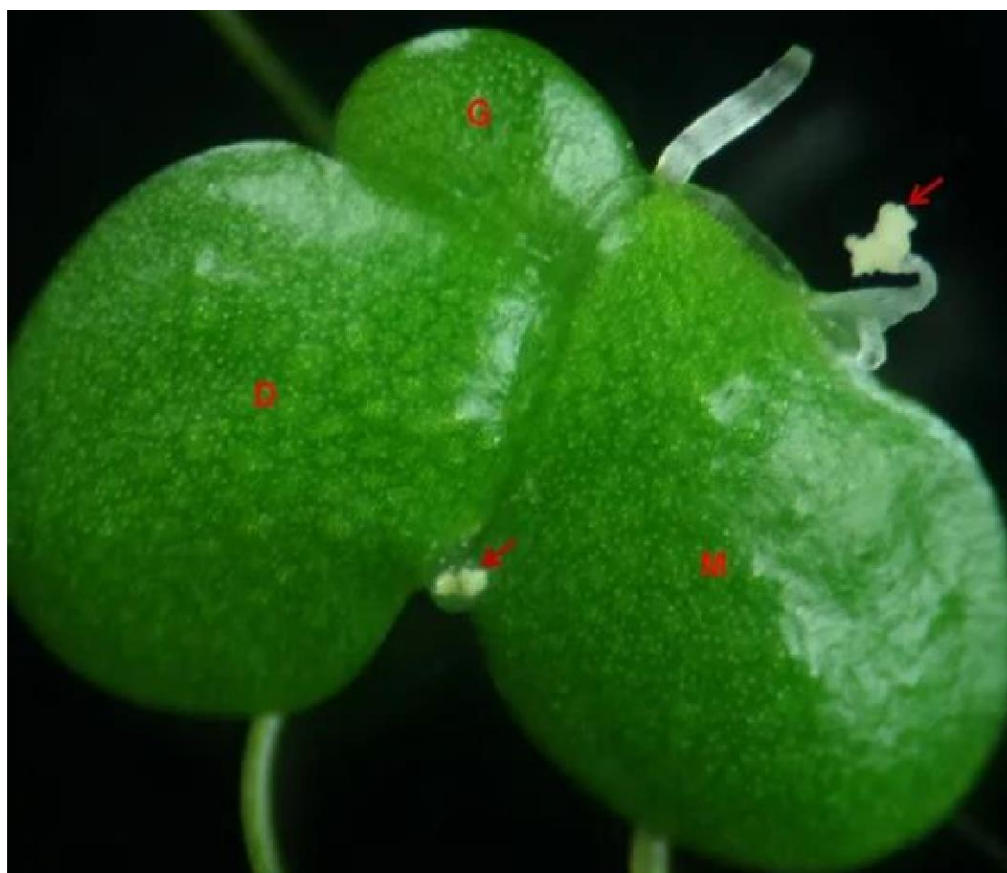


Figura 1. Estrutura foliar “taloide” de *Lemna gibba*, Setas vermelhas indicam flores; M, folha mãe; D, folha filha; G folha neta. (FU et al, 2017)

2.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LENTILHAS-D'ÁGUA

As lentilhas-d'água são importantes biotecnologicamente, e sua importância aumenta a cada dia. Entretanto, por se tratar de espécies de tamanho reduzido, que se confundem com outras espécies (crípticas), sua classificação e identificação requer conhecimento. Landolt (1986) começou os estudos de taxonomia das lentilhas-d'água e foi um avanço gigantesco para entender a complexidade genética desse grupo, porém mudanças significativas ocorreram, como surgimento de tecnologias para genotipagem, por exemplo, possibilitando o surgimento da classificação desse grupo (figura 2).

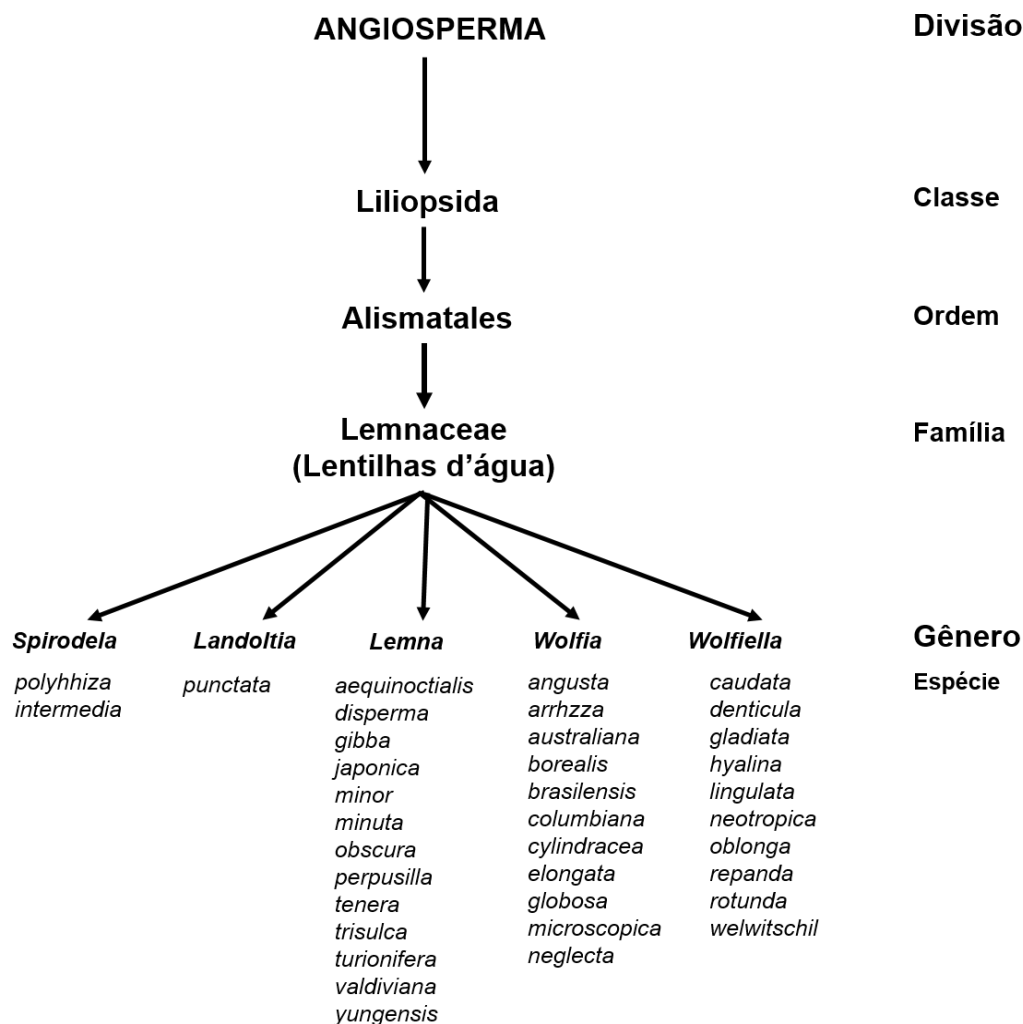


Figura 2. Cladograma representativo das lentilha-d'água. São mostrados cinco gêneros e 37 espécies. Fonte (APPENROTH et al., 2013). Atualmente, existem 37 espécies descritas, agrupadas em 5 gêneros morfológicamente distintos *Spirodella*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* e *Wolffia* (figura3)(APPENROTH et al., 2013).

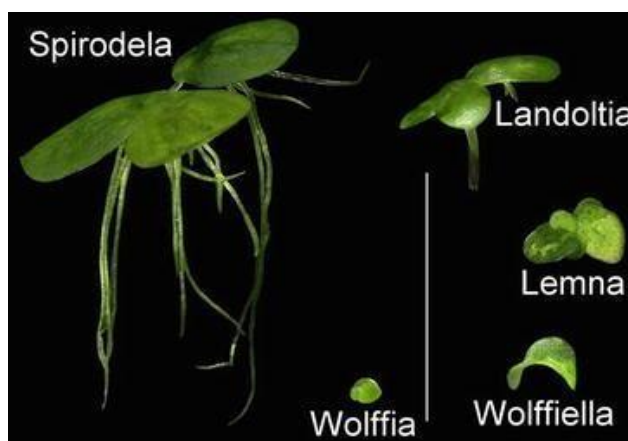


Figura 3. Morfologia de cinco espécies representativas para gêneros de lentilhas. Spirodela: *Spirodela polyrhiza*; Landoltia: *Landoltia punctata*; Lemna: *Lemna minor*; Wolffia: *Wolffia lingulata*; Wolffia: *Wolffia arrhiza*. Bar: 1 cm Fonte (CAO H.X., FOUROUNJIAN P, 2018).

2.3 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DAS LENTILHAS-D'ÁGUA

As populações de lentilhas-d'água são distintas e isso se deve, em parte, por suas características adaptativas e genéticas. Espécies que vivem em ambientes variados possuem maior plasticidade genômica, esses diferentes grupos, denominados ecótipos, constituem uma fonte de variação intraespecífica, portanto, podem apresentar diferentes características em aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos (JIA-YANG, 2014). Entender o genoma, já sequenciado das lentilhas-d'água forneceria informações importantes acerca da sua arquitetura biológica além de permitir novas possibilidades nas pesquisas básicas de fitorremediação e aplicações biotecnológicas.

As lentilhas-d'água apresentam um tamanho variado de genomas (entre 160 Mb e 2203 Mb), variação no conteúdo de heterocromatina presente em suas células (figura 4). Estas diferenças podem ser atribuídas ao volume nuclear e celular, bem como a diminuição da estrutura morfológica, onde os padrões indicam que a diminuição do tamanho foliar está diretamente relacionada ao tamanho do genoma, pelo menos na grande maioria das espécies (HOANG,2019). A ocorrência de variação genética entre as espécies de Lentilhas-d'água não está restrita apenas em nível interespecífico, são significativas variações a nível intraespecífico, *Lemna aequinoctialis*, por exemplo, pode exibir diferentes padrões moleculares de expressão, como alterações na composição e quantidade de seus ácidos graxos (TANG, 2015).

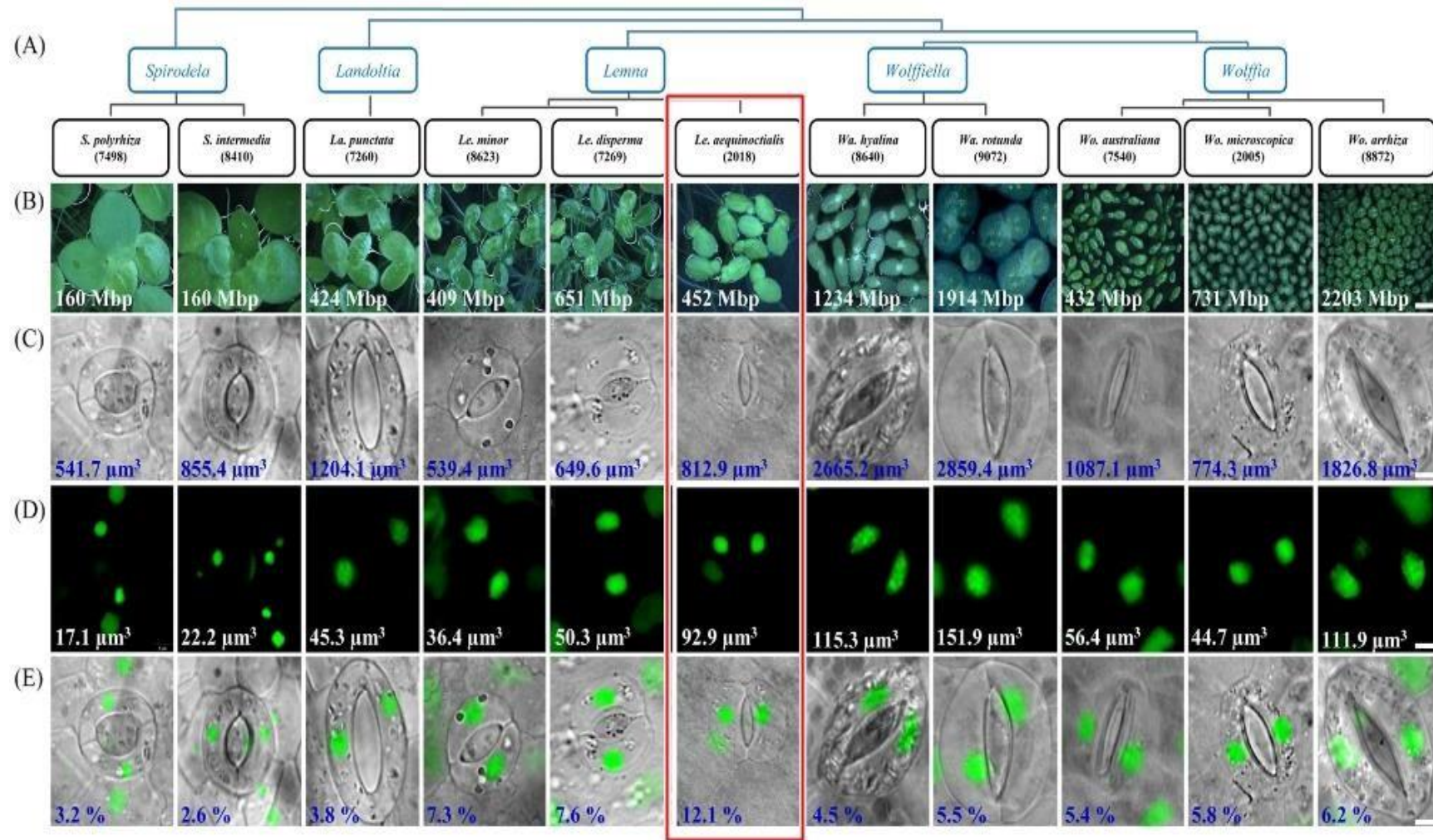


Figura 4. Relação filogenética, fronde, estômatos e morfologia de núcleos de espécies de lentilhas. (A) posição filogenética. (B, C) Diferenças de tamanho e morfologia de folhas e estômatos. (D, E) Forma e distribuição dos núcleos dentro das células de guarda. Os números indicam o tamanho do genoma (B), a célula média (C) e os volumes nucleares (D) e a porcentagem do volume nuclear para a célula (E). Barras de escala = 200 μm (B) e 5 μm (C- E) *Lemna aequinoctialis* em destaque. (HOANG, 2019).

O número de cromossomos de espécies de lentilhas-d'água vem sendo estudado ao longo dos anos e resultados diversos foram observados havendo grande variação entre os clones assexuados em uma mesma espécie (figura 5). Alguns autores descrevem por exemplo, que para diferentes clones de *L. aequinoctialis* foram encontrados cariótipos variando entre 20, 40, 50, 66, 72, 78, 84, 65 e 76 cromossomos (HOANG, 2019).

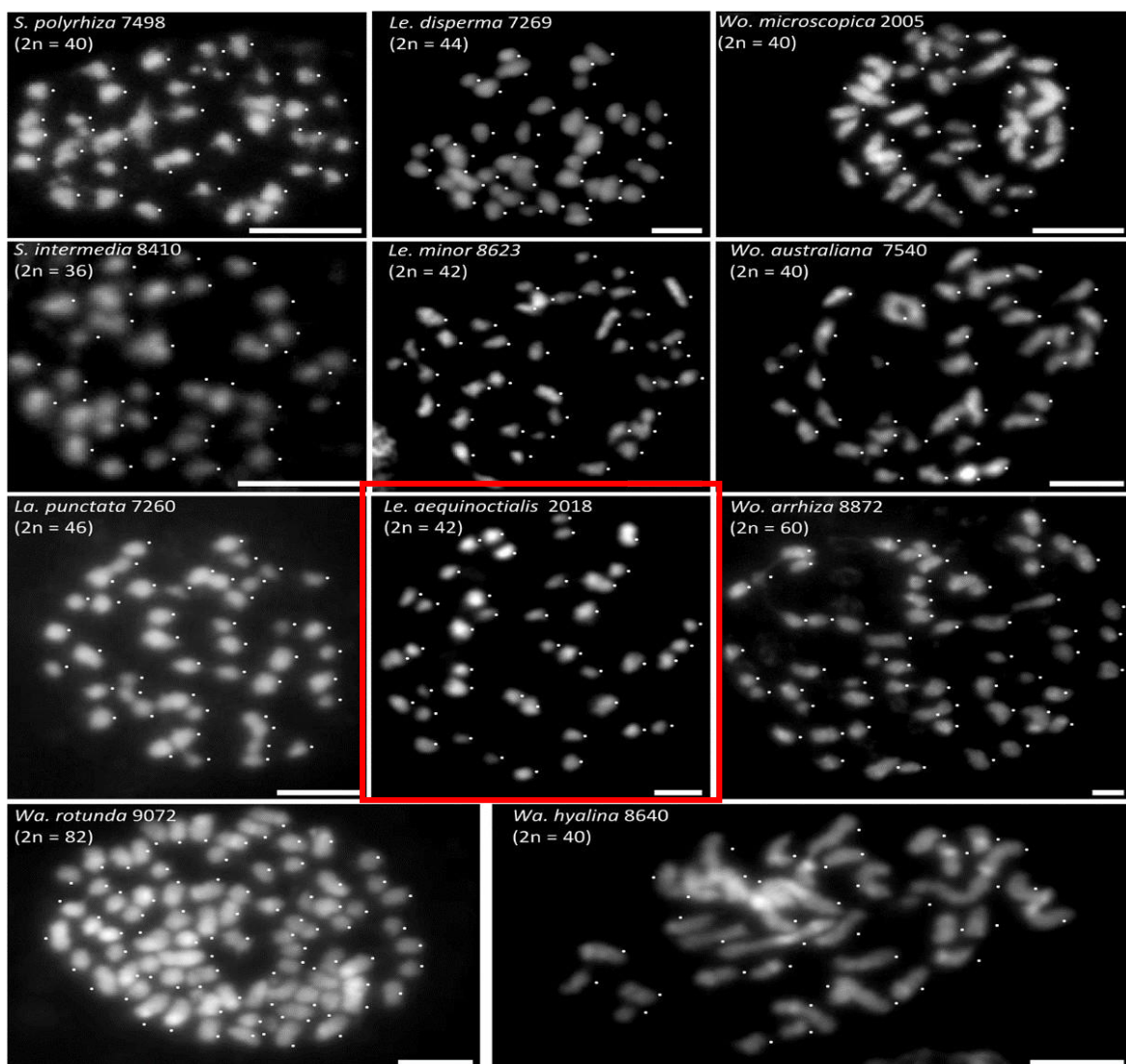


Figura 5. Número cromossômico de onze espécies de lentilhas-d'água. Em destaque cariótipo diploide $2n=42$ de *Lemna aequinoctialis*. Barras de escala em 5 μm . (HOANG, 2019).

A variação da quantidade de cromossomos das lentilhas-d'água reflete a plasticidade genética desse grupo, isso se reflete nas condições adaptativas promovidas pelo genoma. Estudos de metilação de histonas e modificação pós traducionais do DNA tem revelado um comportamento genético amplamente responsivo às condições

ambientais (CAO et al. 2015). Diversas pesquisas nas áreas de genética e biologia molecular das lentilhas-d'água, vem descrevendo como é estruturado o genoma (HOANG, 2019), o transcriptoma (AN D, 2018), incluindo *Lemna aequinoctialis*, que teve seu perfil transcriptômico por RNA-seq para avaliação de metabolismo de carboidratos (YU, et al. 2017) e proteoma diferencial (MORAIS, 2019), inclusive em resposta à metais, como o alumínio (SU, 2019).

2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DAS LENTILHAS-D'ÁGUA

As lentilhas-d'água têm despertado interesse tanto da comunidade científica como também dos setores produtivos, devido a sua capacidade de aplicação biotecnológica. Suas características fisiológicas, com destaque para sua atividade fitorremediadora, bioindicadora e produção eficiente de biomassa, são características atrativas para pesquisas e aplicações com esse grupo de plantas. A capacidade das lentilhas-d'água de reter nutrientes como nitrogênio e fósforo, metais, toxinas de microrganismos, bioacumulando assim praticamente todos os tipos de substâncias presentes em águas residuais antropogênica, além de sua biomassa ser convertida facilmente em etanol, butanol e biogás (CUI, 2015).

A fitorremediação, uso de plantas para remoção de substâncias tóxicas como metais pesados, surgiu nos últimos anos como uma alternativa de tecnologia sustentável e viável economicamente para a recuperação de águas residuais. A eficiência da absorção de substâncias como metais requer altos níveis de acessibilidade pela planta, captação e translocação de raízes para partes aéreas, rápido crescimento das plantas e grande produção de biomassa. As plantas podem ser usadas nesse sentido para estabilização, extração, degradação ou volatilização desses compostos tóxicos (PILON-SMITS, 2005). As espécies de lentilhas-d'água, como *Lemna gibba* L. e *L. aequinoctialis*, são comumente utilizadas em pesquisa aplicada com condições climáticas favoráveis sendo muito eficaz na remoção de metais pesados (BOKHARI, 2019).

A biomassa das Lentilhas-d'água coletada também pode ser usada de maneiras úteis, incluindo forragem animal (HALMEMIES-BEAUCHET-FILLEAU, et al. 2018), produção de biogás (figura 6), alimentação humana (sem efeito citotóxico aparente; (SREE, 2019), fertilizantes (KREIDER, 2019), e até na Produção de compostos terapêuticos, como alguns peptídeos antimicrobianos, por exemplo (AHMED,2016).

Existem trabalhos envolvendo produção de vacina animal por expressão heteróloga em lentilhas-d'água (KO, 2011) e trabalhos envolvendo a produção de peptídeos antimicrobianos e metabolitos secundários capazes de inibir o SARS-CoV-2 estão em andamento.

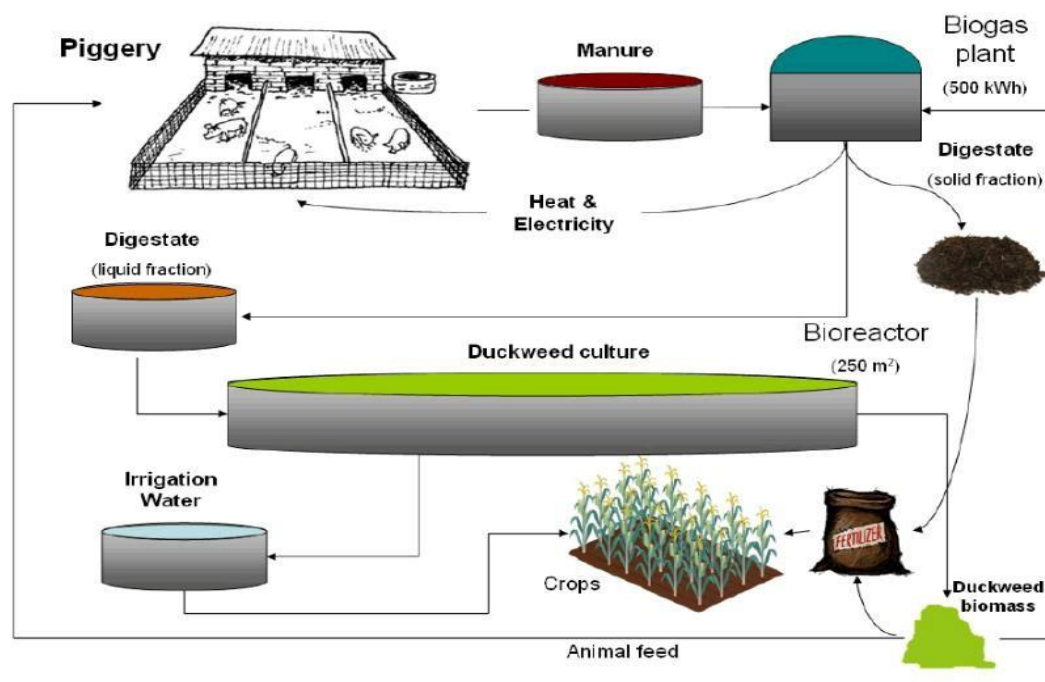


Figura 6. Ciclo fechado de produção de biogás. A biomassa resultante do cultivo de lentilhas-d'água produz é utilizada na alimentação animal (suínos); o esterco de suínos passa por um digestor produzindo biogás, servindo de adubo físico para plantação e líquido rico em nutrientes fosfatados e nitrogenados; A água tratada por lentilhas-d'água serve para irrigação. Esquema retirado do site do Project Lemna. Link para acesso: <http://www.life-lemna.eu/the-project/description>

2.5 ESTRESSES AMBIENTAIS

Estresses ambientais são perturbações provocadas pelo meio ambiente diretamente no organismo, entretanto, a plasticidade genética das espécies é o que dita o quanto elas se aclimatarão as condições desfavoráveis do meio. Esse processo de aclimação é fundamental e geralmente seguido por modulações genômicas e produção de metabolitos secundários.

Fatores ambientais de estresse que influenciam o crescimento e o desenvolvimento da planta incluem temperatura, umidade, intensidade de luz, suprimento de água, minerais, bactérias, fungos, e microrganismos em geral, os quais podem causar efeitos adversos no crescimento e afetar diretamente a produção de biomassa (MA, 2015).

Os estresses ambientais promovem processos de aclimação e adaptação,

onde ambos são dependentes de mecanismos responsivos das plantas. A adaptação ocorre por vários mecanismos genômicos ao longo de muitas gerações, enquanto o processo de aclimação diz respeito a respostas rápidas, necessárias para tolerar ambientes estressantes em curto e médio prazo (GASPAR et al, 2002).

A rápida industrialização e descarte inadequado de substâncias tóxicas vem resultando em problemas como poluição hídrica, eutrofização e desequilíbrio nos ecossistemas. A liberação de substâncias poluentes, nos mais diversos ambientes, como por exemplo em corpos hídricos, causam grandes prejuízos aos ecossistemas aquáticos. Nesse contexto, destacam-se os metais pesados, cujo elevados níveis de toxicidade causam efeitos deletérios, principalmente nas plantas aquáticas (EMAMVERDIAN et al., 2015).

2.5.1 Metais pesados

Nas últimas décadas, o desenvolvimento dos meios de produção e rápida industrialização trouxeram o ônus de gerar graves problemas ambientais. Resíduos industriais contendo metais pesados despejados desordenadamente constituem um grave risco à saúde e ao meio ambiente.

Os metais são definidos como elementos que conduzem eletricidade, são maleáveis, formam cátions e produzem óxidos básicos. Também podem ser definidos como elementos químicos que apresentam peso específico maior que 5 g.cm³, e são muito raros em seu estado puro na natureza, por isso são considerados elementos traços, encontrados em poucas partes por milhão (ppm) (DUFFUS, 2002). Os metais pesados biomagnificam a cadeia alimentar (são transferidos entre os níveis tróficos) e os estresses provocados por eles podem induzir o estresse oxidativo, provocar danos ao DNA, modificações nas proteínas, peroxidação lipídica, e alterações em muitos processos homeostáticos (WU et al, 2016; VALKO, 2005).

Metais pesados são substâncias que não apresentam função no corpo nem são metabolizadas pelos organismos, por não haver um método de excreção eficiente são considerados bioacumulativos, eles incluem o: mercúrio, níquel, chumbo, arsênico, Cádmio, Alumínio, platina e cobre. Pequenas concentrações já exibem sintomas de toxicidade (HUSSEIN, et al, 2013).

Os metais pesados liberados indiscriminadamente no ambiente tendem a se concentrar, podem contaminar solos e rios, e geralmente acabam entrando na cadeia

alimentar devido a absorção pelas plantas. A disponibilidade e eficiência dessa absorção é influenciada por fatores como concentração e pH (ZENG et al, 2011).

A resolução N° 430 do CONAMA de 13/05/2011 (Conselho Nacional do Meio Ambiente) é quem dispõe sobre os parâmetros, condições e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de águas receptores (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011). 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.

2.5.2 Cádmio (Cd)

Descoberto em 1817, por Fredrich Stromeyer, como uma impureza do carbonato de zinco, este elemento químico pertence ao grupo IIB da tabela periódica, juntamente com o Zinco (Zn) e o Mercúrio (Hg). Atualmente, os dados dos níveis de cádmio no ambiente podem ser obtidos através da International Cadmium Association (ICA) (Tabela 1). Segundo o ICA três quartos de todo o Cd produzido é utilizado na fabricação de baterias recarregáveis do tipo Ni/Cd, o outro quarto da produção é utilizado nos vários processos industriais.

Tabela 1. Níveis de Cádmio no Ambiente.

Atmosfera	0,1 a 5 ng/m ³
Crosta terrestre	0,1 a 5 mg/g
Sedimento Marinho	~1 mg/g
Água do mar	~0,1 mg/L
Água doce	~1 µg/L

Fonte: Internacional Cadmium Association (ICA) Bélgica e CETESBE, BRASIL
2007

Em 2001, o cádmio foi o 7º classificado na lista de “substâncias mais perigosas” da CERCLA (*Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act*), da EPA (*Environmental Protection Agency*), e da ATSDR (*Agency for Toxic*

Substances and Disease Registry), e nessas classificações as substâncias são categorizadas de acordo com a toxicidade, o potencial de risco à saúde, e a exposição aos organismos vivos.

A FAO/WHO (1972), estabeleceu que a ingestão máxima tolerável de cádmio deve ser inferior a 0,070 a 0,084 mg dia⁻¹, para um adulto de 70 kg. Já a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera como potável a água cuja concentração de Cd não exceda a 5 µg L⁻¹ (EPA, 1980). No Brasil, entretanto, a concentração máxima estabelecida para águas destinadas ao consumo doméstico, à irrigação de hortaliças, à criação de espécies animais, e destinadas à alimentação humana está limitada a 1 µg L⁻¹ (BRASIL, 2005). O cádmio é o único metal que apresenta riscos à saúde humana nas concentrações toleráveis em plantas, daí a preocupação em desenvolver estratégias para contê-lo.

O Cd não possui função específica nos organismos vivos, sendo considerado um elemento tóxico, acumulativo e de difícil eliminação. Existe, porém, uma única exceção, tratando-se da diatomácea marinha *Thalassiosira weissflogii* que apresenta uma enzima, anidrase carbônica, envolvida na aquisição do carbono inorgânico, cuja enzima possui cádmio na estrutura (LANE, 2005), indicando uma possível seleção única de metaloenzimas no ambiente marinho.

O Cd tem acesso a planta pelo sistema radicular, e as plantas não apresentam canais específicos para transporte deste elemento, já que ele não apresenta função fisiológica nelas. Uma vez no interior da planta, o Cd pode ser translocado para as partes aéreas da planta, ser acumulado ainda na raiz ou ser exsudado ou volatilizado (ISMAEL et al. 2019). Já se sabe que o Cd pode ter acesso ao interior do sistema radicular por transportadores de elementos essenciais como o ferro (Fe³⁺), zinco (Zn²⁺), magnésio (Mg²⁺) e cálcio (Ca²⁺), devido à similaridade conformacional desses íons e a não especificidade das proteínas transportadoras envolvidas (CHEN et al, 2018). O transporte para o interior celular pode-se dar através de várias proteínas, como as proteínas da família NRAMP (proteínas de macrófago associadas à resistência natural) (SASAKI, 2012), os transportadores ZIP (proteínas reguladas por zinco/ferro), e os transportadores de Cálcio de baixa afinidade (CHEN et al, 2018).

2.6 TOXICIDADE DO CÁDMIO EM PLANTAS

As plantas são a principal via de acesso de Cd à cadeia alimentar, o acúmulo desse metal na planta pode diminuir sua produtividade, alterar o fenótipo levando a rejeição comercial, sem falar no risco à saúde animal em geral. As plantas respondem de maneira negativa à toxicidade do Cd, e os principais parâmetros afetados nas plantas são o crescimento e a atividade fotossintética. Pode-se avaliar parâmetros de crescimento medindo por exemplo a taxa de crescimento relativo (TCR), a taxa de rendimento de biomassa (RB) e a taxa de inibição pelo metal (TI)(ZIEGLER et al. 2015). Já parâmetros fotossintéticos possíveis de avaliação são: quantidade de clorofila A e B, carotenoides, transferência de elétron, condutância estomática, dentre outros (AZEVEDO, 2014).

A toxicidade de Cd em plantas altera a homeostase da célula vegetal, isso se reflete na diminuição da germinação das plantas, na redução no crescimento, no ganho de biomassa, e no prejuízo à fotossíntese, além de promover desequilíbrios celulares, afetando o sistema de defesa antioxidante, a síntese proteica, o sistema de reparo celular, e o sistema de apoptose celular (RIZWAN et al, 2016). Adicionalmente, o Cd modula o proteoma celular, alterando a expressão gênica, e em condições de estresse severo, o Cd promove a clorose e a necrose foliar, a genotoxicidade, a citotoxicidade e a morte da planta (RIZWAN et al, 2016). Espécies de lentilhas-d'água como *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor*, *Lemna gibba* e *Lemna aequinoctialis*, que foram expostas ao Cd, apresentaram redução do crescimento e biomassa diretamente proporcional à concentração, clorose e necrose foliar, além de descolamento de raiz (CHAUDHURI, 2014; BOKHARI, 2019; YIN, 2002).

A fitotoxicidade de Cd está relacionada à capacidade de alterar estruturas celulares, essas alterações incluem; mudanças em grupos tiol, alteração da função das proteínas, retirada de elétrons de moléculas fundamentais para o desenvolvimento da planta, como enzimas, isso de modo indireto induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou (ROS) do “inglês”, que compreendem os radicais livres, radical superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2)(GILL,2010; HUYSBRECHTS et al. 2019), promovendo um desequilíbrio oxidativo na célula. Contudo, sistemas que deveriam controlar esse desequilíbrio como o sistema não enzimático da glutatona (GSH) ficam envolvidas na produção de compostos de baixo peso molecular, conhecidas como fitoquelatinas

(PC), sendo essa última, moléculas responsáveis pela “quelação” de metais, processo de complexação/ligação a íons metálicos diminuindo assim sua toxicidade (HUYBRECHTS et al. 2019).

Outra estrutura que sofre os danos provocados pelo Cd é o DNA, o Cd promove quebras da estrutura de dupla hélice, promove aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos, além de corromper várias vias de reparo do DNA. Quando os danos são mínimos, devido a concentração de Cd do ambiente, menor do que a capacidade da planta de responder, ela suspende seu processo de divisão celular a fim de promover uma recuperação. Quando a concentração de Cd é maior e os danos são maiores do que a capacidade da planta de responder, ela ativa vias de morte celular programada (HU, 2016).

O sistema fotossintético sofre imensamente com os danos provocados pelo Cd, além da clorose aparente e redução de fatores como abertura estomática, ocorre diminuição significativa dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila A e B), diminuição do teor de carotenoide, redução da principal enzima da fotossíntese ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) (SONG et al. 2019), redução da atividade do fotossistema I e II, degradação das proteínas envolvidas nas vias fotossintéticas e desestruturação das proteínas dos tilacoides (WANG, 2014).

2.6.1 Alterações no metabolismo das plantas induzidas pelo cádmio

Os metais pesados, assim como os diversos agentes estressores, estimulam a modulação do genoma das plantas, para responder aos mais diversos tipos de estresses, como por exemplo, produção de ROS, eles tendem a potencializar os efeitos tóxicos dos poluentes. Em contrapartida, as plantas exibem diversos mecanismos de defesa para conter metais pesados, essa defesa inclui desde a formação de barreiras mecânicas para impedir que o metal chegue até a planta (MUSZYNSKA, 2019), ativação da via de defesa antioxidante, composto por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (URUÇ PARLAK, 2013) e produção de compostos quelantes de metais, como fitoquelatinas e metalotioneínas (MT) (WU, 2019; SINGH et al.2019).

2.7 SISTEMA ANTIOXIDANTE

As EROs são compostos químicos resultantes da ativação ou redução de oxigênio molecular, essas reações de redução-oxidação ou oxirredução (REDOX), que são reações de transferência de elétrons, as quais estão presentes em todas as células aeróbicas e sua produção e quantidade estão intimamente relacionadas à homeostase celular. Somente quando esse equilíbrio é perturbado, através de estresses ambientais, provocando diversas alterações metabólicas e modulação no genoma vegetal, ocorre um estresse oxidativo. As células têm mecanismos que modulam a expressão de enzimas de controle REDOX celular, esse sistema inclui as enzimas Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APx), Glutathione redutase (GR) e Superóxido dismutase (SOD) (ANJUM et al. 2016; THABIT, 2019). A defesa não enzimática envolve glutathione, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, fitoquelatinas, metalotioneínas, proteínas ricas em histidina, dentre outros compostos capazes de inibir a formação de EROs (YU, 2013).

As lentilhas-d'água alteram a expressão das proteínas envolvidas no controle oxidante (CAT, APx, GR e SOD), quando expostas às mais diversas condições estressantes, como em efluentes sanitários (BARBOSA NETO, 2017 “no prelo”; ZHAO, 2018), na maioria dos casos com vantagens de crescimento levando em consideração a quantidade de resíduos orgânicos que elas conseguem aproveitar.

2.7.1 Mecanismos de controle enzimático

O desequilíbrio antioxidante induz a planta a responder de forma eficiente e rápida para conter os danos celulares. A principal via de controle desse desequilíbrio é através das enzimas antioxidantes.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula sinalizante, importante na resposta da planta a determinadas condições ambientais, porém alteração na sua biodisponibilidade pode acarretar desequilíbrio e alteração no metabolismo. Outras enzimas podem metabolizar o (H_2O_2), porém a alta especificidade da catalase garante a ela uma maior importância no controle redox do peróxido de hidrogênio. A catalase favorece a reação de dismutação (figura 7), na qual a enzima reduz duas moléculas de peróxido de hidrogênio à duas moléculas de água. (MHAMDI, 2010).

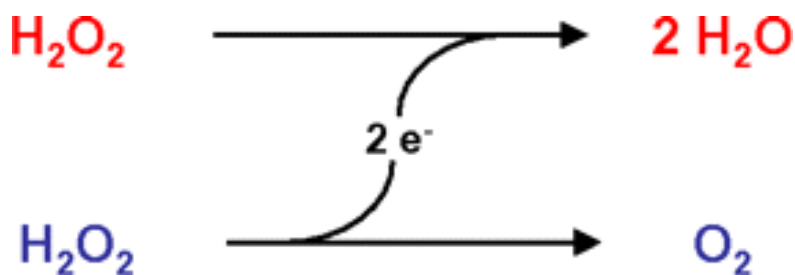


Figura 7. Esquema simplificado do mecanismo catalítico da catalase. Substratos gerais e produtos da reação de dismutação clássica.

Essas enzimas juntamente com suas isoenzimas são fundamentais para reações de manutenção da vida, elas são encontradas principalmente nos peroxissomos, podendo ser encontradas também nos cloroplastos e mitocôndrias, onde utilizam o H_2O_2 para redução de toxinas, incluindo compostos fenólicos, ácido fórmico, formaldeídos e álcoois (MHAMDI, 2010).

A Ascorbato peroxidase (APx) é uma outra enzima envolvida no controle de EROs, mas diferente da CAT ela possui baixa afinidade. Além disso, as APx por serem multigênicas, podem eliminar H_2O_2 que estão inacessíveis à catalase, como no caso dos cloroplastos (FOYER, 2011). A enzima também trabalha em conjunto com o ciclo do antioxidante glutathiona, que juntos formam um sistema antioxidante altamente complexo, indo desde a produção de fitoquelatinas até cascatas de sinalização e indução de processo apoptótico, cujo sistema é influenciado por fatores ambientais, como estresses abióticos (FOYER, 2011). Metais pesados como o Cd, alteram e regulam positivamente a quantidade de APx em plantas (ALVES, et al. 2019).

A Superóxido dismutase (SOD) é uma proteína presente em todas as células metabolizadoras de oxigênio e está localizada em diferentes compartimentos subcelulares, como o núcleo, peroxissomos, apoplasto, e principalmente nos cloroplasto, mitocôndria e citosol. Apresentando-se na forma de isoenzimas que são codificadas no núcleo e transportadas para seus locais organelares por meio de marcador sequencial. Considerada a primeira linha de defesa contra danos causados por ROS (GILL et al. 2015), Essa enzima é tão importante que já foi relatado que sua expressão é diretamente relacionada ao desenvolvimento do embrião de plantas (ZHOU, 2018). A SOD desempenha uma ação catalítica envolvida na dismutação de radicais superóxidos ($\text{O}_2^{\bullet-}$). As SODs são classificadas de acordo com o componente metálico do seu sítio ativo, e embora se saiba que metais como o Cd podem competir

por esse espaço, estudos indicam que a molécula de Zinco promove uma estabilidade estrutural maior que a de outros metais (GILL et al. 2015).

Essas enzimas de controle antioxidante são superexpressas em lentilhas-d'água em condições desfavoráveis, sendo que alterações significativas dessas enzimas foram reportadas em trabalhos envolvendo limpeza e tratamento de água e esgoto (BARBOSA NETO, 2017 “no prelo”; PANFILI, 2019), em tratamento de metais (SU, 2019), incluindo metais pesados (ZHAO, 2017) ou sob estresse salino, por exemplo (MORAIS, 2018).

2.7.2 Mecanismos de controle não-enzimático

A Glutathione (GSH) (γ-glutamyl-cysteinyl-glycine) é um tripeptídeo considerado essencial às células de plantas e animais, estando envolvidas em inúmeros processos celulares, sendo utilizada no armazenamento e transporte de formas reduzidas de enxofre, com importância na defesa de plantas contra uma variedade de estresses oxidativos. A glutathione é um tiol de baixo peso molecular, não proteico, e intracelular, que ajuda a manter a homeostase do status redox, além de atuar como sequestrador de EROs. Nas células vegetais atua, além de antioxidante defensivo, como elemento quelante, responsável principalmente pela detoxificação de metais pesados, e na síntese de fitoquelatinas (PCs). (Figura 8) (NOCTOR, 2012).

A glutathione existe em duas formas, isto é, sua forma, glutathione reduzida (GSH) - quelante, e a sua forma, glutathione oxidada (GSSG) – não quelante. Essas duas formas de glutathiones são mantidas através da enzima glutathione reductase (GR), um membro da família da flavoenzima, que converte a forma oxidada da glutathione para forma reduzida. A manutenção da relação GSH/GSSG é de extrema importância, pois em condições celulares normais, a GSH pode quelar e inativar metais essenciais. Os genes da GSH codificam; importantes reguladores de vias de desenvolvimento do embrião e a supressão desses genes está associado a letalidade em estágio embrionário (CAIRNS, 2006) e a falta desses reguladores está associada a maior sensibilidade ao Cd e produção de fitoquelatinas (JOZEFCZAK et al. 2015; NOCTOR, 2012).

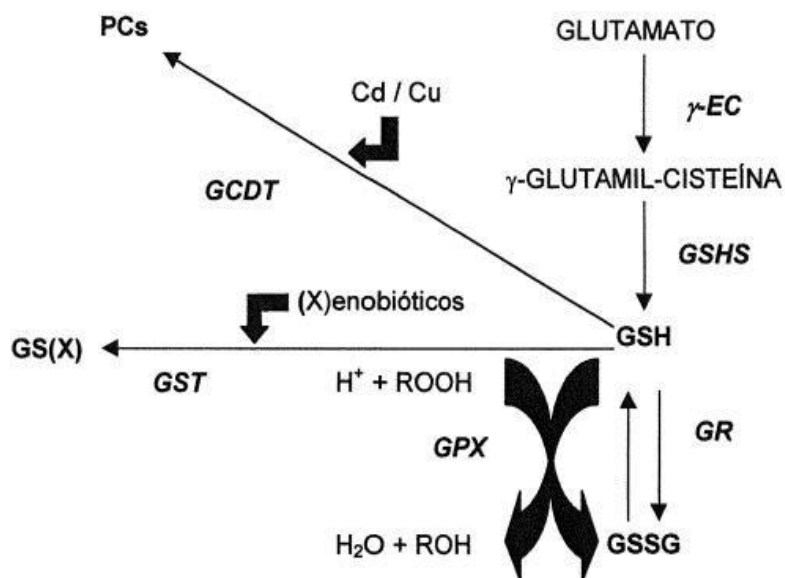


Figura 8. Representação da síntese de GSH, sua redução pela GR e utilização pela GPX, na desintoxicação de metais pesados e na síntese de fitoquelatinas (PCs). (INOUE, 2005 adaptado).

A GSH pode atuar na sinalização de expressão de enzimas antioxidantes, juntamente com a proteína glutaredoxina (GRx), que atua em processos de redução e desglutinação. A relação entre GSH-GRx ajuda a manter o equilíbrio redox celular e desempenha um papel significativo na regulação da sinalização celular proteína-proteína, além de atuar na indução de processo apoptótico (KALININA, 2014).

2.8 FITOQUELATINAS

A desintoxicação de metais pesados, especialmente cádmio, está ligada à síntese de compostos de baixo peso molecular, formados de unidades repetitivas de γ -glutamil-cisteína seguida por uma glicina na porção C-terminal, e que são caracterizados pelo conteúdo de cisteína e alta afinidade aos metais pesados, sendo denominados de fitoquelatinas (PCs).

Essas PCs são ricas em enxofre e participam do processo de complexação intracelular (quelação), constituindo os quelantes mais bem caracterizados em leveduras, fungos, algas e plantas (INOUE, 2005). As PCs são sintetizadas pela enzima fitoquelatina sintase, a partir da transpeptidação da porção γ -Glu-Cys da glutatona (GSH) (REA, 2012).

O mecanismo de ligação das PCs com Cd inclui a participação de transportadores que podem enviar os metais quelados para regiões onde a toxicidade do metal é menor, como o vacúolo (figura 8). Essa associação de PC-Cd apresenta

uma toxicidade muitas vezes menor do que aquela apresentada por íons de Cd livre (SHAHID, 2017). O Cd também pode ser quelado por proteínas ligantes menores, como as metalotioneínas e proteínas ricas em resíduos de histidina (MA, 2005).

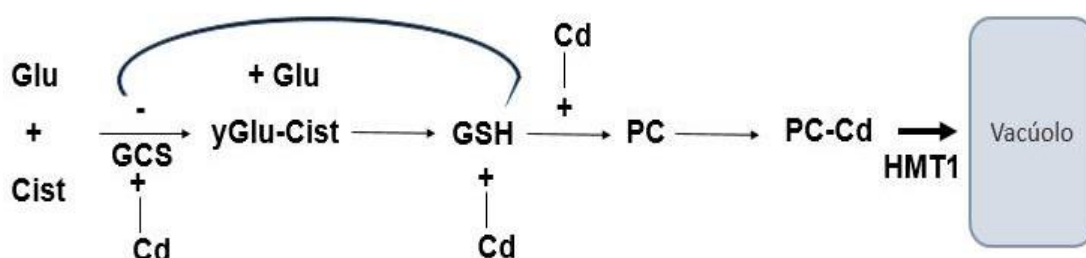


Figura 9. Representação da quelação de Cd e dos processos envolvidos na síntese de fitoquelatinas (PCs). Sinais negativos e positivos indicam a inativação ou ativação da atividade enzimática, respectivamente. Glu: glutamato; Cist: cisteína; GCS: sintetase da γ - glutamylcisteína; GS: sintetase da glutathione; GSH: glutathione reduzida; Cd: cádmio; PCS: sintetase da fitoquelatinas; PC-Cd: complexo fitoquelatina-cádmio; HMT1: transportador vacuolar (GUIMARÃES, 2008).

As metalotioneínas também podem catalisar mecanismos de proteção antioxidante, bem como reparos da membrana plasmática, tanto por danos oxidativos quanto por peroxidação lipídica. (TOMÁS, 2018).

Lentilhas-d'água em geral respondem bem à metais pesados, e fitoquelatinas e compostos quelantes, como metalotioneínas, são constantemente produzidos em resposta ao Cd. Essa resposta induzida depende da concentração de metal no meio, sendo que a indução de expressão de fitoquelatinas aumenta a tolerância da planta a concentrações que antes não resistiria (YIN, 2002).

2.9 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica atua como um indicativo de estresse oxidativo, ocasionando desestruturação dos ácidos graxos. A peroxidação de lipídios ocorre principalmente por radicais livres que acabam retirando elétron dos lipídios das membranas celulares e produzindo malondialdeído (MDA), situação que interfere na funcionalidade celular, e pode provocar danos irreversíveis ao alterar a permeabilidade membranar (GÖBEL, 2009). Os metais, como o Cd, alteram a concentração de MDA, em resposta a peroxidação lipídica aumentada em plantas, e os danos são diretamente ligados a concentração do metal, podendo produzir

compostos que induzem morte celular programa (SERPIL, 2006). Trabalhos tem mostrado o aumento da peroxidação lipídica induzidas por Cd em plantas, inclusive em lentilhas-d'água, onde a peroxidação atinge principalmente a raiz (RAZINGER, 2008)

2.10 USO DE LENTILHAS-D'ÁGUA PARA FITORREMEDIAÇÃO DE METAIS.

A fitorremediação é um processo realizado por plantas para remediar ambientes contaminados. Essa remediação de compostos indesejáveis, muitas vezes tóxicos, pode ser realizada tanto no solo quanto em ambientes aquáticos. As plantas apresentam diferentes potenciais para fitorremediar um ambiente, os quais dependem da espécie e variedade da planta, da substância contaminante, da concentração do composto e de diversos outros aspectos.

A aplicação de lentilhas-d'água para biorremediação de ambientes contaminados por metais é devido a características, dentre as quais a capacidade de acumular uma variedade de poluentes (figura 10), o crescimento rápido, a geração de biomassa e a relativa alta tolerância a determinados compostos (EKPERUSI, 2019). Essas características são favoráveis para utilização dessas espécies na avaliação de condições hídricas dos ambientes, o que vem sendo feito cada dia mais (ZIEGLER, 2019).

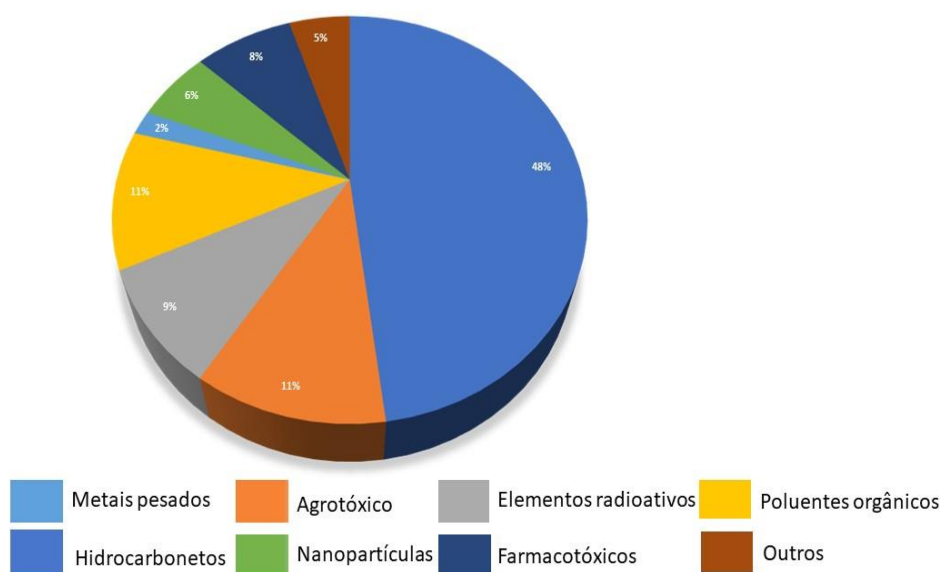


Figura 10. Principais categorias de poluentes remediadas por *Lemna minor*. (EKPERUSI, 2019).

Atualmente, por causa dos conteúdos crescentes de metais pesados nos ambientes, frutos da industrialização, a importância das lentilhas-d'água vem crescendo (BOKHARI, 2019). Entender os mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na fitorremediação auxiliam na identificação de potenciais isolados de lentilhas-d'água fitorremediadores, podendo ajudar a melhorar o controle de poluentes ambientais, e propiciar uma melhor qualidade de vida para animais e plantas.

2.11 ANÁLISE PROTEÔMICA

As plantas respondem ao estresse ambiental modulando a expressão dos seus genes, causando mudanças em níveis transcricional, traducional, pós-traducional e metabólico. A disponibilidade de estudos genômicos e proteômicos comparativos vem disponibilizando à literatura informações importantes em nível molecular.

A proteômica, neste sentido, é definida como um conjunto de proteínas e suas isoformas expressas de um determinado organismo numa determinada condição (TYERS, 2003), cujo estudo objetiva fornecer informações complementares aos mecanismos que envolvam regulação, quantidade, atividade e interação de cada proteína no interior da célula (PLOMION, 2006).

Constatar apenas os dados de expressão genética não revela a complexidade de respostas moleculares às adversidades, como os estresses por metais pesados, e desta forma, o nível da expressão dos transcritos nem sempre é correlacionado com o padrão celular das proteínas expressas. Assim, tornam-se impossíveis elucidar os diversos mecanismos que interagem em um determinado organismo, apenas pelo estudo dos genes (GRAVES, 2002). Diferentes mecanismos regulatórios podem modificar um transcrito até que este seja traduzido em uma proteína, ou mesmo eliminá-lo. Assim, para melhor entendimento e compreensão das respostas relacionadas aos estresses ambientais é necessário uma análise que mais se aproxime do fenótipo. Com isso, proteínas identificadas por metodologia como a espectrometria de massas ganha cada vez mais espaço no entendimento dos mecanismos celulares (PAPPIREDDI, 2019). Além disso, o estudo proteômico comparativo vem ganhando destaque por fornecer dados importantes de como genótipos sensíveis e tolerantes, respondem de maneira diferente em determinadas condições de estresse.

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-E), é uma técnica de

separação largamente utilizada para análises de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Esta técnica promove a separação de proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, ocorre a focalização isoeletrica (IEF), em que as amostras são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI). Na segunda dimensão, a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) separa as proteínas de acordo com a massa molecular relativa (Figura 11). (KLOSE. 1975).

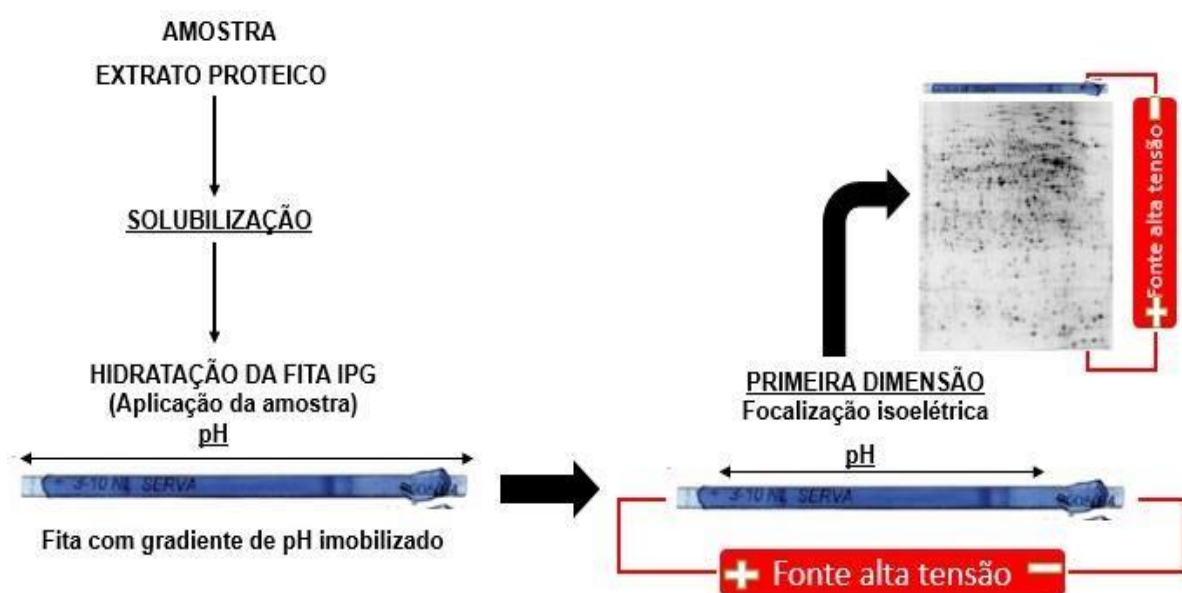


Figura 11. Esquemas mostrando as etapas envolvidas no processo de separação de uma mistura de proteínas por eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão a separação ocorre de acordo com o pI (ponto isoeletrico), enquanto a massa molecular das proteínas é usada para separação da segunda dimensão (autoria própria).

A combinação dessas duas etapas possibilita a separação de inúmeras proteínas, culminando com a construção de ricos mapas proteicos. Após a separação em 2D-PAGE, as proteínas podem ser identificadas posteriormente, usando espectrometria de massas (MS), no qual se utiliza várias técnicas, como por exemplo, MALDI-MS ou LC-MS/MS após uma digestão em gel, que são muito usadas para análise de proteomas diferenciais (PAPPIREDDI, 2019).

Obviamente é uma questão de saúde e produtividade entender como os metais afetam as plantas de maneira geral, a análise proteômica nesse sentido, fornece mais dados para fins de melhoramento genético das plantas. Estudos proteômicos envolvendo metais pesados são comuns entre variedades de plantas com fins

comerciais, (BORGES, 2019), porém proteômica de lentilhas-d'água envolvendo metais pesados são bem escassos. Trabalhos com alumínio (YIN, 2002) começaram a ser abordados em lentilhas-d'água e mesmo não se tratando de metal pesado, abriu caminho para pesquisas nessa área, como por exemplo, proteômica de *Lemna aequinoctialis* sob estresse por chumbo (FREITAS, 2020 “no prelo”).

De maneira geral, a análise proteômica identifica não apenas o conjunto de proteínas de uma amostra, mas também caracteriza as inúmeras isoformas das proteínas, produtos de modificações pós-traducionais e a interação dessas proteínas entre si (interatômica). Assim, a identificação de proteínas (e genes) responsáveis por qualidades agronomicamente desejáveis é fundamental, bem como a manipulação desses genes por meio de técnicas de biologia molecular podem contribuir no melhoramento genético, ajudando na produção e qualidades melhores das variedades e cultivares de plantas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO.

Foi utilizado o isolado M1 de *Lemna aequinoctialis* (clone RDSC5570) da coleção de Lemnoideae do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP) localizado na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os isolados foram coletados na região metropolitana do Recife, estado de Pernambuco, região Nordeste brasileiro, fora de áreas de proteção ambiental e são mantidos in vitro sob condições axênicas em meio de cultura do tipo SH 0,5X (Basal Salt Mixture, SIGMA), suplementado com sacarose (10 g.L^{-1}), inositol ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) e solução de vitaminas - tiamina e piridoxina (1 mL.L^{-1}) e pH 5,8. Os clones são mantidos em sala de crescimento com controle da intensidade luminosa ($57,2 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), fotoperíodo (18h/6h – luz/escuro) e temperatura (23°C).

3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO (CD).

Inicialmente 10 frondes do clone M1 de *L. aequinoctialis* foram cultivadas em diferentes concentrações de Cloreto de Cádmio (CdCl_2): 0 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 25 μM e 50 μM .

O desenho experimental foi casualizado em esquema fatorial 1x4 (1 isolado para cada 4 tratamentos) e o desenho experimental foi realizado em triplicata biológica para cada tratamento e para o total de coletas, representado cada dia específico (dia 2; 4; 6; 8; 10 e 12). Em seguida as frondes foram coletadas e utilizadas para determinação de massa seca, massa fresca, taxa de duplicação, clorose aparente e taxa de inibição de crescimento.

3.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

A taxa de crescimento foi realizada a partir do tamanho médio das frondes e 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., (2015).

A taxa de crescimento relativo (TCR), foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{TCR} = (\ln W_{t2} - \ln W_{t1}) / (T2 - T1)$$

Onde, $\ln$ = logaritmo neperiano, W_{t1} e W_{t2} representam o peso 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:

$$\text{RB} = (W2 - W1) / S / (T2 - T1)$$

Onde, $W1$ e $W2$ representa o peso no tempo inicial $T1$ (0 dias) e tempo final $T2$ (12 dias) e " S " representa a área em cm^3 ocupada pelos clones no recipiente contendo meio de cultura. A taxa de inibição (TI) foi mensurada pela equação:

$$\text{TI} = (1 - W_{\text{tratamento}} / W_{\text{controle}})$$

Onde $W_{\text{tratamento}}$ é o peso do condição tratada e W_{controle} é o peso da condição controle. O tempo de duplicação (TD) foi calculado a partir da equação:

$$\text{TD} = \ln(2) / \text{TCR}$$

Onde a $\ln(2)$ = logaritmo neperiano multiplicado por 2 é dividido pelo valor da TCR.

3.4 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE BIOACUMULAÇÃO E FITORREMEDIAÇÃO DE CÁDMIO.

Para a quantificação do acúmulo dos íons de Cd nas frondes e no meio de cultura, 0,1 g das amostras foram digeridas em 8 ml de ácido nítrico destilado (HNO_3). As quantificações foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica com forno de Grafite, realizado no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (SEAMB-CETENE). O cálculo de bioextração ou fator de bioacumulação (BCF) é baseado na capacidade da planta em absorver determinado elemento (CHAUDHURI, 2014), ele pode ser calculado de acordo coma equação:

BCF = concentração de metal na planta (mg/Kg) /concentração do metal no meio de cultura (mg/L)

3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES

O teor de clorofila a, b e total (a+b) e de carotenoides foi determinado por (LICHTENTHALER, 1987). Todo procedimento foi realizado em ambiente fechado, na presença de luz verde, para evitar a degradação da clorofila. Inicialmente 200 mg do tecido vegetal foram macerados em N₂ líquido, solubilizados em 10 ml de acetona 80%. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo e as seguintes absorbâncias (ABS) foram lidas: 470, 646.8, 663.2 e 710 nm. Esses valores foram utilizados nas equações abaixo para calcular a concentração dos pigmentos fotossintetizantes:

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

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

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

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

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

3.7 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A extração das proteínas foi realizada a partir do método SDS/DENSO (Pirovani et al., 2008). Utilizou-se aproximadamente 500 mg do tecido vegetal macerado em N₂ líquido, até a obtenção de um pó fino, 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%). A solução ficou agitando em gelo por 30 minutos, intercalando-se com vórtex, adicionou-se 5 ml de fenol na solução, homogeneizando em gelo por 30 minutos, intercalando-se com

vórtex. O homogeneizado foi centrifugado em 7.850 rpm, a 4 °C por 30 minutos e após esse processo, o sobrenadante fenólico foi removido e colocado em novo tubo, adicionou-se 25 ml de acetato de amônio em metanol gelado e deixado precipitar overnight em freezer a - 20 °C por um período de 15 horas. Posteriormente, a solução foi novamente centrifugada em 7.850 rpm a 4 °C e o sobrenadante descartado. O pellet proteico então passou por sucessivas lavagens com metanol, acetona e etanol em tubos eppendorf de 2 ml, centrifugado em 14.000 rpm, após as lavagens o precipitado foi solubilizado/ressuspenido em 100 uL de tampão de ureia e tiourea (7M:3M). e armazenado a -80°C.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para determinação precisa de proteínas em amostras preparadas para técnicas de eletroforese, foi realizada a quantificação a partir do método colorimétrico, utilizando o Kit 2-D Quant - GE Healthcare, seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, foi realizado uma curva padrão de BSA e através das ligações específicas dos íons de cobre as proteínas, 5 µl do extrato proteico foi utilizado e a leitura da absorbância realizada em 480 nm.

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

Foram realizadas triplicatas técnicas para cada condição contrastante (controle e estresse metal pesado). A primeira dimensão da eletroforese foi realizada por focalização isoeletrica e ocorreu com 150 µg de proteínas de cada extrato e aplicadas sob fitas impregnadas com acrilamida desidratada (IPG 13 cm, gradiente de pH 3-10 linear; GE Life Science), as quais foram reidratadas durante 12 horas a 20°C e focalizadas no dispositivo IPGphor III (GE Life Sciences). Após a focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas no freezer -80°C. A segunda dimensão da eletroforese foi conduzida em gel de poliacrilamida (10 %), no sistema Omniphor MV 20 (Biosystems).

As imagens dos géis 2D do proteoma foram digitalizadas no Image Scanner III (GE Life Sciences) com uso do programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences). As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do software Image Master 2D Platinum v7.0.5

(GE Life Sciences).

A identificação e seleção dos peptídeos diferenciais, ou DAPs (spots), produzidos foi realizada conforme ferramentas do programa (análise de matches), sendo selecionados os spots que apresentaram variação significativa (ratio) na porcentagem de volume (%vol.) entre géis comparados.

Os spots diferencialmente acumulados foram manualmente excisados, a partir do gel onde tenha apresentado maior volume, em seguida estes foram digeridos com tripsina, de acordo com o protocolo descrito por Shevchenko et al. (2006). Os peptídeos foram extraídos em solução contendo TFA 5% e acetonitrila 50%, e as soluções foram concentradas em SpeedVac, sendo armazenadas a -20° até análise por espectrometria de massas Maldi-ToF-ToF.

Para análise de espectrometria de massas, os peptídeos foram solubilizados em 10 µL de solução TFA 0,1%, e em seguida foram misturados em solução de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 1%; acetonitrila 50%; TFA 0,3%), e montados em uma placa MTP 384 target (Bruker Daltonics). Após secagem das amostras em temperatura ambiente e completa cristalização da matriz, os espectros MS foram adquiridos no Autoflex III MALDI-ToF (Bruker Daltonics). Parâmetros foram ajustados para o modo de reflexão iônica positiva com uma tensão de aceleração de 20 kV, admitindo: taxa de disparo de 100 Hz; faixa de massas de 700,0–5.000,0 Da; intensidade de laser 20-30%; 2.100-4.000 disparos acumulados por espectro. O equipamento, por sua vez, foi calibrado utilizando uma mistura peptídica $[M + H]^+$ íons para calibração padrão de MALDI ToF/MS. Os arquivos peaklist.xml foram gerados a partir do programa FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics).

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 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 30 - 50 ppm.

3.10 ONTOLOGIA GÊNICA (GO)

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas da base de dados UniProt, através da ferramenta Retrieve ID, e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico, função molecular e localização subcelular no programa OmicsBox/Blast2GO (<https://www.biobam.com/omicsbox/>), utilizando as ferramentas Blastp, 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.

3.11 REDE DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas dos diferentes tratamentos foram recuperadas de banco UniProt, através da ferramenta Retrieve ID (<https://www.uniprot.org>), alinhadas no blastp contra o banco de dados curados do UniProt/SwissProt com alinhamento base na espécie *Arabidopsis sp.* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e selecionados os melhores hits de alinhamento. Desta forma, acessos foram submetidos à interação por string no programa Cytoscape (versão 3.8.0) (<http://www.cytoscape.org>), ferramenta utilizada para carregamento de conjunto de dados para interação genética e molecular (SHANNON, 2003), para formação da rede de interação proteína-proteína, obedecendo seu coeficiente de variação (*Ratio*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO.

O ensaio realizado com diferentes concentrações de Cloreto de Cádmio (CdCl_2) demonstraram alterações na dinâmica de crescimento de *L. aequinoctialis* clone RDSC5570 (Figura. 12).

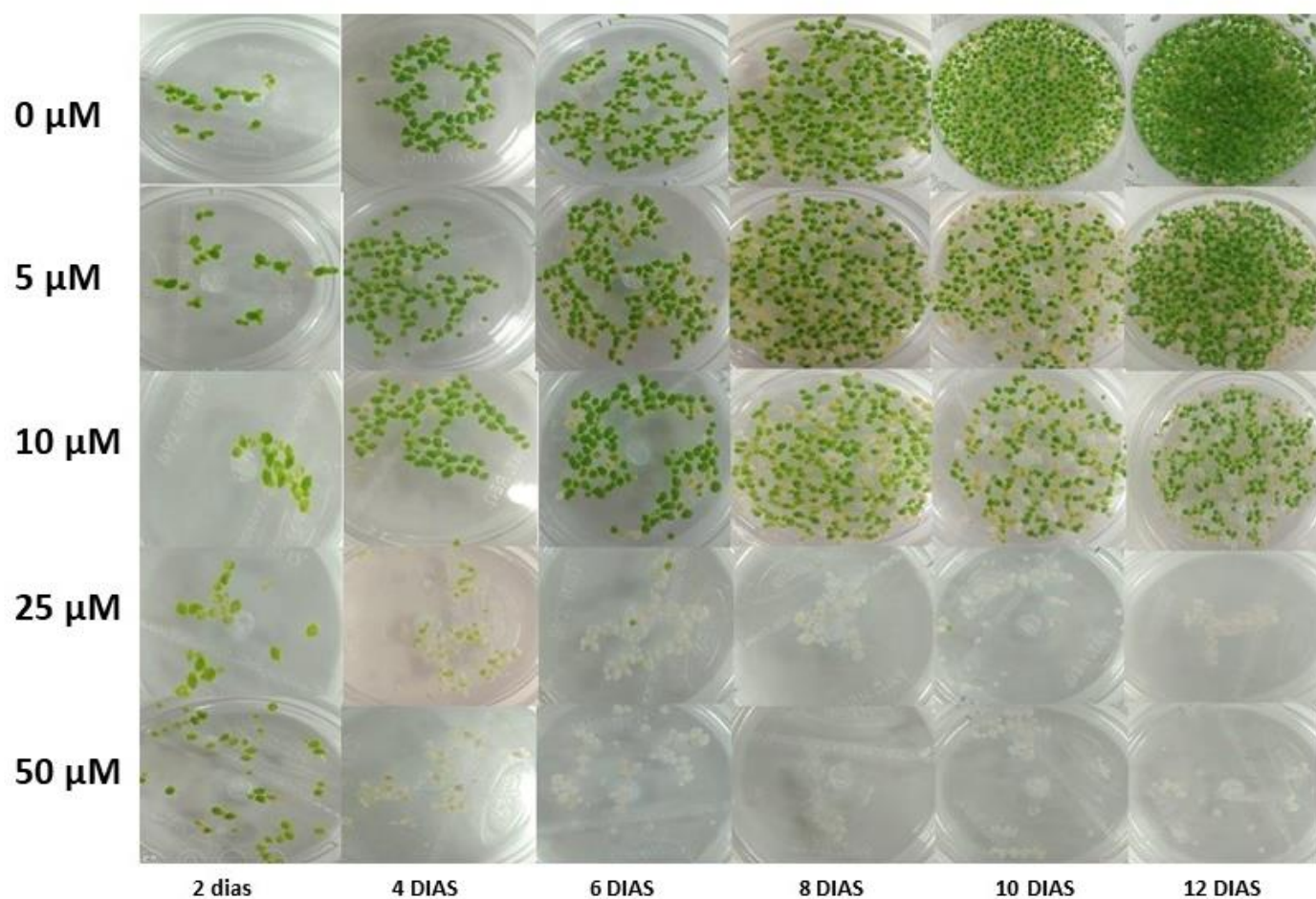


Figura 12. Dinâmica de crescimento do isolado RDSC5570 de *Lemna aequinoctialis* cultivado na presença de diferentes concentrações de Cloreto de Cádmio (CdCl_2) ao longo de 12 dias. (autoria própria)

A análise inicial da dinâmica de crescimento foi necessária para determinar as concentrações ideais contrastantes para a análise de proteômica diferencial. Os resultados mostraram uma significativa diferença entre os tratamentos onde a concentração com maior proximidade da taxa sub-letal de crescimento foi a de 10 μM de cloreto de cádmio (CdCl_2), indicando assim a concentração ideal para as análises subsequentes. O nível de toxicidade observada é diretamente proporcional à concentração de Cd no meio, pois concentrações acima de 25 μM nos nossos experimentos já apresentam um nível de toxicidade que *Lemna aequinoctialis* não consegue suportar, apresentando clorose crônica, necrose celular e por fim a morte de plantas. Trabalho semelhante (YIN, 2002) com *Lemna aequinoctialis* constataram resultados similares, em condições controladas de crescimento, em que concentrações acima de 50 μM de Cd as plantas não conseguem resistir e morrem.

4.1.1 Tamanho das Frondes

Foi observado uma significativa variação no tamanho das frondes de *Lemna aequinoctialis* submetidos a estresse de 10 μM de Cd ao final do 12^a dia. Os tamanhos das frondes dos tratamentos foram comparados as dos clones controle ao final do período experimental. (Figura 13).

As populações clonais que cresceram na ausência de CdCl_2 obtiveram em média um tamanho de 1,1 cm; enquanto as populações que sofreram estresse por CdCl_2 tiveram um decréscimo de crescimento, onde em média as populações tiveram um tamanho de 0,5 cm.

O tamanho médio das frondes de *L. aequinoctialis* foi significativamente menor quando submetidas ao estresse por Cd. Em macrófitas da mesma família, a toxicidade do Cd atua de forma a tornar a fronde esbranquiçada e promover o encurtamento ou descolamento da raiz da fronde (CHAUDHURI, 2014). Já quando analisamos a exposição de *L. aequinoctialis* ao Cd pode-se observar que a taxa de inibição do crescimento está diretamente ligada a concentração desse metal no meio (YIN, 2002), corroborando nosso trabalho, afetando o crescimento de maneira diretamente proporcional a concentração e ao tempo de exposição, mesmo que embora alguns mecanismos de tolerância de plantas possam aparecer mais tardiamente (YIN, 2002).

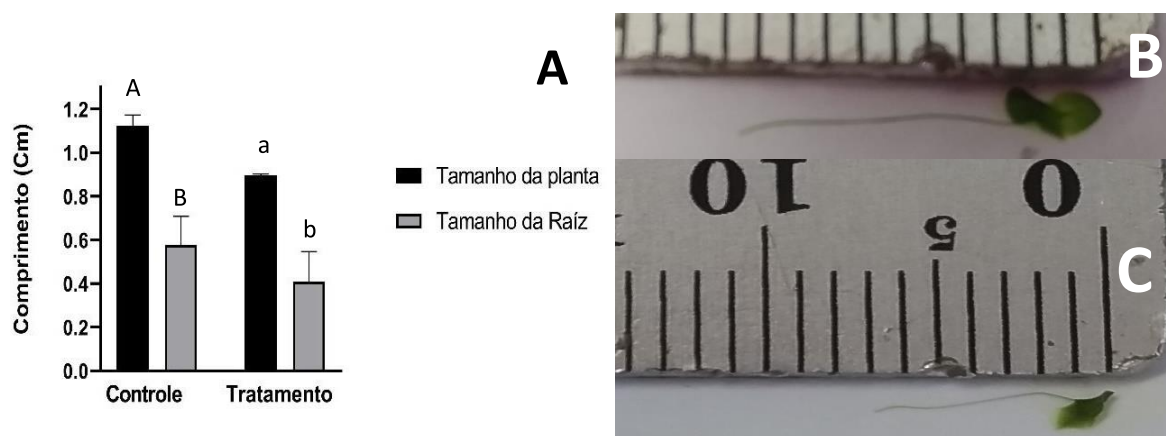


Figura 13. Representação dos tamanhos das frondes e das raízes do isolado RDSC5570 de *Lemna aequinoctialis* observadas no tratamento com 10 μM de CdCl_2 , após 12 dias A) Gráfico do tamanho das frondes com a raiz B) Tamanho das frondes no controle com a raiz C) Tamanho das frondes com a raiz no Estresse por Cd. Anova e teste Tukey estabelecidos em $p < 0,05$

Observou-se também uma diminuição significativa no tamanho médio das frondes sem a raiz, dos tratamentos com CdCl_2 quando comparadas as populações sem o estresse aplicado. Os tamanhos das frondes da população clonal sem o CdCl_2 obtiveram um valor aproximado de 0,2 cm, enquanto os clones submetidos ao estresse apresentaram tamanho médio de fronde de 0,1 cm.

4.1.2 Análises de fitorremediação de Cádmio

A quantificação de cádmio em 0,1 g de amostra da planta tratada com 10 μM de CdCl_2 indicou acúmulo de cerca de 97,3 mg/kg de massa seca, enquanto a amostra controle (ausência de Cd) não apresentou concentrações mínimas determináveis do metal: $\pm 0,6$ mg/kg (figura 14).

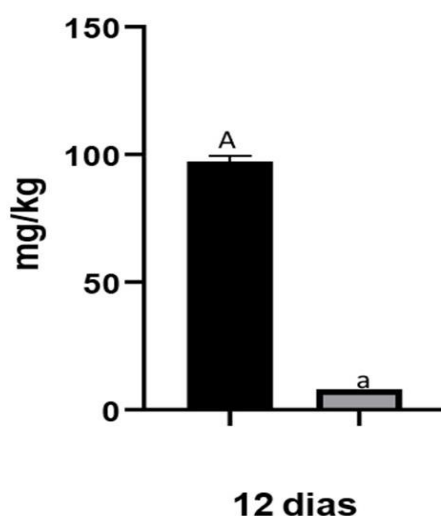


Figura 14. Gráfico ilustrativo da capacidade fitorremediadora de *L. aequinoctialis* sob tratamento com 10 μ M de Cd. Incerteza < 8 mg/kg. Barra preta representa o experimento com Cd, barras cinza representa o experimento controle. Análise realizada em triplicata, valores com base nas médias de acumulação de cada. Anova e teste Tukey estabelecidos em $p < 0,05$

Analisando a concentração obtida por espectrometria de adsorção em chamas foi evidente, a significância de *L. aequinoctialis* em absorver Cd do meio. O BFC, fator de bioacumulação, pode ser traduzido como a capacidade que um organismo possui de reter substâncias do meio, com 97,3 mg/kg conseguimos obter um BFC total de 784,4, indicando que a espécie *L. aequinoctialis* é uma boa planta para estratégias de fitorremediação. Estudos indicam que plantas que apresentam o BFC entre 500 - 1300 podem ser classificadas como boas plantas fitoremediadoras. (ZAYED, 1998). *Lemna aequinoctialis* em trabalhos semelhantes conseguiu reter cerca de 90% de Cd da água, o conteúdo total na planta foi de cerca de 105 μ g considerando um bom fitorremediador para águas contaminadas (BOKHARI, 2019).

4.1.3 Taxa de crescimento relativo (TCR)

Quando comparadas as populações que não foram submetidas ao CdCl_2 , os clones dos tratamentos com 5 μ M; 10 μ M; 25 μ M e 50 μ M de CdCl_2 , tiveram uma redução do potencial de crescimento de 18%; 54%; 880% e 2000%, respectivamente, em crescimento.

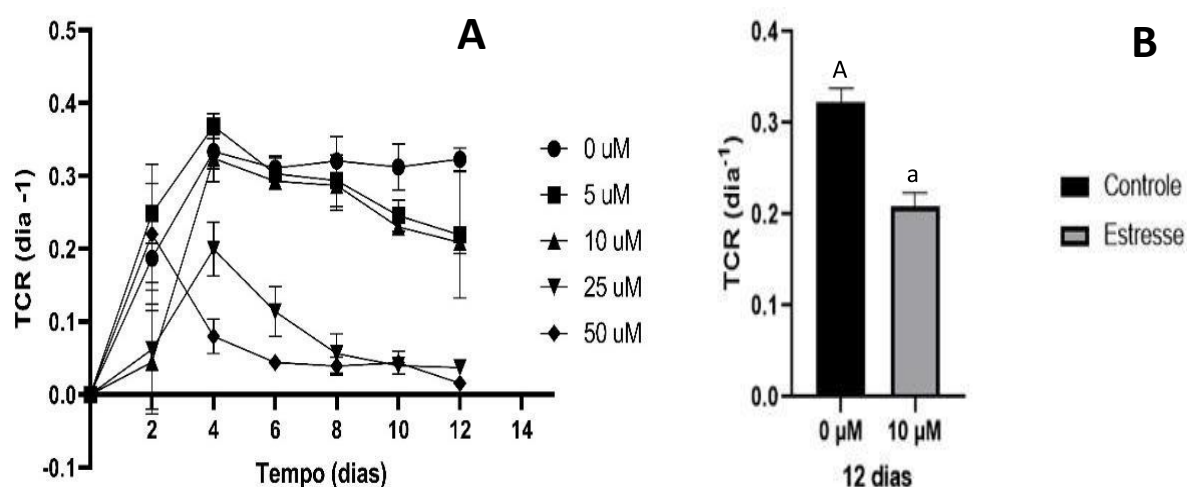


Figura 15. Taxa de crescimento relativo de *L. aequinoctialis* em resposta a Cloreto de Cádmio (CdCl_2). A) Gráfico demonstrativo dos valores de crescimento relativo de cada tratamento ao longo do período de 12 dias. Cada dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. B) Gráfico da taxa de crescimento relativo ao final do 12^a dia do tratamento de 10 μM CdCl_2 . Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste Tukey estabelecidos em $p < 0,05$.

A taxa de crescimento relativo (TCR) é utilizado com frequência para avaliar a capacidade da planta a resistir a fatores estressantes e o quanto isso acaba impactando seu desenvolvimento. Trabalhos envolvendo lentilhas submetidas ao estresse por Cd, já mostraram a diminuição do crescimento em decorrência do estresse associada ao acúmulo de Cd (CHAUDHURI, 2014), e morte associada à concentração maiores que 50 μM (YIN, 2002). O percentual de inibição do crescimento é diretamente proporcional a concentração do metal no meio. Neumann et al, (2007), em experimento envolvendo *Lemna minor*, mostraram que concentrações menores que 1 μM de Cd pode causar inibição do crescimento em até 50% em termos de peso fresco das frondes, isso também foi comprovado quando utilizado *Lemna gibba* submetida à baixas concentrações de Cd (MEGATELI et al, 2009).

4.1.4 Taxa de Inibição (TI)

As populações clonais do isolado de *L. aequinoctialis* que foram submetidas ao tratamento com CdCl_2 , obtiveram uma taxa de inibição de crescimento, em comparação aos clones sem o tratamento, de respectivamente 45% em 5 μM ; 74% em 10 μM ; 96% em 25 μM e 97% em 50 μM .

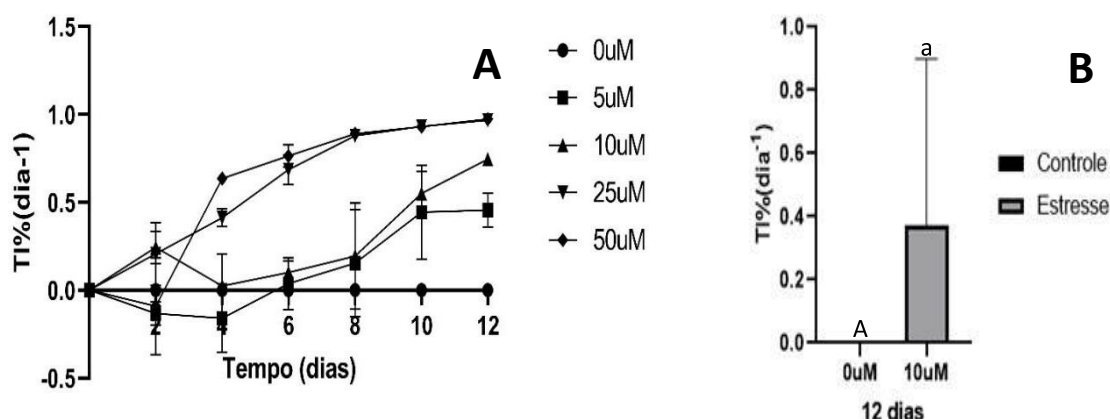


Figura 16. Taxa de inibição do crescimento de *Lemna aequinoctialis* em resposta ao Cloreto de Cádmio (CdCl₂). A) Gráfico demonstrativo dos valores de inibição de cada tratamento ao longo do período de 12 dias. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. B) Gráfico da taxa de inibição ao final do 12º dia do tratamento de 10 µM CdCl₂. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p < 0,05$.

Um outro efeito notório no tratamento com Cd foi a taxa de inibição, a toxicidade do metal interfere no crescimento e biomassa da planta, esses fatores estão diretamente relacionados a inibição, o desenvolvimento da planta depende de um controle rigoroso das atividades celulares e condições estressantes podem influenciar nesse equilíbrio.

Em trabalhos com lentilhas-d'água, os autores observaram resultados semelhantes, como o aumento da inibição dependente do aumento da concentração do metal (VIDAKOVIĆ, 2015; BOKHARI, 2019). Esses trabalhos mostram que efeitos inibitórios se iniciam após o segundo dia.

4.1.5 Rendimento de Biomassa (RB)

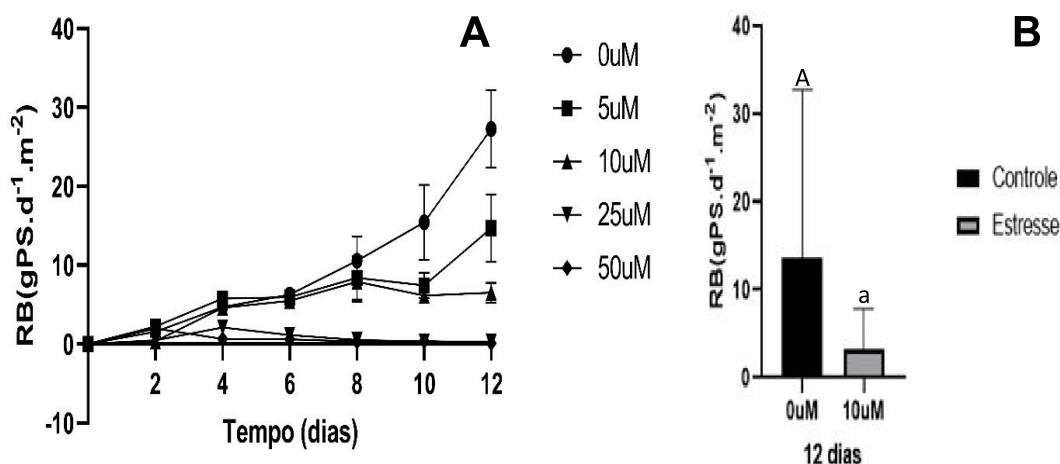


Figura 17. Rendimento de Biomassa em *Lemna aequinoctialis* em resposta ao Cloreto de Cádmio (CdCl₂). A) Gráfico demonstrativo dos valores de rendimento de cada tratamento ao longo do período de 12 dias. Cada ponto do dado representa a média dos valores das triplicatas biológicas. B) Gráfico do rendimento ao final do 12º dia do tratamento de 10 µM CdCl₂. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste de Tukey estabelecidos em $p < 0,05$.

O rendimento de biomassa foi consideravelmente menor nas espécies expostas ao Cd, de modo que, as frondes em decorrência do seu tamanho, relativamente menor, apresentam uma estrutura foliar reduzida e por vezes com sistema radicular reduzido.

4.1.6 Tempo de duplicação (TD)

O tempo de duplicação é mensurado em dias⁻¹, leva em consideração quanto tempo *Lemna aequinoctialis* leva para duplicar o tamanho de sua biomassa.

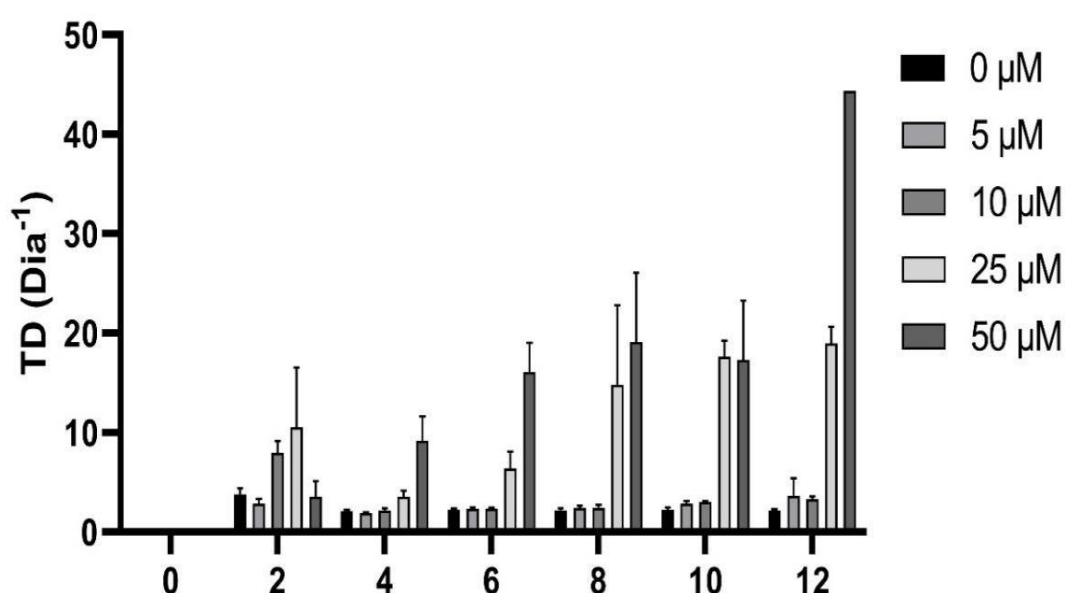


Figura 18. Tempo de duplicação em *Lemna aequinoctialis* em resposta ao Cloreto de Cádmio (CdCl_2). A) Gráfico demonstrativo dos valores de tempo de duplicação em cada tratamento ao longo do período de 12 dias. Cada conjunto de barras representa os valores das médias das triplicatas biológicas. Barras de erros indicam o desvio-padrão. Anova e teste Tukey estabelecidos em $p < 0,05$.

O tempo de duplicação de *Lemna aequinoctialis* levou pouco mais de dois dias para duplicar sua quantidade populacional inicial, na condição controle. Já observamos que em condições controladas as lentilhas-d'água podem duplicar de tamanho em menos de 2 dias, em condições de toxicidade severa por metal, ou seja, altas concentrações de metal por longos períodos, o crescimento é inibido proporcionalmente (BOKHARI, 2019).

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTETICOS

Foram observadas diferenças significativas para os teores de clorofila a, clorofila b e clorofilas totais entre a condição controle e o tratamento com 10 μM de CdCl_2 . Os teores de clorofila a e totais foram reduzidos na condição estresse, sendo que a clorofila a reduziu de 0,851 g.kg^{-1} de matéria seca (MS) para 0,236 g.kg^{-1} MS após o tratamento, enquanto que a clorofila b ocorreu um declínio de 0,222 g.kg^{-1} para 0,065 g.kg^{-1} MS (Figura 19). Os teores de carotenoides embora tenham ocorrido uma pequena diminuição, não apresentam diferença significativa entre os tratamentos.

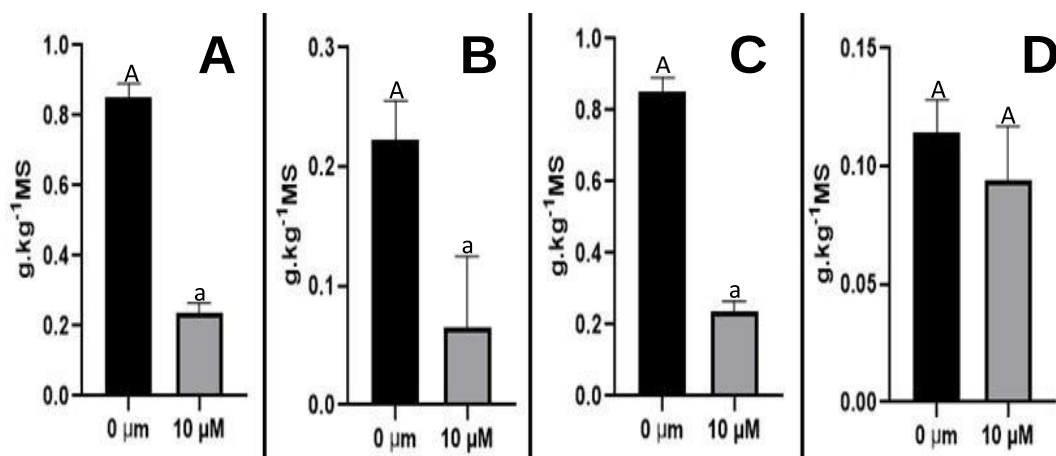


Figura 19. Teores globais de clorofila e carotenoides nas populações clonais de *L. aequinoctialis* submetidas a dois tratamentos: 0 μM Cd (controle) e 10 μM de Cd (Estresse). Clorofila a; B) Clorofila b; C) Clorofila totais; D) Carotenoides (Média $\pm$ DP, n=3). Anova estabelecida em $p < 0,05$ *valores do carotenoide não significativo.

Estudo envolvendo características de inibição fotossintética de *Triticum sp.* identificou danos promovidos pelo Cd no tecido foliar, como clorose, necrose foliar e redução das raízes (PAUNOV, 2018). O trabalho mostrou também que o Cd promoveu diminuição da eficiência de captura e de transferência de energia do PSII, bem como a diminuição da concentração de clorofila a. A exposição ao Cd provoca uma diminuição da transferência de energia do complexo de antena para a clorofila, reduzindo de maneira geral a eficiência fotossintética.

O estresse por Cd afeta a fotossíntese de várias formas, mas basicamente a interação com metais, principalmente metais bivalentes, diminui a síntese de clorofila

e promove a substituição do Mg^{2+} pelo Cd (KÜPPER et al, 1996), o que acarreta a dissipação do calor nos complexos de antena ou centros de reação, além de danificar os tilacoides.

Trabalhos envolvendo plantas de arroz, *Oryza sativa*, submetidas ao tratamento com Cd (0 μM , 50 μM e 100 μM) demonstraram uma inibição de cerca de 60,8% de clorofila a e 50,5% de clorofila b, indicando que a clorofila a seria mais sensível ao Cd do que a clorofila b (WANG et al, 2014). Em mesmo trabalho, o conteúdo de Carotenoide foi menos afetado, sugerindo que os carotenoides atuam de maneira eficiente na fotoproteção de clorofila e cloroplastos contra danos oxidativos. Deve ser ressaltado que as espécies aquáticas sofrem menos danos oxidativos, devido ao contato direto com a água.

Estudo em espinafre, *Spinacia oleraceae*, indicou que o Cd age de maneira danosa contra proteínas de membrana dos tilacoides, concorrendo também na substituição de íons metálicos de diversas enzimas, favorecendo o aumento do estresse oxidativo, diminuindo a síntese de clorofila a e b, e causando baixa eficiência fotossintética (FAGIONI et al, 2009).

Em trabalhos com *L. aequinoctialis* e *Spirodela polyrrhyza*, avaliando a interação destas no acúmulo de diferentes metais (cobre, cádmio e zinco), se observou uma diminuição da concentração de clorofila a e b, em concentrações maiores que 10 μM de metal, sugerindo que a interação interespecífica dessas macrófitas pode alterar a acumulação de certos metais de maneira significativa (ZHAO et al, 2017; FREITAS, 2020 “no prelo”).

4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

O método de extração de proteínas por SDS-Denso (PIROVANI, 2008) permitiu obter e solubilizar proteínas 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.

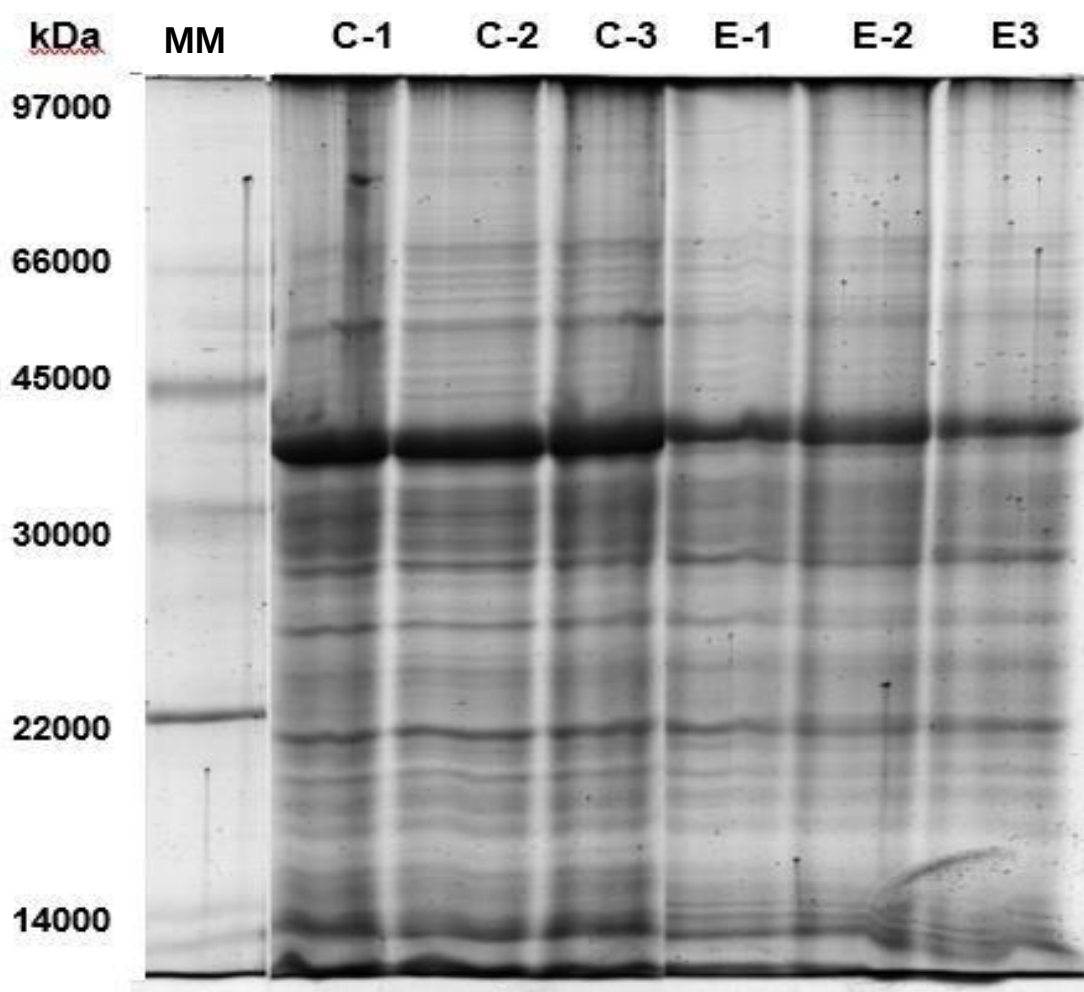
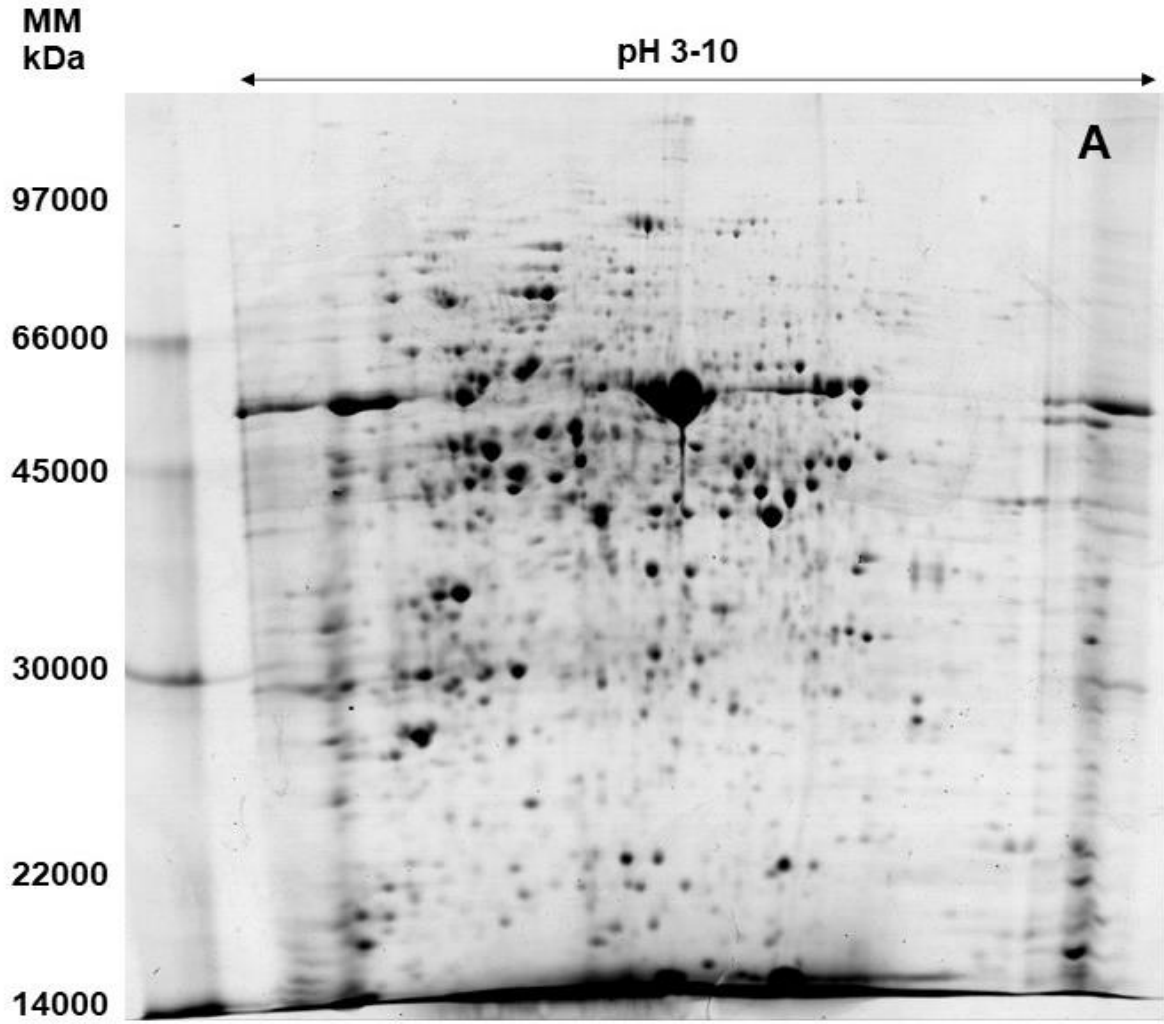


Figura 20. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5% das proteínas solúveis totais de *L. aequinoctialis* clone RDSC5570 submetidas a dois tratamentos: 0 μM (C-1,C-2,C-3) X 10 μM (E-1,E-2,E-3). MM marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare em kDa)

A eletroforese bidimensional permitiu a detecção de uma média de 248 spots diferencialmente significativos (ANOVA). O coeficiente de correlação (scatter plots) entre as três réplicas dos géis 2D de cada tratamento foi de + 0,96, ou seja, significativo (≥ 0.7), na qual a correlação ficou entre 0,96 e 0,97 respectivamente na condição 0 μM e 10 μM , demonstrando assim a baixa variação experimental entre as réplicas de um mesmo tratamento. A quantidade de spots encontrados em todos os géis foram de 945, destes, foram identificados 248 spots com variação significativa de acumulação, totalizando 169 spots exclusivos: 41 spots no gel controle, e 128 spots no gel com estresse de 10 μM CdCl_2 . Os demais, 79 spots foram detectados em ambos os tratamentos (comuns).



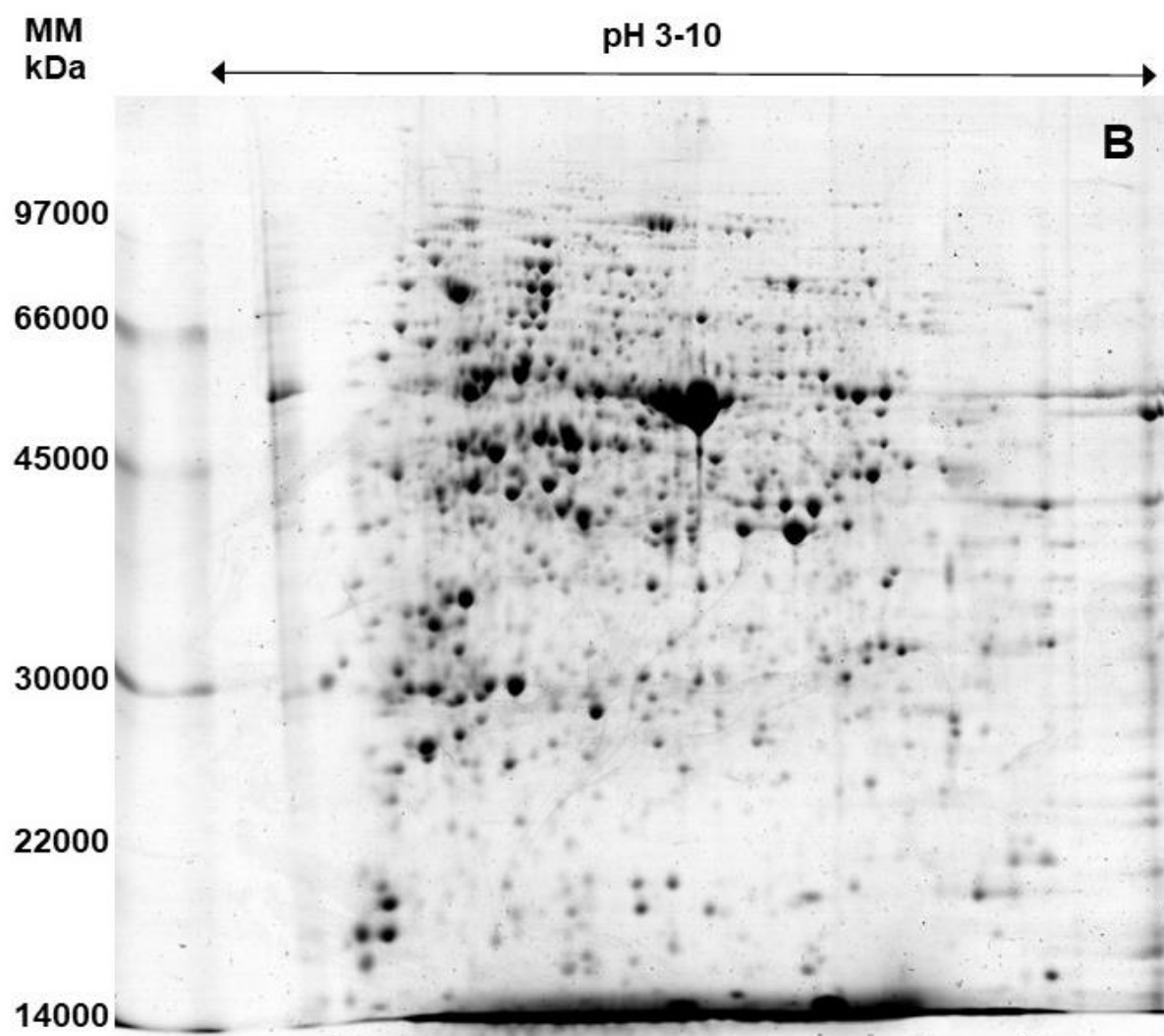


Figura 21. – Análise do gel SDS-PAGE bidimensional do isolado M1 de *Lemna aequinoctialis* utilizando o software Image Master 2D Platinum **A)** Spots da condição controle (0 μ M CdCl₂) Spots da condição estresse (10 μ M de CdCl₂). MM marcador de baixo peso molecular (GEHealthcare em kDa)

Foram obtidos aproximadamente 3x mais spots diferenciais no gel sob tratamento com Cd em comparação ao gel controle.



Figura 22. Diagrama de Venn representando a quantidade de spots encontrados nos géis controle ($0 \mu\text{M}$ de CdCl_2), nos géis tratados ($10 \mu\text{M}$ de CdCl_2) e em ambos os géis.

Os géis variaram na quantidade de spots por determinadas faixas de pH e de massa molecular. O maior número de spots ficou na faixa de 5-8 no gel controle e de 4-7 no gel com tratamento com Cd, enquanto a massa molecular de 20-40 kDa concentrou o maior número de spots. (Figura 23). A quantidade de spots encontrados no gel do tratamento com Cd sugere haver maior regulação positiva dos genes nesse tratamento, como consequência, maior número de proteínas acumuladas.

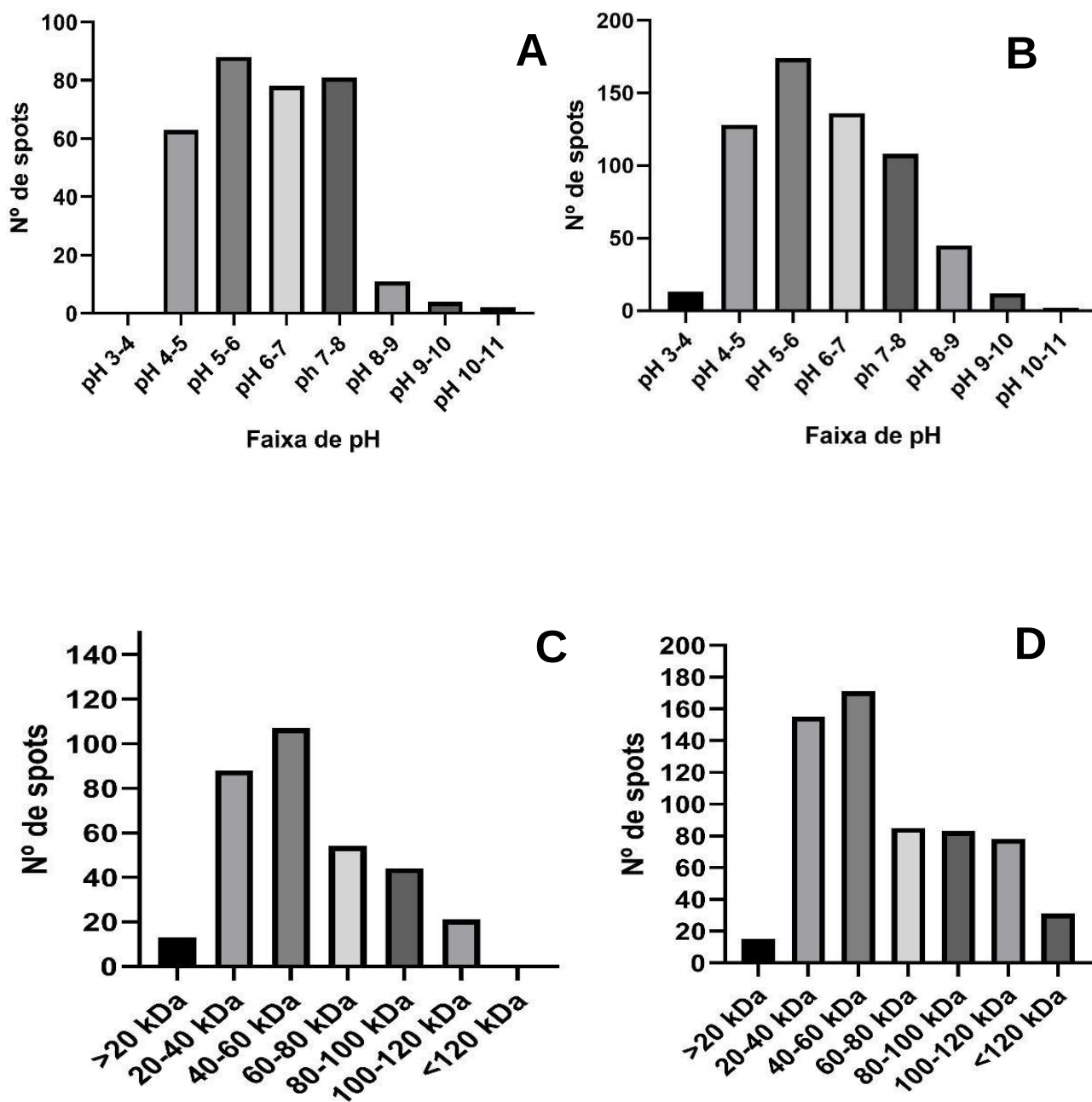


Figura 23. Relação entre pH e massa molecular dos spots dos géis analisados de *Lemna aequinoctialis* (controle x estresse). A) Quantidade de spots no gel controle por faixa de pH. B) Quantidade de spots no gel referente ao tratamento com Cd por faixa de pH. C) Spots do gel controle por faixa de peso molecular. D) Spots do gel referente ao tratamento com Cd por faixa de peso molecular.

4.3.1 Proteínas diferenciais

Foram identificadas 153 proteínas diferenciais (DAPs), o que corresponde a cerca de (~61%) do total de proteínas diferencialmente acumuladas, sendo 30 proteínas (12%) na condição controle, 81 proteínas (32%) na condição estresse, ou seja, na presença de Cd e por fim, 42 (~17%) proteínas comuns, encontradas em ambos os tratamentos. As proteínas foram agrupadas e classificadas de acordo com sua maior acumulação no gel, e as proteínas comuns classificadas de acordo com maior variação de acumulação.

4.3.2 Ontologia Gênica

A análise de ontologia gênica em termos representativo para diversas etapas, como localização subcelular, processos biológicos e função molecular das DAPs, estão representadas nos gráficos abaixo

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR

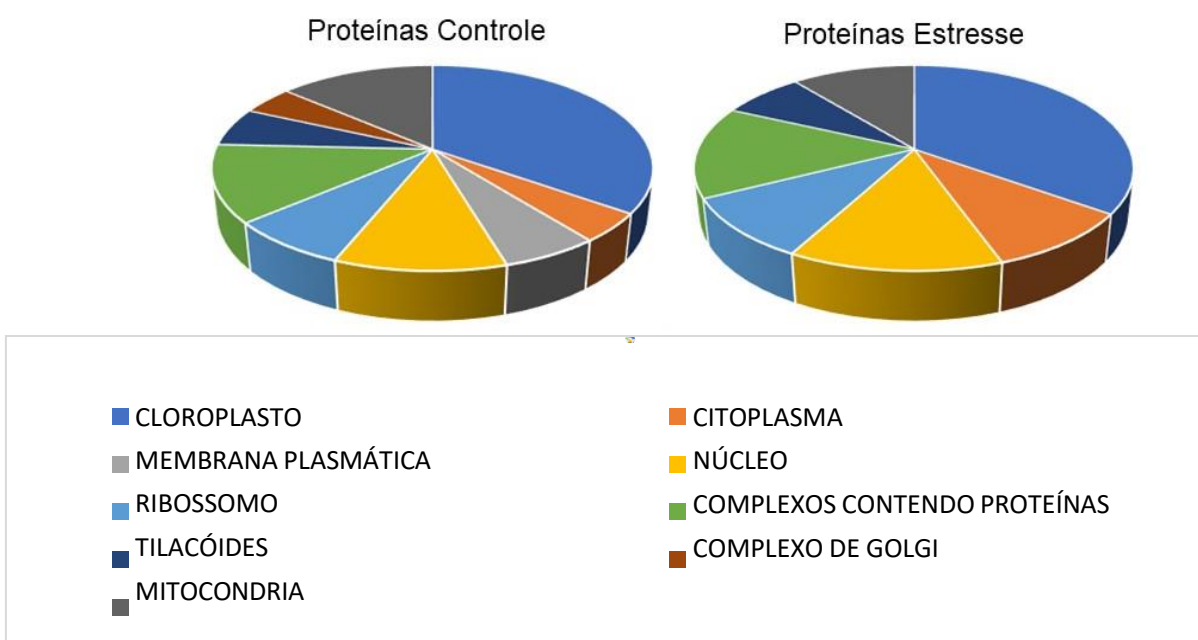


Figura 24. Categorização dos termos de ontologia gênica para proteínas diferencialmente acumuladas em *Lemna aequinoctialis*. Gráficos representativos da localização subcelular das proteínas diferenciais de *L. aequinoctialis* submetidas ao tratamento sem e com Cádmio, respectivamente.

FUNÇÃO MOLECULAR

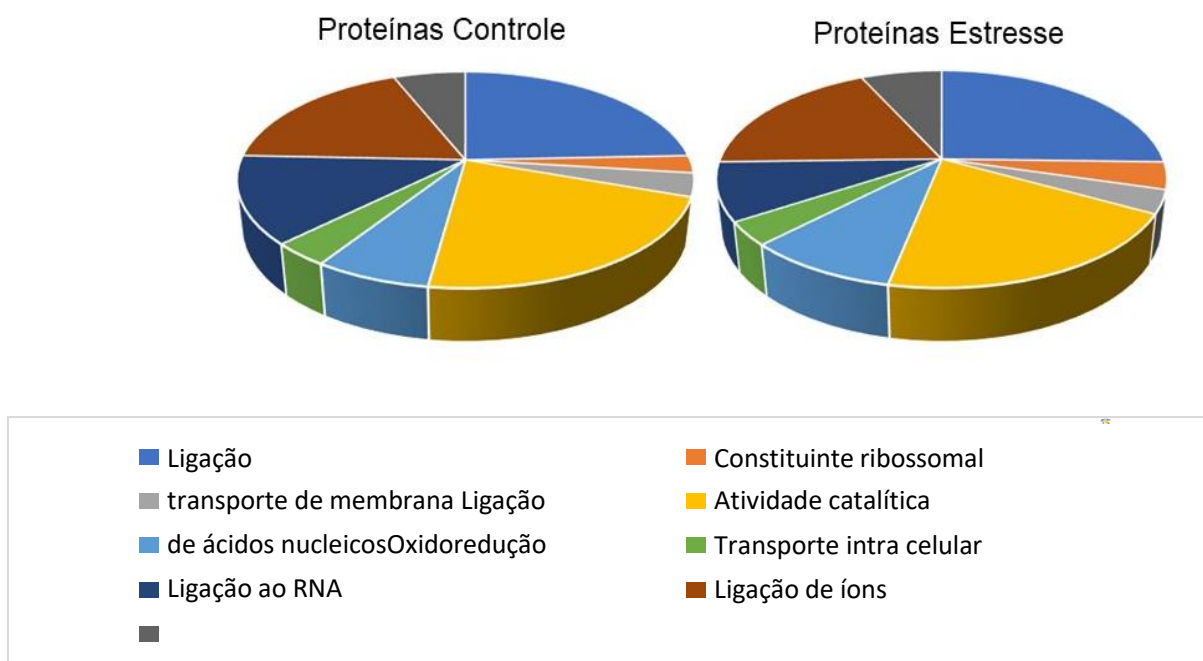


Figura 25. Categorização dos termos de ontologia gênica para proteínas diferencialmente acumuladas em *Lemna aequinoctialis*. Gráficos representativos da Função molecular das proteínas diferenciais de *L. aequinoctialis* submetidas ao tratamento sem e com Cádmio, respectivamente.

PROCESSOS BIOLÓGICOS

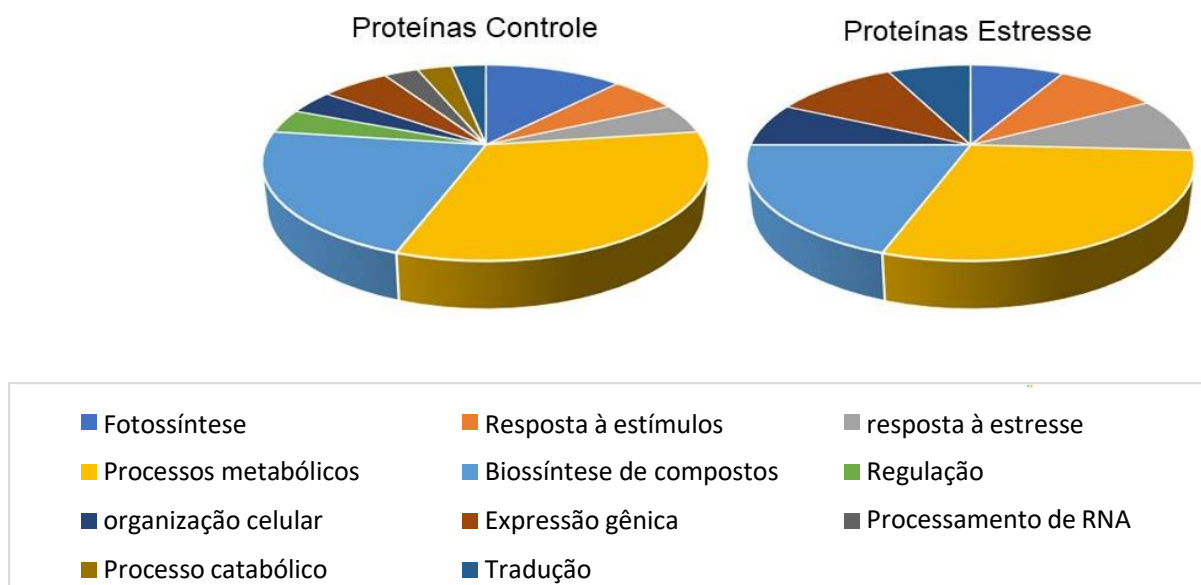


Figura 26. Categorização dos termos de ontologia gênica para proteínas diferencialmente acumuladas em *Lemna aequinoctialis*. Gráficos representativos dos processos biológicos das proteínas diferenciais de *L. aequinoctialis* submetidas ao tratamento sem e com Cádmio, respectivamente.

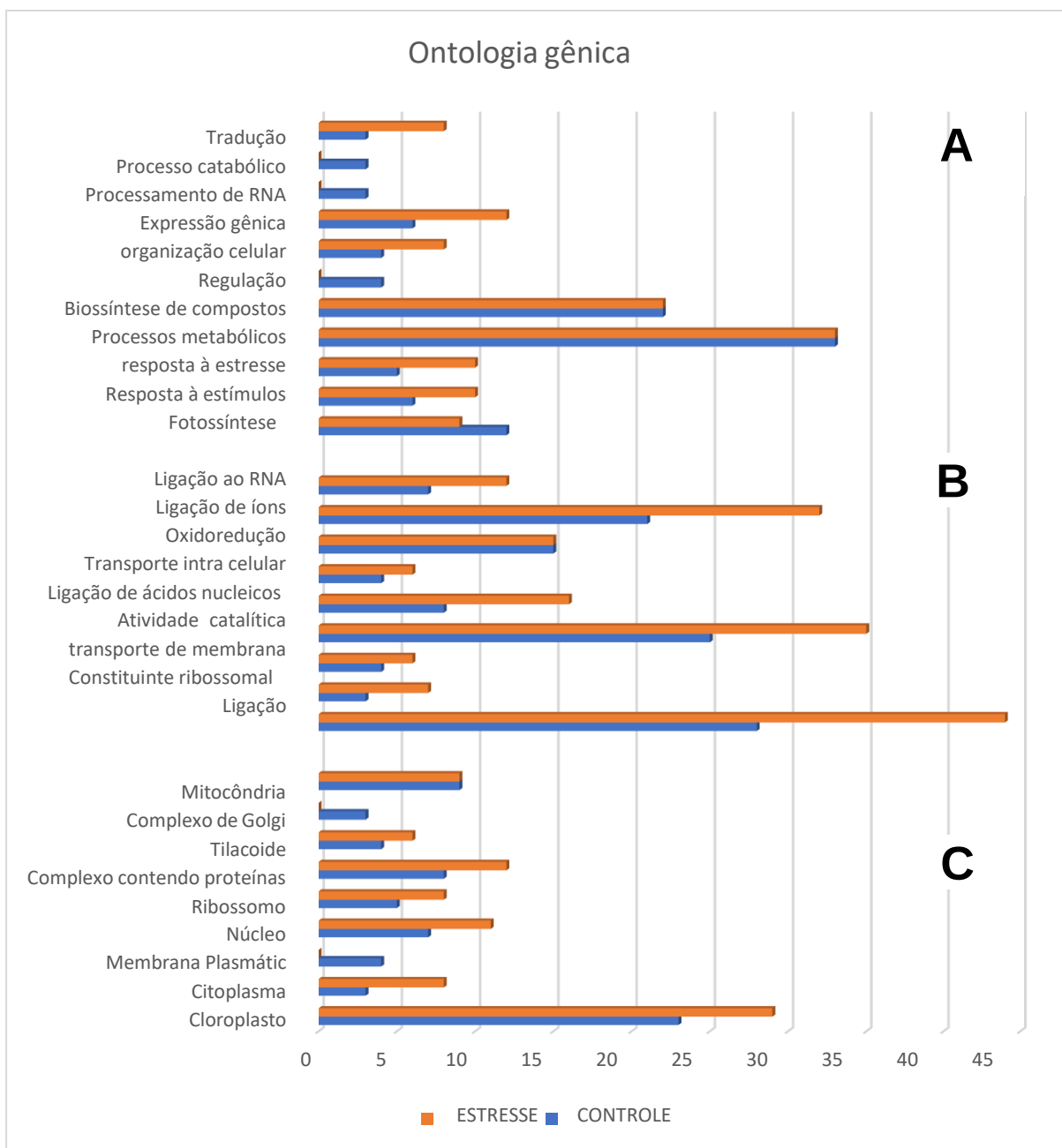


Figura 27. Resumo da quantidade de proteínas e sua categorização dos termos de ontologia gênica para proteínas diferencialmente acumuladas em *Lemna aequinoctialis* evidenciando as diferenças entre os tratamentos. Gráficos das proteínas diferenciais de *L. aequinoctialis* submetidas ao tratamento sem e com Cádmio. **A)** localização subcelular, **B)** Função molecular e **C)** Processo biológico.

As principais enzimas relacionadas ao tratamento com Cd estão categorizadas no gráfico abaixo, com destaque as hidrolases, que apresentaram maior variação.

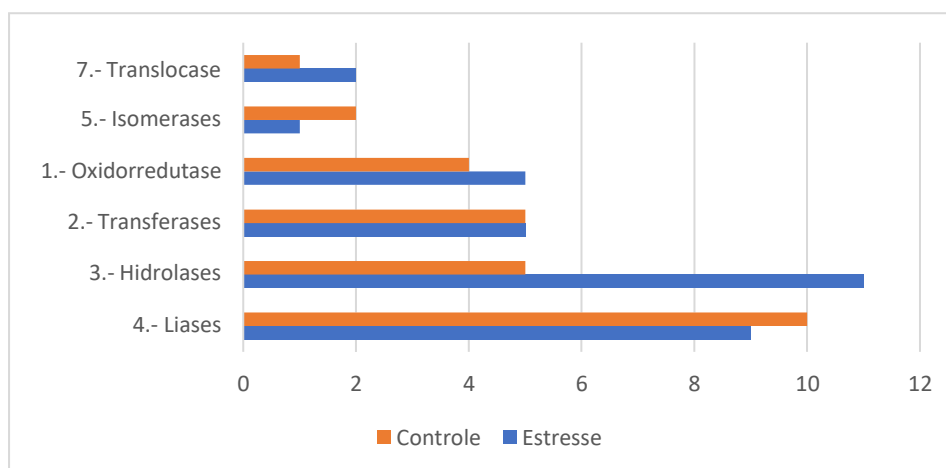


Figura 28. Principais enzimas diferencialmente acumuladas e encontradas em *Lemnaea equinocalis* submetidas ao tratamento com Cádmio e suas quantidades.

TABELA 2. Identificação das DAPs de *Lemna aequinoctialis*, proteínas identificadas em ambos os tratamentos, condição controle na ausência de Cd e no tratamento com Cd. Anotação putativa a partir do MALDI-ToF/ToF MS e analisando via PMF na plataforma MASCOT.

Spot	Maior Acumulação	Espécie	RATIO	ANOVA	DESCRIÇÃO	ACESSO	SCORE	Cobertura % seq.	E-VALUE	PI _{cal} /PI _{obs}	M _{cal} /M _{obs}
385	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7,35042	6,46E-07	Proteína AT1G10130	BAH19996.1	65	19	0.032	7,73/6,06	84308/51916
389	EST	<i>Oryza sativa</i>	6,77424	0,001143	Glutaredoxina-C5	Q0JDM4	63	80	0.012	7,13/6,4	84127/14134
521	EST	<i>Solanum lycopersicum</i>	3,81538	0,000437	Glutamato desidrogenase	P93541	58	22	0.033	7,67/6,6	97723/45070
507	CON	<i>Spirodela polyrhiza</i>	3,78428	0,001831	Ribulose bifosfato carboxilase subuni. maior	B5WX55	119	39	6.5e-06	6,92/6,14	44587/51976
580	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,94297	0,00648	Arginase 2 Cloroplástica/mitocondrial	Q9ZPF5	63	30	0.021	7,40/5,90	87401/38071
579	EST	<i>Oligosanthos dicantélio</i>	2,91976	0,003621	Proteína não-caracterizada	OEL12530.1	86	32	0.027	7,53/9,72	86715/42714
202	CON	<i>Zea mays</i>	2,79895	0,001055	Ácido caféico 3-O-methyltransferase	Q06509	59	28	0.023	5,03/5,49	44776/39884
153	CON	<i>Lemna minor</i>	2,65426	0,001064	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia larga	A9L9A4	162	44	8E-14	7,46/6,09	42729/53594
314	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,5141	0,004557	Di-hidrolipoil desidrogenase 1, mitocondrial	Q9M5K3	58	36	0.028	4,02/6,96	63449/54239
500	EST	<i>Oryza sativa</i>	2,50616	0,004685	Proteína não caracterizada	EEE57764.1	66	36	0.011	6,20/9,20	38980/66813
131	CON	<i>Marchantia polymorpha</i>	2,48804	0,009718	Proteína Ribossomal 50S L14, Cloroplastidial	P06381	67	59	0.0077	5,55/9,88	40656/13602
407	EST	<i>Oryza sativa</i>	2,42576	3,77E-05	Proteína Cinesína KIN-7C	Q6H638 XP_02392447	65	44	0.003	5,27/6,90	89730/99058
110	CON	<i>Quercus suber</i>	2,3494	0,01967	Proteína de domínio homeobox-DDT RLT3	4.1	85	16	0.028	7,13/7,25	38351/133894
37	CON	<i>Spirodela polyrhiza</i>	2,1462	0,007613	Biogênese de Citocromo C FN	I1VWI9	48	18	0.022	4,25/10,49	27211/64484

45	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,08392	0,011513	Trioma proteico semelhante a birrefringência 15	O80940	56	34	0.044	5,64/9,34	29269/54988
248	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,08075	0,020121	Provável Ribose-5-fosfato isomerase 3, cloroplástica.	Q9S726	63	16	0.02	8,19/5,72	52897/29401
422	EST	<i>Oenothera berteriana</i>	2,07778	0,001232	Homólogo de DNA-polimerase direcionado ao RNA	P31843	67	38	0.0086	5,59/6,90	102070/16960
586	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,97453	0,019315	Proteína não caracterizada	NP_00132883	72	50	0.0058	5,66/4,59	100492/9138
192	CON	<i>Lemna Japonica</i>	1,9728	0,042665	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia larga	A0A2Z0J8I7	57	30	0.0024	6,77/6,53	45199/41592
537	EST	<i>Pinus elliotii</i>	1,96799	0,002677	Maturase K	Q8HW57	56	19	0.043	7,03/9,46	69356/61555
18	CON	<i>Lemna minor</i>	1,85782	0,000873	Maturase K (Fragment)	G0WZV2	46	35	0.034	5,94/9,29	21113/32097
14	EST	<i>Anthoceros angustus</i>	1,85782	0,000873	Subunid. J da NAD (P) H-quinona-oxidoreductase, cloroplástica	Q85BB2	56	28	0.022	5,94/6,08	21113/19843
315	EST	<i>Oryza sativa</i>	1,78784	6,58E-05	Proteína não caracterizada	EEE58988.1	66	21	0.05	7,04/5,70	65548/76711
309	CON	<i>Wolffiella lingulata</i>	1,78512	0,000572	ATP sintase subunidade alpha, cloroplástica.	G1FBB1	71	34	9.9e-05	4,94/5,70	63180/55203
180	CON	<i>Lemna aequinoctialis</i>	1,76177	0,007354	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia larga	Q8WHI8	87	27	2.5e-06	7,44/6,32	44623/50060
377	EST	<i>Ananas comosus</i>	1,75445	0,011618	Proteína de resposta induzida por hipersensibilidade 1	OAY77777.1	88	30	0.016	7,26/5,38	81848/36711
236	CON	<i>Lemna trisulca</i>	1,74	0,023021	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia larga	H6THG5	52	22	0.008	6,23/6,53	51305/44057
412	EST	<i>Oryza sativa</i>	1,72732	0,001876	Proteína 1 de ligação a GTP do tipo RAC	Q9SSX0	55	44	0.016	5,78/9,28	97319/24101
79	CON	<i>Lemna trisulca</i>	1,72136	0,0363	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia larga	H6THG5	98	49	1.9e-07	6,77/6,53	33840/44057
351	EST	<i>Oenothera berteriana</i>	1,71555	0,002053	Homólogo de DNA-polimerase direcionado ao RNA	P31843	60	45	0.039	6,72/6,90	72229/16960
92	CON	<i>Petunia hybrida</i>	1,70753	0,000752	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase citoplasmática	P26520	56	37	0.052	6,04/6,68	36533/36618
250	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,70689	0,000916	Provável Ribose-5-fosfato isomerase 3, cloroplástica.	Q9S726	65	37	0.012	8,65/5,72	53837/29401

304	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,65994	0,002615	Provável Ribose-5-fosfato isomerase 3, cloroplástica.	Q9S726	64	30	0.015	4,64/5,72	60936/29401
536	EST	<i>Oryza sativa</i>	1,65048	0,011725	Proteína 1 de ligação a GTP do tipo RAC	Q9SSX0	55	44	0.016	7,05/9,28	71125/24101
182	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,57643	0,016249	Aspartato aminotransferase, Isozima citoplasmática 1	P46645	56	15	0.036	8,25/6,80	45046/44467
430	EST	<i>Oenothera berteriana</i>	1,57435	0,017857	Homólogo de DNA-polimerase direcionado ao RNA	P31843	71	43	0.034	4,66/6,90	108080/16690
336	EST	<i>Spirodela polyrhiza</i>	1,56878	0,042625	Proteína ribossomal S13	I1VWK0	46	43	0.036	4,88/10,49	68227/13498
120	CON	<i>Spirodela polyrhiza</i>	1,55827	0,0296	ATP sintase subunidade beta, cloroplástica	G1FB50	76	44	0.00053	5,64/5,15	39411/53435
406	EST	<i>Oryza sativa</i>	1,54495	0,032158	Proteína argonauta MEL1	Q851R2	52	22	0.037	5,34/9,34	92535/117987
21	CON	<i>Lemna trisulca</i>	1,54306	0,002432	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia larga	T2HFQ2	61	31	0.0011	5,09/5,80	23780/22531
512	EST	<i>Oryza sativa</i>	1,53918	0,029006	Proteína não caracterizada	EEE68318.1	72	46	0.012	5,93/6,17	52365/22351

TABELA 3. Identificação das DAPs de *Lemna aequinoctialis*, proteínas acumuladas na condição controle, na ausência de Cd e em meio de cultura SH. Anotação putativa a partir do MALDI-ToF/ToF MS e analisando via PMF na plataforma MASCOT

Spot	Espécie	ANOVA	DESCRIÇÃO	ACESSO	SCORE	Cobertura % seq.	E-VALUE	PI _{cal} /PI _{obs}	M _{cal} /M _{obs}
778	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,027539	Proteína do tipo defensina	Q2V3S8	58	46	0.042	4,33/5,21	20981/9329
781	<i>Lemna gibba</i>	0,000049	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia longa (fragmento)	R4I7N5	59	29	0.0016	6,44/7,00	35617/23821
782	<i>Lemna minor</i>	0,000185	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia longa (fragmento)	A9L9A4	99	22	1.5e-07	7,39/6,09	39116/53594
784	<i>Oryza sativa</i>	0,018911	GTP Difosfoquinase RSH2	Q7XAP4	52	9	0.036	7,66/6,49	43849/79953
785	<i>Wolffia arrhiza</i>	0,000139	F1-ATP sintase subunidade delta	E9MW20	46	51	0.034	5,72/9,15	43193/25157
788	<i>Oenothera berteriana</i>	0,00114	Homólogo de DNA-polimerase direcionado ao RNA	P31843	66	52	0.032	5,52/6,90	43663/16960
794	<i>Wolffia australiana</i>	0,00828	Proteína de ligação à acil-CoA	F8SUH2	47	83	0.026	7,52/6,23	52519/10058
797	<i>Lemna aequinoctialis</i>	0,027539	Aleno óxido sintase	F2Q7G6	50	18	0.012	4,33/8,81	20981/53489
798	<i>Lemna tenera</i>	0,003001	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia longa (fragmento)	Q8WHI9	119	31	1.6e-09	7,04/6,32	57200/49934
799	<i>Wolffiella caudata</i>	0,014457	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia longa (fragmento)	Q8WHH2	110	30	1.3e-08	6,96/6,34	57173/50102
800	<i>Spirodela polyrhiza</i>	0,032609	succinato desidrogenase subunidade 4	I1VWJ3	70	18	0.00014	6,84/10,47	56974/17808
801	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,004048	Proteína relacionada a Actina-5	Q940Z2	56	12	0.037	7,85/5,27	78770/83571
810	<i>Oryza sativa</i>	0,027539	Proteína Formina 16	A3AB67	53	9	0.028	4,33/9,68	20981/95621
810	<i>Oryza sativa</i>	0,003525	Topoisomerase 6 do DNA subunidade B	B8BDQ4	58	34	0.0095	6,18/9,06	35865/78352
814	<i>Oenothera berteriana</i>	0,013896	Homólogo de DNA-polimerase direcionado ao RNA	P31843	59	44	0.023	4,79/6,90	102737/16960

815	<i>Saxifraga oppositifolia</i>	0,002315	Maturase K	Q33134	63	23	0.022	4,15/9,48	17812/41874
816	<i>Oryza sativa</i>	5,78E-06	Proteína quinase ativada por mitógeno 10	Q5ZCI1	51	30	0.042	6,55/9,05	29280/69813
819	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,001657	Proteína quinase 6 dependente de Cálcio	Q38872	75	13	0.0014	4,36/5,41	19592/61529
820	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,018236	Proteína não caracterizada	OA098202.1	66	15	0.025	6,25/8,56	24983/38406
821	<i>Lemna aequinoctialis</i>	0,008237	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia longa (fragmento)	Q8WHI8	149	37	1.6e-12	9,99/6,32	53743/50060
826	<i>Oenothera berteriana</i>	0,015454	Homólogo de DNA-polimerase direcionado ao RNA	P31843	59	34	0.026	4,58/6,90	34956/16960
828	<i>Doroceras hygrometricum</i>	0,005822	Proteína não caracterizada	KZV38832.1	87	27	0.0018	4,42/9,72	37225//25086
831	<i>Cycas taitungensis</i>	0,023073	Proteína ribossomal S18 cloroplastidial 30S	A6H5K4	56	57	0.047	7,42/12,09	29097/8646
832	<i>Oryza sativa</i>	0,000291	Proteína não caracterizada	CAE02585.2	68	9	0.029	8,55/8,04	27986/124847
839	<i>Oenothera berteriana</i>	0,007709	Homólogo de DNA-polimerase direcionado ao RNA	P31843	63	52	0.021	6,70/6,90	64050/16960
844	<i>Oryza sativa</i>	0,000403	Proteína não caracterizada	BAS98744.1	66	68	0.045	6,62/9,3	51567/9340
851	<i>Oryza sativa</i>	0,017166	Proteína não caracterizada	CAE02585.2	68	11	0.026	5,62/8,4	75607/124847
852	<i>Syzygium olesum</i>	0,0028	Pentatricopeptídeo de repetição mitocondrial	XP_030456050.1	100	18	0.00096	5,74/7,06	74246/68423
854	<i>Oenothera berteriana</i>	0,00105	Homólogo de DNA-polimerase direcionado ao RNA	P31843	67	42	0.0082	4,86/6,90	33630/16960
857	<i>Cucurbita pepo</i>	0,002316	Proteína semelhante a mucina 2	XP_023545390.1	90	21	0.0094	6,37/8,96	102960/51809
862	<i>Pyrus ussuriensis</i>	0,00082	Galactosiltransferase de xiloglucano	KAB2632718.1	83	20	0.045	5,91/8,47	103016/67607
868	<i>Wolffia australiana</i>	0,00491	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia longa (fragmento)	F8SVU2	46	37	0.033	7,42/8,84	33912/19976

TABELA 4. Identificação de proteínas de *Lemna aequinoctialis*, proteínas acumuladas na presença de 5 μ M de CdCl₂. Anotação putativa a partir do MALDI-ToF/ToF MS e analisando via PMF na plataforma MASCOT.

Spot	Espécie	ANOVA	DESCRIÇÃO	ACESSO	SCORE	Coer- tura % seq.	E-VALUE	PI _{cal} /PI _{obs}	M _{cal} /M _{obs}
596	<i>Oenothera berteriana</i>	0,023192	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	57	..	0.023	4,48/6.90	15953/16960
597	<i>Oenothera berteriana</i>	8,13E-04	Proteína YCF4 de montagem de fotossistema I	P31843	59	52	0.037	5,84/9.75	17792/21624
597	<i>Zea mays</i>	8,13E-04	Expansina B10	Q1ZYQ8	57	25	0.038	5,84/8.81	17792/29836
598	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,94E-05	Proteína não caracterizada	AAN08436.1	66	15	0.023	8,67/7.52	18924/52951
599	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,32E-04	Metalopeptidase de zinco EGY3 cloroplástica	Q9LMU1	56	17	0.041	5,66/5.12	75056/63192
600	<i>Daucus carota</i>	3,06E-04	Fator de Reciclagem de ribossomos cloroplastidial	P37706	61	44	0.032	8,25/9.36	24988/25639
602	<i>Triticum aestivum</i>	4,56E-04	Proteína ribossômica 60S L35	Q8L805	56	49	0.052	8,74/11.26	26081/14356
604	<i>Oryza sativa</i>	4,75E-04	Proteína semelhante a cinesina KIN-14D	Q0E2L3	54	25	0.02	4,61/8.63	26706/107967
605	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,35E-04	Proteína não caracterizada	AAN08436.1	66	15	0.023	7,99/7.52	27143/52952
610	<i>Oenothera berteriana</i>	7,35E-05	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	60	53	0.04	6,5/6.9	28852/16960
612	<i>Oryza sativa</i>	0,006396	Proteína reguladora de nitrogênio P-II	Q6AUR2	52	26	0.031	5,14/9.91	31270/22744
613	<i>Pisum sativum</i>	3,98E-04	Receptor quinase de nodulação	Q8LKZ1	59	14	0.024	5,32/5.13	31513/104750
615	<i>Wolffia australiana</i>	2,11E-04	Proteína ribossomal 40S S10	H6U804	49	25	0.015	5,64/9.92	31993/20334
616	<i>Oenothera berteriana</i>	0,027508	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	59	52	0.025	8,59/6.9	32127/16960
617	<i>Oryza sativa</i>	0,004375	Proteína reguladora de nitrogênio P-II	Q6AUR2	52	32	0.035	8,98/9.91	34823/22744
621	<i>Oryza sativa</i>	0,017384	Provável antígeno nuclear EBNA1	BAD61916.1	67	19	0.034	5,49/11.30	36961/44668

622	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,73E-04	envelope ADP, proteína transportadora de ATP, cloroplastidial	O65023	59	31	0.019	8,42/9.70	39007/41976
625	<i>Beta vulgaris</i>	0,001292	Subunidade catalítica A de ATPase de prótons do tipo V	Q39442	60	21	0.038	5,83/5.10	42699/68790
627	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9,20E-05	Proteína ribossômica 50S L19-1, cloroplastidial	Q8W463	56	29	0.044	7,38/10.03	43572/25560
631	<i>Isophysis tasmanica</i>	8,53E-05	Serina Hidroximetiltransferase 1	P92463	57	12	0.035	6,95/8.13	44682/57535
632	<i>Oryza sativa</i>	0,015169	1,2-di-hidroxi-3-ceto-5-metiltiopenteno dioxigenase 3	Q7XNS7	51	39	0.043	5,31/5.56	45735/24543
635	<i>Oenothera berteriana</i>	1,88E-06	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	63	50	0.02	5,68/6.9	48586/16960
636	<i>Spirodela polyrhiza</i>	0,003436	Subunidade 4 da succinato desidrogenase	I1VWJ3	45	18	0.039	6,69/10.47	50859/17808
639	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,017311	Quinase citoplasmática 2 do tipo receptor de ligação a calmodulina	Q8VZJ9	57	19	0.033	5,76/9.26	52204/46374
641	<i>Solanum tuberosum</i>	0,004486	Inibidor de proteinase induzida por ferida 1	P08454	57	60	0.038	9,95/5.82	52407/12252
642	<i>Oryza sativa</i>	0,00304	Proteína não caracterizada OsJ_14231	EEE60721.1	67	31	0.034	7,2/6.23	54036/24302
643	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,020465	Proteína UPF0725 At3g44770	Q5BPP4	60	17	0.018	6,9/5.24	54239/37194
644	<i>Oryza sativa</i>	1,94E-04	Proteína OSJNBa0049H08.10	CAE05049.2 KAA6425034	85	13	0.03	4,79/6.74	54605/87983
645	<i>Trebouxia sp</i>	0,00562	1, Proteína hipotética FRX49_05208	.1	85	9	0.028	4,63/6.71	55016/248256
646	<i>Oenothera berteriana</i>	6,68E-06	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	57	46	0.04	4,17/6.9	55271/16960
651	<i>Oryza sativa</i>	1,24E-04	Villin-4	B8ATT7	56	16	0.013	5,03/5.67	56268/106387
653	<i>Oenothera berteriana</i>	0,006098	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843 A0A345W6D	57	48	0.036	5,32/6.9	58629/16960
655	<i>Wolffia globosa</i>	3,07E-04	Maturase K (Fragmento)	1	49	36	0.017	4,82/8.53	63912/10502
656	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,001337	Proteína REM8 contendo domínio B3	Q8H2D1	61	31	0.032	4,29/6.25	64691/52448

657	<i>Oenothera berteriana</i>	0,020365	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	60	45	0.042	6,07/6.9	65218/16960
659	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,017285	Provável trealose-fosfato fosfatase C	F4I1A6	58	23	0.028	5,58/5.27	69839/36455
665	<i>Cucurbita pepo</i>	0,014545	0.1, tipo mucina 2	XP_023545390.1	88	30	0.017	5,53/8.96	78720/51809
667	<i>Beta vulgaris</i>	7,71E-04	Subunidade catalítica A de ATPase de prótons do tipo V	Q39442	66	17	0.034	6,03/5.1	80860/68790
668	<i>Erythranthe guttata</i>	0,009866	Metalotioneína	P20238	56	59	0.044	5,13/4.55	80505/8027
669	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,21E-04	Endonuclease de cruzamento MUS81	Q5W9E7	57	22	0.033	6,99/8.47	83418/74979
670	<i>Oenothera berteriana</i>	1,05E-04	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	60	51	0.038	6,99/6.9	86045/16960
677	<i>Spirodela polyrhiza</i>	0,003711	Proteína ribossomal S13	I1VWK0	59	43	0.0017	6,26/10.49	100935/13498
679	<i>Oryza sativa</i>	0,00153	Proteína OSJNBa0016N04.3	CAE02585.2	89	9	0.044	6,02/8.4	101829/124847
681	<i>Oenothera berteriana</i>	0,001447	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	58	46	0.033	4,73/6.9	103736/16960
683	<i>Oryza sativa</i>	5,33E-04	3-methyl-2-oxobutanoato hydroximetiltransferase 1, mitocondrial	Q9AWZ8	53	13	0.026	5,43/7.7	107282/38295
685	<i>Lyonia ferruginea</i>	9,68E-04	Maturase K	O47129	58	15	0.034	5,73/9.35	113057/61001
687	<i>Oryza sativa</i>	3,66E-04	Homologo da proteína reguladora de nitrogênio P-II	Q6AUR2	56	30	0.011	6,84/9.91	113765/22744
690	<i>Musa acuminata</i>	1,84E-05	6.1, previsto: Piruvato quinase isozima citosólica	XP_009420246.1	88	14	0.015	6,94/6.49	113462/54597
691	<i>Oryza sativa</i>	1,82E-05	Proteína OSJNBa0016N04.3	CAE02585.2	76	10	0.0049	4,7/8.4	114179/124847
692	<i>Oryza sativa</i>	9,12E-07	Fator de transcrição GATA 19	Q0DNU1	51	23	0.041	6,7/6.14	114828/29465
693	<i>Solanum tuberosum</i>	0,005183	Caffeoyl-CoA O-metiltransferase	Q8H9B6	56	14	0.051	6,27/5.29	115191/27359
694	<i>Oryza sativa</i>	1,29E-04	Fator de splicing rico em serina/arginina RSZ21	Q6K4N0	53	40	0.027	6,61/11.24	115988/21182

696	<i>Brassica napus</i>	0,003139	6.1, formiltetrahidrofolato deformilase 1, isoforma do tipo mitochondrial X2	XP_013698206.1	84	17	0.042	4,68/8.37	122326/37475
697	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,007908	Proteína F-box associada ao FBD At5g56380	Q9FM93A0A345W6D	56	24	0.042	4,64/8.89	122311/50670
698	<i>Wolffia globosa</i>	3,36E-07	Maturase K (Fragmento)	1	49	36	0.017	4,42/8.53	123742/10502
700	<i>Oenothera berteriana</i>	9,51E-06	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	58	34	0.029	5,78/6.9	16788/16960
702	<i>Oryza sativa</i>	0,001143	ATPase 1	B8BBN7	53	35	0.027	8,52/6.3	20651/44718
707	<i>Glycine max</i>	0,041258	Subunidade alfa do proteossoma tipo 5	Q9M4T8	62	33	0.023	4,05/4,7	29564/26135
711	<i>Oryza sativa</i>	2,16E-07	Proteína OSIGBa0146I21.5	CAH66648.1NP_0013185	66	12	0.051	5,53/7.62	32356/91817
722	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,17E-04	5.1, protease 6 FTSH	65.1	65	31	0.029	4,35/9.45	49554/55803
714	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,002204	Proteína HHL1, chloroplastic	Q8LDL0	70	35	0.0038	7,12/9.57	38673/26122
726	<i>Spirodela polyrhiza</i>	0,039355	Subunidade 4 da succinato desidrogenase	I1VWJ3	52	18	0.008 0.0005	9,5/10.47	55958/17808
729	<i>Lemna Japonica</i>	3,38E-06	Ribulose bifosfato carboxilase Cadeia longa (fragmento) 4.1, isoforma x2 de proteína não caracterizada	Q8WHI3XP_0245289	64	20	4	10/6.32	55991/50032
730	<i>Selaginella moellendorffii</i>	0,009114	LOC9650115	34.1	89	19	0.049	7,02/6.38	57490/55239
735	<i>Lemna menor</i>	0,002761	Malato desidrogenase (fragmento)	C7DRS7	47	44	0.024	8,14/7.71	68467/6737
738	<i>Oenothera berteriana</i>	0,047867	RNA-directed DNA polymerase homolog	P31843	59	57	0.025	6,36/6.9	73237/16960
745	<i>Catharanthus roseus</i>	0,004495	Strictosidina sintase	P18417	58	20	0.033	6,15/5.14	101012/39240
746	<i>Larix decidua</i>	1,22E-05	Proteína 30S ribossomal S18 cloroplastidial	Q85V01	59	83	0.051	6,1/11.73	101281/10120
749	<i>Oenothera berteriana</i>	2,58E-04	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	58	40	0.03	4,54/6.9	111173/16960
750	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7,79E-06	Proteína T6D22.4	AAF79846.1	66	42	0.029	4,5/5.96	112025/22021

754	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,005189	Quinase citoplasmática 2 do tipo receptor de ligação à calmodulina	Q8VZJ9	66	36	0.011	4,38/9.26	123280/46374
755	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,008919	Proteína Argonauta 5	Q9SJK3	59	13	0.019	4,56/9.51	121924/111817
757	<i>Cuscuta obtusiflora</i>	0,006524	Proteína ribossômica S3 30S plastidial	A8W3M0	56	31	0.051	5,38/10.06	23068/25255
758	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,31E-04	FCS-Like dedo de zinco 17	P0DO11	63	61	0.022	6,92/9.57	58313/15094
759	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,88E-06	Transportador ABC I membro da família 1	Q9C8T1	60	24	0.04	6,49/9.82	28187/26016
762	<i>Spirodela polyrhiza</i>	0,002838	Subunidade beta da RNA polimerase direcionada ao DNA	G1FB33	47	9	0.025	5,23/9.38	32684/155471
764	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,020698	Proteína hipotética AXX17_AT1G47310	OAP12863.1	67	17	0.019	4,22/9.48	32961/76331
765	<i>Oenothera berteriana</i>	0,001559	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	56	38	0.046	5,86/6.9	36552/16960
766	<i>Oenothera berteriana</i>	4,32E-04	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	60	52	0.042	5,06/6.9	36530/16960
772	<i>Oryza sativa</i>	0,009294	Alpha-1,3-Arabinosiltransferase XAT2	Q6ZFR0	54	16	0.022	6,52/5.44	44254/66579
775	<i>Spirodela polyrhiza</i>	3,94E-06	Aciltransferase de mono ou diacilglicerol	Q6TXQ7	45	21	0.037	4,72/9.33	131014/35972

4.3.3 Rede de interação proteína-proteína

Diversas proteínas formaram redes de interações baseadas em vias de atuação catalítica ou mesmo de dependência funcional.

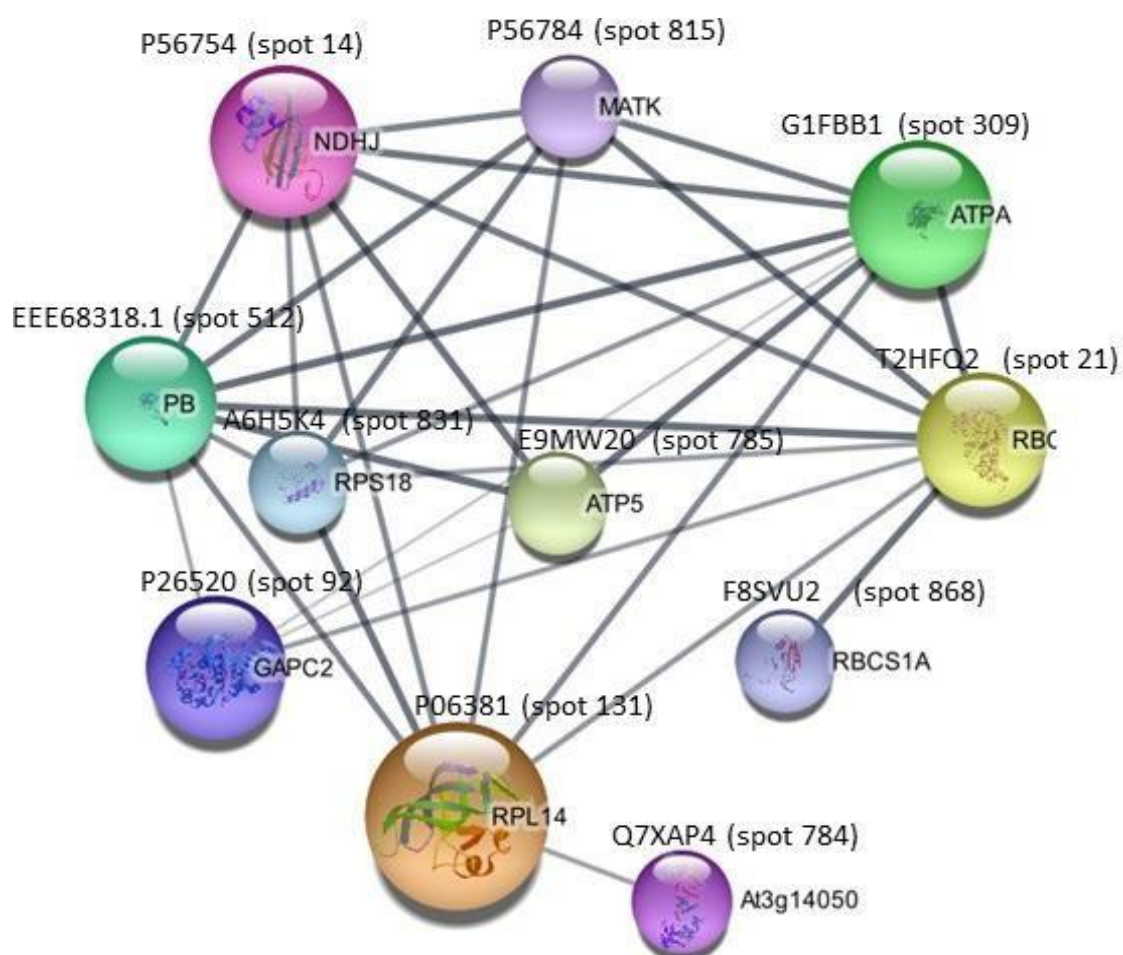


Figura 29. Rede de interações genéticas de proteínas que foram inibidas parcialou totalmente na presença de Cd. Linhas indicam a interação; tamanho menor indicativo de proteínas exclusivas do tratamento controle; variação de tamanho indica o coeficiente de variação de acumulação (Ratio). (Acesso da proteína e seu respectivo spot no gel).

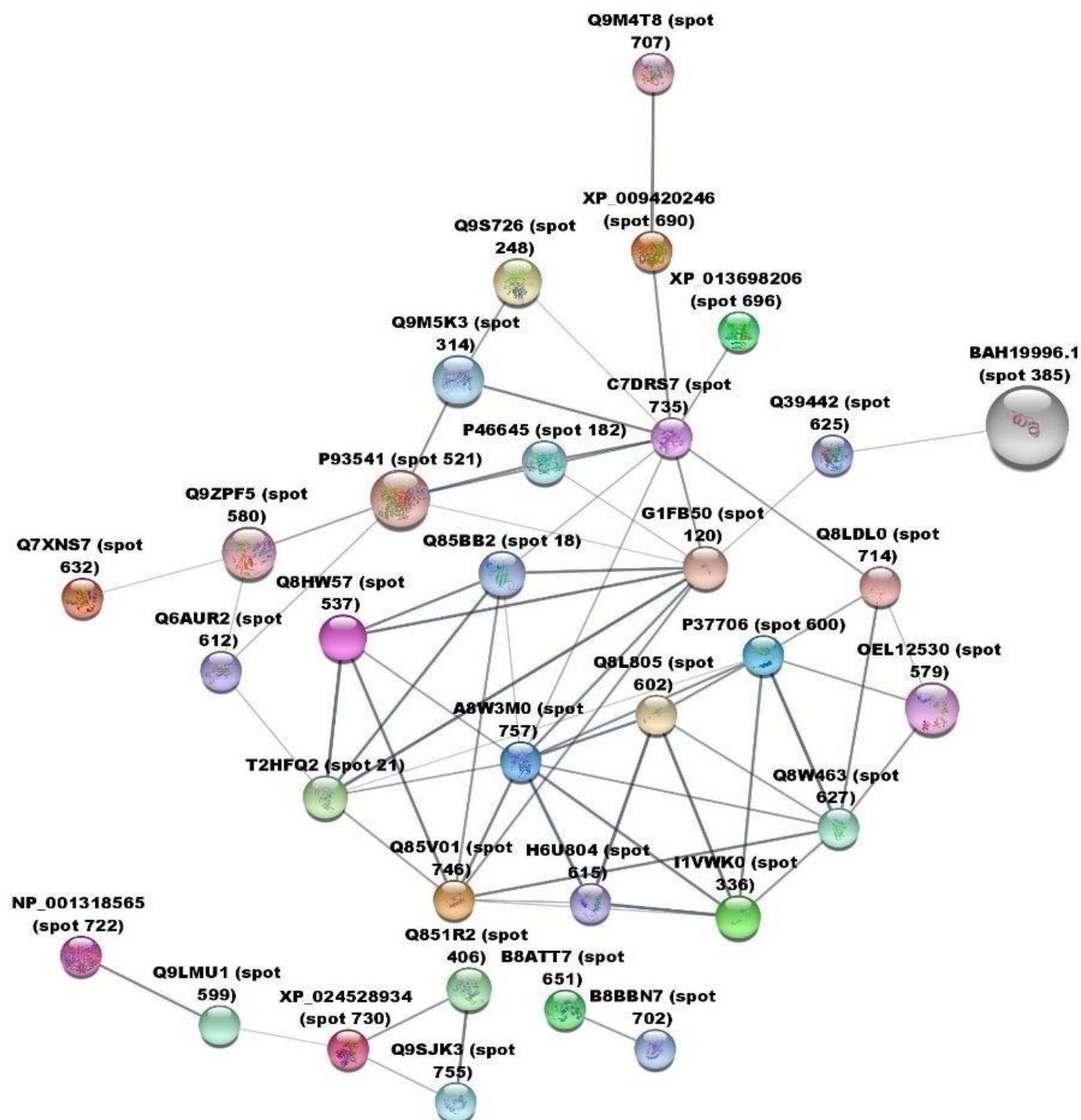


Figura 30. Rede de interações genéticas de proteínas que foram expressivamente acumuladas na presença de Cd. Linhas indicam a interação; tamanho menor indicativo de proteínas exclusivas do tratamento com Cd; variação de tamanho indica o coeficiente de variação de acumulação (Ratio). (Acesso da proteína e seu respectivo spot no gel).

4.3.4 Proteínas envolvidas no mecanismo fotossintético

A análise de GO (ontologia gênica) é baseada no agrupamento de termos representativos para etapas de um determinado processo biológico, em categorias mais genéricas. Por exemplo, proteínas de foto assimilação ou de fotossistema são agrupadas na categoria fotossíntese. Baseado nessa categorização, podemos discutir as características e plasticidade de *Lemna aequinoctialis* quanto a acumulação das proteínas diferenciais. A análise de GO nos mostra uma pequena redução na acumulação de proteínas relacionada à fotossíntese, regulação, processamento de RNA e processos catabólicos, que tiveram suas proteínas parcial ou totalmente inibidas na presença de Cd em *L. aequinoctialis* expostas ao Cd.

As categorias envolvendo resposta à estímulo, resposta à estresse, expressão gênica e tradução, observou-se acúmulo positivo em *L. aequinoctialis* submetidas ao tratamento com Cd. De modo geral, o comportamento de *L. aequinoctialis* submetida ao Cd reflete a interação do metal e suas consequências frente ao desequilíbrio celular.

No geral, a sobrevivência de uma célula é baseada no quanto ela consegue responder adequadamente a estímulos adversos, como por exemplo, danos provocados por metais pesados, incluindo o cádmio, os quais provocam modulação da expressão gênica, necessária para responder a esses estímulos, e com isso, manter o ambiente celular mais adequado à vida.

Quando observamos a categoria fotossíntese, importante para o funcionamento celular, a qual reflete, dependendo da eficiência, em características como ganho de biomassa, clorose, crescimento relativo, e várias outras características importantes para a planta, observamos uma regulação negativa dos genes e menor acumulação das proteínas quando a planta está submetida ao estresse por Cd.

L. aequinoctialis reduziu 3,7 vezes a expressão de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) comum entre os tratamentos (spot 507). A RuBisCO é uma proteína considerada interferente na análise de proteomas de planta em geral, pois ela pode de maneira direta interferir na migração de outras proteínas devido a sua abundância na célula vegetal (KRISHNAN, 2009). Essa abundância se deve a sua natureza extremamente lenta de realizar as reações, sendo por isso necessária em maior abundância.

Não existe trabalhos em nível proteômico envolvendo espécies da família

Lemnaceae com Cd. Trabalhos envolvendo Alumínio (SU, 2019) demonstraram significativa redução dos níveis de RuBisCO, possivelmente indicando uma possível redução da eficiência de assimilação do CO₂, o que confirmaria, a diminuição da fotossíntese.

Uma das proteínas mais responsivas identificadas no tratamento com Cd foi a proteína YCF4 (spot 597), necessária na montagem do fotossistema I. Essa montagem, embora não tão clara devido à natureza rápida do processo de montagem, auxilia a integração das proteínas do fotossistema I com complexos periféricos de captação de luz, necessária à fotossíntese. (NELLAEPALLI, 2018). Embora não esteja claro o papel da YCF4 de modo direto no acúmulo de Cd, trabalhos mostram que essa proteína tem homologia com proteínas de controle do estresse oxidativo, sugerindo uma regulação positiva de modo indireto no controle redox celular (DAVID C. THOMAS, 2017).

O controle da replicação e transcrição do DNA cloroplastidial parece ter maior sensibilidade ao acúmulo de Cd em *L. aequinoctialis*. A Maturase K (spot 537), que auxilia no splicing de transcritos do cloroplasto teve maior regulação positiva, sendo aproximadamente duas vezes mais acumulado em *L. aequinoctialis* sob estresse por Cd em ambos os tratamentos. Trabalhos envolvendo estresse por Cd em espinafre *Spinacia oleraceae* sob estresse por Cd apresentaram resultado similar (BAGHERI, et al, 2015), um indício da necessidade da planta em manter o aparato fotossintético, mesmo sob condições adversas. Isso também se reflete nas proteínas da cadeia transportadora de elétrons. A proteína NAD(P)H-quinona oxidoredutase (spot 18) apresentou regulação positiva em aproximadamente duas vezes em *L. aequinoctialis* sob estresse por Cd em ambos os tratamentos. Essa proteína é da cadeia fotossintética, e facilita a translocação de prótons, conservando o gradiente de prótons. Estudos já mostram que metais como o Cd e o arsênico induzem a expressão de NAD(P)H-quinona oxidoredutase (ELBEKAI, 2008), curiosamente o cromo não atuaria da mesma forma.

Uma outra maneira de perceber a necessidade de manter o aparato fotossintético frente as condições adversas é verificar quanto da produção de energia é regulada pelo estresse. Nesse sentido, a proteína ATP sintase (spot 309), subunidade beta, cloroplastidial, apresentou regulação positiva em cerca de 1,5 vezes no tratamento com Cd. Estudos sugerem que ela tenha participação efetiva no controle redox celular, promovendo a mudança conformacional de compostos para serem alvos de metais, e com isso, de modo geral, atuariam como aceptores de metais

(FRASCH, 2000).

Entre as proteínas com regulação positiva, o destaque foi para a proteína Metalopeptidase EGY3. Embora não se saiba de que maneira ela funcione ou mesmo a localização exata nos cloroplastos, trabalhos sugerem que ela não possua atividade proteolítica, devido a ausência de motivo de ligação ao zinco, diferentemente das outras Metalopeptidase EGY1 e EGY2, e que tal proteína esteja localizada na membrana do tilacoide (ADAMIEC et al, 2020). A Metalopeptidase EGY3 permanece não descrita e pouca informação encontra-se disponível; sabe-se que ela é altamente expressa em condições de estresse abiótico, como o estresse térmico (ECHEVARRIA ZOMEÑO ET AL. 2016) em *Arabidopsis*.

4.3.5 Mecanismos de síntese proteica

Dentre todos os processos celulares, um que se destaca é o de síntese proteica, essas etapas, que envolve transcrição e tradução são importantes pois refletem a necessidade que a célula possui de regular apenas o que é necessário, além de fornecerem a célula proteínas que ela precisa para responder à estresses ambientais, ela é extremamente custosa, onde o gasto de energia de etapas como expressão genica e tradução de proteína é alto. Portanto, dos mecanismos que a célula possui para produção de proteína, abordaremos as proteínas responsivas de expressão gênica, processamento do RNA, tradução e regulação, etapas que apresentaram maior divergência entre os tratamentos com Cd em *L. aequinoctialis*.

As proteínas ribossomais são importantes, pois atuam diretamente na maquinaria da síntese de proteína. Danos ou comprometimentos dessas proteínas podem acarretar um desequilíbrio para as células. Observando a diminuição das proteínas ribossomais organelares de *L. aequinoctialis* sob tratamento por Cd, a proteína S13 mitocondrial (spot 336), a proteína S18 cloroplastidial (spot 831) e a proteína L14 cloroplastidial (spot 131), todas envolvidas em síntese proteica, foram reguladas negativamente, com exceção da proteína S18 que foi exclusiva da situação controle.

Estudos já relataram que a toxicidade do Cd atua da maneira a diminuir a síntese de proteína e alterar diretamente a funcionalidade dos ribossomos. Em estudos proteômicos já foi relatada, em folhas de *Brassica napus* submetidas a tratamento com Cd, a diminuição dos níveis ribossomais (ALI, 2015), e em *Arabidopsis thaliana*,

submetida a concentração subletal de Cd, encontramos algo semelhante, a diminuição da síntese proteica, modificações nos polissomos e regulação negativa das proteínas ribossomais (SORMANI et al, 2011).

As principais hipóteses que surgem frente a diminuição da síntese e do teor de ribossomos são; o aumento da síntese de ribossomos está ligada diretamente a produção de fitoquelatinas, portanto não seria interessante inibir esse agente redutor de metais frente a condição de estresse por metal, a toxicidade por cádmio induz a interação de ribossomos promovida por proteínas mal dobradas e finalmente, o Cd atua na remodelagem dos ribossomos, aumentando seu peso molecular e com isso diminuindo sua eficiência (SORMANI et al, 2011; LU, 2008).

Uma maneira simples de selecionar os produtos gênicos que a célula tanto precisa em condições de estresse é através do splicing alternativo. O Fator de splicing RSZ21 (spot 694) é uma proteína do spliceossomo que atua na seleção do pré-RNA, já descrita em trabalhos de interação do nitrogênio com Cd, para avaliar o aumento da eficiência de acumulação, sendo regulada positivamente (HOANG et al, 2019). Foi relatado em *Arabidopsis* que fatores de splicing ricos em serina e arginina estão envolvidos na tolerância ao Cd. Essa hipótese foi testada ao mutar o gene de fator de splicing RS34b, onde os indivíduos mutados apresentaram maior sensibilidade ao Cd (ZHANG, 2014).

Mesmo apresentando uma inibição da síntese proteica, os ribossomos também são regulados positivamente na presença do Cd. Isso pode implicar na tentativa de produzir ribossomos frente as condições de estresse. As proteínas ribossomais L19-1 cloroplastidial (spot 627), L35 (spot 602), L14 cloroplastidial (spot 131) e a proteína S3 plastidial (spot 757) foram as proteínas reguladas positivamente na presença de Cd. Também foi encontrado o fator de reciclagem de ribossomos cloroplastidial (spot 600). A proteína, que não é ribossomal, atua de maneira a tentar minimizar problemas envolvidos na liberação do RNA transportador (RNAt) com o ribossomo. Ela também ajudaria na estabilidade ribossômica (SHARMA et al, 2010).

Entre as proteínas reguladoras, houve a inibição da proteína nuclear quinase 10 (spot 816), qual é ativada por mitógenos, compostos que estimulam a divisão celular. Como toda quinase pode-se supor que ela ative vias de divisão celular em resposta a estímulos ambientais, como estresses, bem como participando de vias envolvidas na apoptose celular, já que trabalhos mostram a relação da proteína com a via (WADA, 2004).

4.3.6 Mecanismos de prevenção de estresse oxidativo

O estresse oxidativo afeta amplamente a planta, e nesse contexto, a célula inicia várias vias reguladoras, bem como vias de apoptose e necrose celular. A proteína glutaredoxina C5 (spot 389), importante na regulação do metabolismo REDOX celular, está envolvida na formação de grupamentos de ferro-enxofre e na redução de dissulfetos específicos, auxiliando diretamente a glutathione, uma importante proteína reguladora antioxidante (COUTURIER et al, 2011). A glutaredoxina C5 foi acumulada em mais de seis vezes no tratamento com Cd em *L. aequinoctialis*. Estudos indicam que ela é fundamental na transferência de grupos (tiol), e seu papel vai além de fornecer uma maior tolerância oxidativa a planta, pois atua na tentativa de evitar danos maiores e entrada da célula na via de apoptose celular (CHRESTENSEN, 2000).

Outra proteína de controle oxidativo que foi induzida em nossos estudos, foi a proteína diidrolipoil desidrogenase 1 (spot 314), a qual variou em cerca de duas vezes e meia na condição de estresse por Cd. Essa proteína mitocondrial é componente de diferentes complexos multi-enzimas para fechamento de reações completas. Essa proteína foi induzida em resposta ao Cd (SARRY et al, 2006; SEMANE et al, 2010). Acredita-se que a enzima tenha vários papéis celulares devido ao intenso processo de *splicing*, um deles é a de redução de íons de ferro (PETRAT et al, 2003). Ela ainda está ligada, embora não muito claramente, a produção fitoquelatinas (PÁL et al. 2017).

O citocromo C é uma importante proteína essencial na mitocôndria e está relacionada à cadeia transportadora de elétrons, para produção de ATP, atuando na transferência de elétrons e na iniciação do apoptose celular mediado por caspases (LEE, 2008). Além disso, está relacionada com produção de compostos antioxidantes e na desintoxicação de metais (WELCHEN, 2016). A proteína de biogênese de citocromo C (spot 37) foi inibida em mais de duas vezes no estresse por Cd. Trabalhos anteriores já relataram uma acentuada inibição do conteúdo de Citocromo C em tratamentos com Cd (SMIRI, 2009). Os argumentos se baseiam no conteúdo de metais pesados que atingem a mitocôndria, na composição de aminoácidos do citocromo, baseado em cisteína e histidina, compostos que se ligam à metais bivalentes com mais facilidade, e na interação dos fosfolipídios com os íons de Cd (SMIRI, 2009; WELCHEN, 2016).

4.3.7 Resposta à estresse

Essa categoria é importante, pois reflete de modo geral o panorama celular, em que a divergência Proteômica pode estar associada exclusivamente ao estresse aplicado, de Cd. Houve uma maior regulação da categoria de resposta à estresse das proteínas de *L. aequinoctialis* submetidas ao Cd.

Metais em geral apresentam a capacidade de interagir com o grupo sulfidril de muitas proteínas ou mesmo acabarem perturbando o local de ligação específico de substratos (TERRÓN-CAMERO, et al 2019). Compreender o processo de aclimação e possível adaptação de plantas frente a estresses por metais é fundamental, uma vez que isso pode acarretar a remodelação da rede de proteínas da planta.

Plantas apresentam diversos mecanismos para tolerar metais como o Cd, e as análises de proteínas de resposta à estresse fornecem dados importantes para elucidar vias de acumulação e tolerância ao Cádmio. A modulação positiva de proteínas de resposta à estresse são encontradas desde análises comparativas de espécies tolerantes até espécies sensíveis (BORGES, 2019), indicando que a demanda proteica da planta é diretamente proporcional à sensibilidade ao Cd.

A Arginase 2 (spot 580), proteína essencial para resposta a estresse, participa da síntese de moléculas de defesa, e já foi descrita que a sua superexpressão pode diminuir a susceptibilidade de plantas a determinados agentes estressores, como fungos (BRAUC, 2012). Encontramos uma acentuada diminuição dessa proteína em cerca de três vezes em *L. aequinoctialis* submetidas ao tratamento com Cd. Dados envolvendo estresse por metais, incluindo Cd, obtiveram resultados similares, em que ocorre a baixa regulação dessa proteína, sugerindo talvez que danos estruturais e foto oxidativos possam diminuir sua regulação (MUSZYŃSKA, 2020).

Uma maneira rápida de responder a determinados estímulos estressantes é através de uma rápida e eficiente sinalização. A proteína 1 de ligação ao GTP (spot 412) é uma molécula importante na via de sinalização de resistência a determinados tipos de doenças. Adicionalmente, controla a síntese de lignina, altera genes relacionados a defesa e morte celular (ONO, 2001) e está diretamente ligada a baixa expressão de Metalotioneína, proteína necessária ao controle Redox e de metais no interior da célula, regulando-a negativamente. Houve uma baixa regulação dessa proteína em *L. aequinoctialis* sob estresse por Cd, podendo indicar que a planta necessitaria de uma maior demanda de genes relacionados a diminuição de metais.

Sobretudo, a sua diminuição pode estar ligada ao aparecimento de Metalotioneína em *L. aequinoctialis* sob tratamento por Cd, uma vez que plantas com superexpressão de proteína 1 de ligação ao GTP está associada ao aparecimento de manchas, fungos e aumento de peróxido de hidrogênio, denunciando sua maior sensibilidade (WONG, et al. 2004).

A defensina (Spot 778) é uma classe de proteínas de baixo peso molecular, associadas ao estresse biótico, pois apresentam características antimicrobianas (SHAFEE, et al. 2017). Neste caso, ela foi inibida em *L. aequinoctialis* sob tratamento por Cd, sendo exclusiva do controle. Curiosamente existem trabalhos que encontraram um possível papel para as defensinas no controle e na tolerância de metais, incluindo o Cd (MIROUZE, 2006; MAHNAM, 2014). Por se tratar de proteína de baixo peso molecular, a purificação e identificação são mais difíceis por técnicas convencionais quantitativas de análises.

A proteína REM8 contendo domínio B3 (spot 656), exclusiva de *L. aequinoctialis* submetidas ao tratamento com Cd, é uma proteína sinalizante, que se comunica com o núcleo celular em resposta a estresses provocados na planta. Essa proteína, juntamente com o inibidor 1 de proteinase induzida por ferida (spot 641), também exclusiva do tratamento com Cd, atuam de maneira a mitigar danos mecânicos, induzindo um fator que aumenta os inibidores de proteinase I e II. Pode-se argumentar que essas proteínas foram positivamente acumuladas, de modo a gerenciar uma defesa da planta mais eficiente, contra danos provocados por agentes biológicos, de modo que a planta ficasse menos suscetível, mesmo no tratamento com Cd.

A ATPase 1 semelhante Obg (spot 702) pertencente à família de proteínas GTPases, também apresentou maior acumulação, sendo exclusiva do tratamento com Cd. Essa proteína apresenta várias funções moleculares, dentre elas de ligação ao GTP/GTPases e ligação de íons metálicos. Pesquisas tem demonstrado a eficiência dessa proteína, que é acumulada também quando ocorre danos ao DNA, na regulação dos níveis de EROs (ZHANG, 2009). Já em estudos com metais, o aumento da expressão dessa proteína pode indicar um possível papel regulador dos níveis de metal e do controle REDOX celular (MARTÍNEZ, 2016).

Um importante mecanismo celular é o modo pelo qual a célula regula suas proteínas, seja pelo silenciamento gênico ou através do catabolismo de proteínas que porventura estejam com erros de tradução, ou que a célula não necessite. Argonauta 5 (spot 755) é uma proteína que atua como componente do complexo de silenciamento

gênico, regulando sobretudo microRNAs (miRNA) e atuando de modo a inibir a síntese de proteína ou sua degradação no proteossoma, portanto é fundamental tanto na resposta à estresses quanto na síntese proteína. A regulação de miRNAs pode favorecer a planta sob diferentes tipos de estresses, incluindo metais. Estudos mostram que a proteína é regulada positivamente em metais como arsênio (TANG, 2019) e Césio (JUNG, 2015).

Em plantas, o sistema SnRK1 é um sistema de sinalização contra estresses ambientais, regulando negativamente processos biossintéticos de gasto de ATP, e induzindo processos catabólicos de geração de energia. A proteína Dedo de zinco FCS 17 (spot 758) foi encontrada no tratamento com Cd em *L. aequinoctialis*, provavelmente regulando e facilitando a interação do complexo SnRK1 com proteínas efetoras, o que indicaria um possível mecanismo econômico de energia, frente as condições estressantes em que a planta se encontra. (NIETZSCHE, 2014).

Uma das proteínas que tiveram regulação positiva de mais quase quatro vezes foi a proteína Ribose-5-fosfato isomerase (spot 248/250), a qual participa da conversão reversível de ribose-5-fosfato em ribulose-5-fosfato, uma etapa não oxidativa. A enzima participa também da degradação de carboidratos, sendo uma via secundária, e modulada positivamente em estresse por infecção bacteriana (SHEN, 2018). A proteína é alvo recente de pesquisas envolvendo biocatalizadores de açúcares raros e como fármaco para doenças envolvendo protozoários (CHEN, 2020). Embora essa enzima tenha um sítio ativo independente de metal, ela exibe uma maior atividade na presença de metais, uma evidência da possível relação dela com metais, e talvez um possível papel na via catalítica de carboidratos para tolerância de plantas à metais. Mas serão necessários mais estudos para confirmar essa relação (CHEN, 2020).

Uma outra enzima que apresentou regulação positiva, em aproximadamente 4 vezes mais, foi a Glutamato desidrogenase (spot 521). Em plantas, essa proteína atua na conversão reversível de glutamato em α -cetoglutarato. Trabalhos mostram o aumento da expressão de Glutamato desidrogenase no processo de defesa da planta contra o estresse induzido pelo Cd, um indicativo de que a estimulação dessas enzimas possa estar ligado ao aumento de glutamato, além de permitir a remodelação de nitrogênio proteico, em consequência da quebras de proteínas cloroplastidiais promovidas pelo Cd (CHAFFEI, 2006).

Uma das principais características de danos provocado por Cd são os danos no

DNA. Auxiliando na mitigação desses danos, *L. aequinoctialis* sob estresse por Cd acumulou exclusivamente a proteína de junção cruzada (spot 669). Essa proteína desempenha papel de reparo do DNA na recombinação homologa, atribuindo várias funções celulares indispensáveis a manutenção celular. O acúmulo exclusivo dessa proteína na condição estresse, denota uma instabilidade no DNA, e é possível que quebras e danos tenham permitido o aparecimento dessa proteína de maneira a diminuir ou consertar esses danos, além de permitir que esteja envolvida em processos de recombinação celular (OSMAN, 2003).

Dentre muitas proteínas de ligação, houve um acúmulo significativo de proteínas semelhantes a cinesina KIN-14D (spot 604). Dentre as principais funções desse grupo de proteínas, está a organização estrutural dos microtubulos durante a divisão celular (VINOGRADOVA, 2013) e a indução da divisão de organelas, como os cloroplastos (YOSHIDA, 2013).

Em plantas, proteínas de hipersensibilidade podem atuar como estratégia de defesa para a planta, sinalizando eventuais estresses bióticos, e promovendo maior eficiência na resposta (ZHOU et al, 2010). Foi regulado positivamente em quase duas vezes, a proteína 1 de resposta induzida por sensibilidade no nosso trabalho, indicando que estresses abióticos podem induzir uma resposta preventiva de possíveis ataques bióticos em plantas.

Uma das proteínas de maior acumulação no tratamento com Cd em *L. aequinoctialis* foi a proteína não descrita OSIGBa0146I21.5 (spot 711). A sequência mostra homologia com um provável transposon, essa proteína modula os genes de modo a regular os produtos necessários para recuperação celular em situações de estresse por Cd, principalmente modulações de proteínas envolvidas em danos ao DNA e a parede celular (SCHWAGER, 2012).

4.3.8 Proteínas de resposta ao cádmio

De modo geral, cada proteína diferencial do proteoma de *L. aequinoctialis* submetido ao tratamento com Cd reflete a modulação celular necessária para conter o estresse, porém proteínas mais específicas para o controle do desequilíbrio provocado pelo metal também são necessárias.

As metalotioneínas (MTs) são proteínas de baixo peso molecular que possuem função de desintoxicação celular, seja se ligando diretamente aos metais, devido à estrutura rica em cisteína; carregando elementos traços e metais, cujo transporte pode atuar de maneira direta na desintoxicação celular; carregando os metais até estruturas como tonoplasto; ou como carregadoras para outras proteínas ligantes. Encontramos acumulação exclusiva de MTs (spot 668) nos tratamentos com Cd, indicando uma tentativa de controlar os danos provocados pela presença do Cd no ambiente celular e no controle do estresse oxidativo (QUAN, 2006; LESZCZYSZYN, 2013).

Dentre as proteínas com coeficientes de variação (ratio) mais significativos, a maior foi uma proteína translocase, AT1G10130 (spot 385), não caracterizada. Através da sequência fasta, obtivemos 108 variantes ortólogas para esse gene, a maioria traduzida em uma proteína transportadora de cálcio (Ca^{2+}). Como o Cd entra no meio intracelular através dos canais de cálcio, devido a similaridade estrutural com o cálcio (PERFUS-BARBECH, 2002), pode estar ocorrendo o transporte do Cd através desses transportadores, para o interior celular e para locais onde a toxicidade do Cd não é tão danosa, como no vacúolo celular. Outros transportadores que foram altamente induzidos no tratamento com Cd foram o transportador ABC (spot 759) e a ATPase de prótons do tipo V (spot 667). Essas proteínas estão envolvidas no sequestro vacuolar de Cd (FU et al, 2019), pois em *Arabidopsis* ela mostrou certa especificidade pelo Cd. Nocaute gênico dessa proteína denotou maior sensibilidade da planta ao Cd, mas não mostrou qualquer alteração para outros metais pesados. Em aveia *Avena sativa* pode-se constatar a natureza tonoplástica dessa proteína e seu potencial de influxo de metais para o interior do vacúolo (SALT, 1993).

Outra proteína importante na tolerância do metal foi a Glutaredoxina C5 (spot 389). Essa proteína já foi relatada em trabalho envolvendo metais, onde a superexpressão forneceu uma forte tolerância aos metais pesados, reduzindo o acúmulo de metais, e favorecendo uma melhor atividade do sistema fisiológico antioxidante da planta (KUMAR, et al. 2020).

Desta forma, *Lemna aequinoctialis* respondeu de forma efetiva, indicando mecanismos de tolerância ao Cd. Os dados servirão para validação por expressão genica, além de fornecer informações importantes para elucidar as vias por trás dos mecanismos fitorremediadores de plantas, possibilitando ajudar a gerar variedades mais tolerantes ao Cd.

4.4 MODELO BIOLÓGICO DE *LEMNA AEQUINOCTIALIS* SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM CD.

O modelo biológico de *Lemna aequinoctialis* submetidos ao tratamento com Cd (figura 32) reflete os parâmetros fisiológicos e bioquímicos dos principais processos celulares.

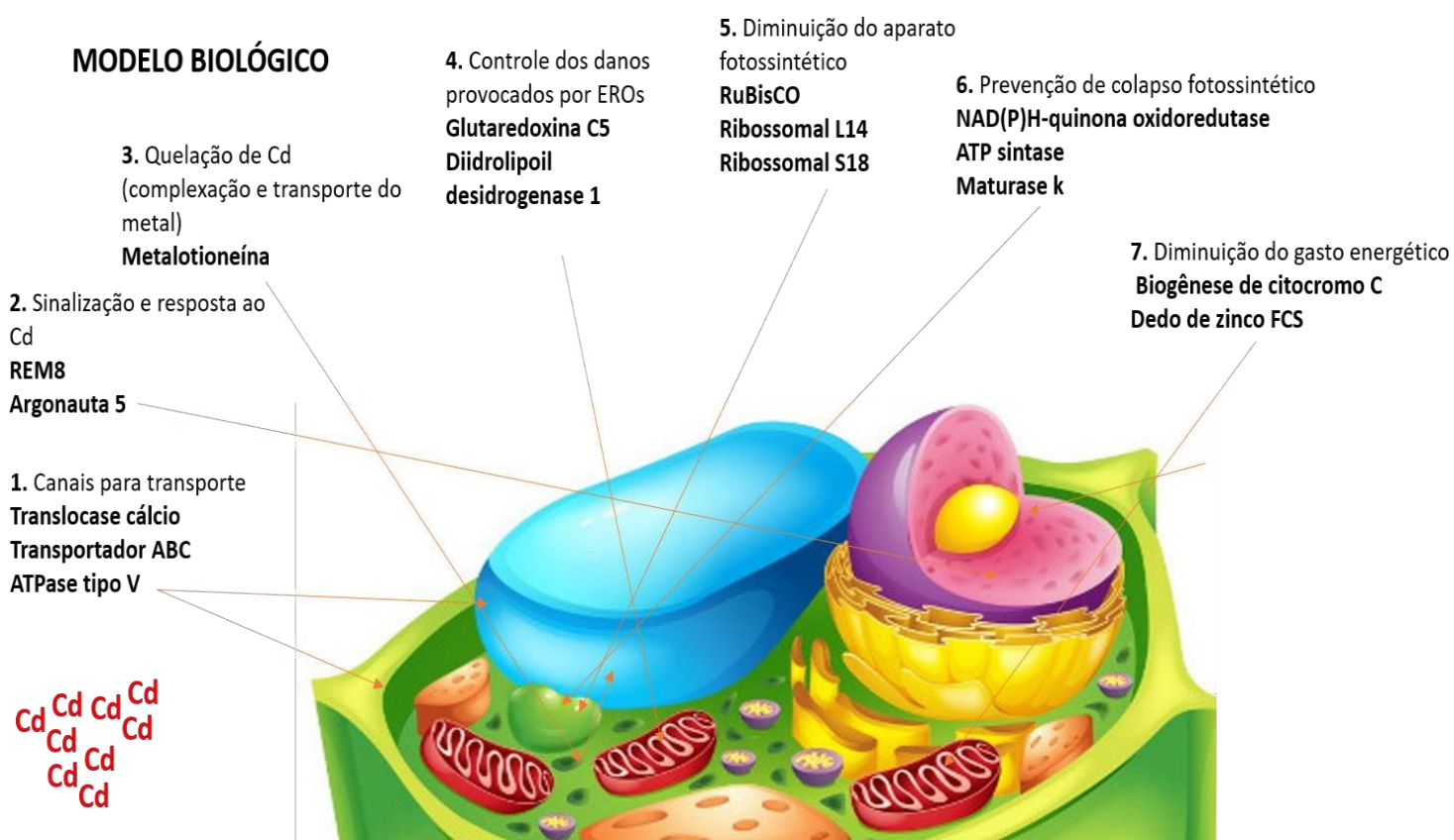


Figura 32. Representação do modelo biológico do proteoma diferencial de *Lemna aequinoctialis* RDSC5570 submetida ao tratamento com 10 μM de Cd.

5 CONCLUSÕES

Com base em tudo que analisamos de *Lemna aequinoctialis* exposta a cádmio, e todos os resultados que obtivemos, concluímos que:

- A concentração que mais se aproximou da concentração subletal de Cd em *L. aequinoctialis* foi a de 10 μ M de Cd.
- O isolado RDSC5570 de *L. aequinoctialis* apresentou variação fenotípica, fisiológica e genética frente ao estresse por Cd.
- O Cd reduziu o crescimento de *L. aequinoctialis*.
- Frondes de *L. aequinoctialis* submetidas ao Cd apresentaram clorose evidente, diminuição da fronde e perda e diminuição da raiz.
- Houve um significativo acúmulo de metais em *L. aequinoctialis* submetidos ao tratamento com Cd.
- O isolado RDSC5570 de *Lemna aequinoctialis* se mostrou um bom organismo biorremediador de Cd.
- Houve significativa redução da fotossíntese nas frondes de *Lemna aequinoctialis* submetidas ao estresse por Cd.
- A análise proteômica de *L. aequinoctialis* foi capaz de revelar os principais processos biológicos associados ao estresse por Cd.
- As modulações proteômicas foram condizentes com o quadro geral de desenvolvimento observado na planta.
- A tolerância de Cd em *L. aequinoctialis* pode estar associado às proteínas que foram moduladas.

REFERÊNCIAS

- ADAMIEC M, MISZTAL L, KASPROWICZ-MALUŚKI A, LUCIŃSKI R. **Egy3: homologue of s2p protease located in chloroplasts.** *PLANT BIOL(STUTTG)*. 2020;22(4):735-743. DOI:10.1111/PLB.13087
- AHMED EL,ZEINY, ABD,ALLA GAD, MAIE EL,GAMMAL, MAHMOUD IBRAHIM.(2016). *Phytochemical analysis and antimicrobial activities of Rhus mysorensis.* **International journal of advanced research**
- ALI B, GILL RA, YANG S, et al. Regulation of Cadmium-Induced Proteomic and Metabolic Changes by 5-Aminolevulinic Acid in Leaves of Brassica napus L. **PLoS One**. 2015;10(4):e0123328. Published 2015 Apr 24. doi:10.1371/journal.pone.0123328
- ALVES LR, RODRIGUES DOS REIS A, PRADO ER, et al. New insights into cadmium stressful-conditions: Role of ethylene on selenium-mediated antioxidant enzymes. **Ecotoxicol Environ Saf**. 2019;186:109747. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109747
- AN D, LI C, ZHOU Y, WU Y, WANG W. Genomes and Transcriptomes of Duckweeds. *Front Chem*. 2018;6:230. Published 2018 Jun 20. doi:10.3389/fchem.2018.00230
- ANJUM NA, SHARMA P, GILL SS, et al. Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. **Environ Sci Pollut Res Int**. 2016;23(19):19002-19029. doi:10.1007/s11356-016-7309-6
- APPENROTH, K. J., N. BORISJUK AND E. LAM. 2013. Telling duckweed apart: Genotyping technologies for Lemnaceae. *Chin. J. Appl. Environ. Biol*. 19: 1-10 DOI: 10.3724/SP.J.1145.2013.00001
- AZEVEDO, Gracilene Fernandes da Costa. Parâmetros fotossintéticos e crescimento em mudas de Bertholletia excelsa e Carapa guianensis em resposta à pré-aclimatação à luz solar total e baixo estresse hídrico. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 44, n. 1, pág. 67-77, 2014. Disponível em doi.org/10.1590/S0044-59672014000100007.
- BAGHERI R, BASHIR H, AHMAD J, IQBAL M, QURESHI MI. Spinach (Spinacia oleracea L.) modulates its proteome differentially in response to salinity, cadmium and their combination stress. **Plant Physiol Biochem**. 2015;97:235-245. doi:10.1016/j.plaphy.2015.10.012
- BARBOSA NETO, A.G. ; MORAIS, M.B. ; CALSA JUNIOR, T. Proteômica diferencial associada ao crescimento de Lemna aequinoctialis cultivada na presença de efluente sanitário. Tese de doutorado, programa de pós graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco. 2017 “No prelo”.
- BOKHARI SH, MAHMOOD-UL-HASSAN M, AHMAD M. Phytoextraction of Ni, Pb and Cd by duckweeds. **Int J Phytoremediation**. 2019;21(8):799-806. doi:10.1080/15226514.2019.1566882
- BORGES KLR, SALVATO F, LOZIUK PL, MUDDIMAN DC, AZEVEDO RA.

Quantitative proteomic analysis of tomato genotypes with differential cadmium tolerance. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(25):26039-26051. doi:10.1007/s11356-019-05766-y

BRASIL, Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.

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: 9agost. 2019.

BRAUC S, DE VOOHT E, CLAEYS M, GEUNS JM, HÖFTE M, ANGENON G. Overexpression of arginase in *Arabidopsis thaliana* influences defence responses against *Botrytis cinerea*. *Plant Biol (Stuttg)*. 2012;14 Suppl 1:39-45. doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00520.x

CAIRNS NG, PASTERNAK M, WACHTER A, COBBETT CS, MEYER AJ. Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol*. 2006;141(2):446-455. doi:10.1104/pp.106.077982

CAO H.X., FOUROUNJIAN P., WANG W. (2018) The Importance and Potential of Duckweeds as a Model and Crop Plant for Biomass-Based Applications and Beyond. In: Hussain C. (eds) **Handbook of Environmental Materials Management**. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3_67-1

CAO HX, VU GT, WANG W, MESSING J, SCHUBERT I. Chromatin organisation in duckweed interphase nuclei in relation to the nuclear DNA content. *Plant Biol (Stuttg)*. 2015;17 Suppl 1:120-124. doi:10.1111/plb.12194

CHAFFEI C, SUZUKI A, MASCLAUX-DAUBRESSE C, GHORBEL MH, GOUIA H. Implication du glutamate, de l'isocitrate et de la malate déshydrogénases dans l'assimilation de l'azote chez la tomate stressée par le cadmium [Implication of glutamate, isocitrate and malate deshydrogenases in nitrogen assimilation in the cadmium-stressed tomato]. *C R Biol*. 2006;329(10):790-803. doi:10.1016/j.crv.2006.06.008

CHAUDHURI, DEVALEENA & MAJUMDAR, ARUNABHA & MISRA, AMAL & BANDYOPADHYAY, KAUSHIK. (2014). Cadmium Removal by *Lemna minor* and *Spirodela polyrrhiza*. *International journal of phytoremediation*. 16. 1119-32. 10.1080/15226514.2013.821446.

CHEN J, WU H, ZHANG W, MU W. Ribose-5-phosphate isomerases: characteristics, structural features, and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2020;104(15):6429-6441. doi:10.1007/s00253-020-10735-4

CHEN LJ, ZOU WS, FEI CY, et al. α -Expansin EXPA4 Positively Regulates Abiotic Stress Tolerance but Negatively Regulates Pathogen Resistance in *Nicotiana tabacum*. **Plant Cell Physiol**. 2018;59(11):2317-2330. doi:10.1093/pcp/pcy155

CHEN X, OUYANG Y, FAN Y, QIU B, ZHANG G, ZENG F. The pathway of transmembrane cadmium influx via calcium-permeable channels and its spatial characteristics along rice root. **J Exp Bot**. 2018;69(21):5279-5291. doi:10.1093/jxb/ery293

CHAUDHURI, DEVALEENA & MAJUMDAR, ARUNABHA & MISRA, AMAL & BANDYOPADHYAY, KAUSHIK. (2014). Cadmium Removal by *Lemna minor* and *Spirodela polyrrhiza*. **International journal of phytoremediation**. 16. 1119-32. 10.1080/15226514.2013.821446

CHRESTENSEN CA, STARKE DW, MIEYAL JJ. Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (Glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. **J Biol Chem**. 2000;275(34):26556-26565. doi:10.1074/jbc.M004097200

COUTURIER J, STRÖHER E, ALBETEL AN, et al. Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin C5 as a model to explore molecular determinants for iron-sulfur cluster binding into glutaredoxins. **J Biol Chem**. 2011;286(31):27515-27527. doi:10.1074/jbc.M111.228726

CUI W, CHENG JJ. Growing duckweed for biofuel production: a review. **Plant Biol (Stuttg)**. 2015;17 Suppl 1:16-23. doi:10.1111/plb.12216

DAVID C. THOMAS, SIMON CLARE, JOHN M. SOWERBY, MERCEDES PARDO, JATINDER K. JUSS, DAVID A. GOULDING, LOUISE VAN DER WEYDEN, DANIEL STORISTEANU, ANANTH PRAKASH, MARION ESPÉLI, SHAUN FLINT, JAMES C. LEE, KIM HOENDERDOS, LEANNE KANE, KATHERINE HARCOURT, SUBHANKAR MUKHOPADHYAY, YAGNESH UMRANIA, ROBIN ANTROBUS, JAMES A. NATHAN, DAVID J. ADAMS, ALEX BATEMAN, JYOTI S. CHOUDHARY, PAUL A. LYONS, ALISON M. CONDLIFFE, EDWIN R. CHILVERS, GORDON DOUGAN, KENNETH G.C.

SMITH; Eros is a novel transmembrane protein that controls the phagocyte respiratory burst and is essential for **innate immunity**. *J Exp Med* 3 April 2017;214 (4): 1111–1128. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20161382>

DUFFUS, J.H. (2002) Heavy Metal-A Meaningless Term? **Pure and Applied Chemistry**, 74, 793-807. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200274050793>

ECHEVARRÍA-ZOMEÑO S, FERNÁNDEZ-CALVINO L, CASTRO-SANZ AB, LÓPEZ JA, VÁZQUEZ J, CASTELLANO MM. Dissecting the proteome dynamics of the early heat stress response leading to plant survival or death in

Arabidopsis. **Plant Cell Environ.** 2016;39(6):1264-1278. doi:10.1111/pce.12664

EKPERUSI AO, SIKOKI FD, NWACHUKWU EO. Application of common duckweed (Lemna minor) in phytoremediation of chemicals in the environment: State and future perspective. **Chemosphere.** 2019;223:285-309. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.02.025

ELBEKAI RH, EL-KADI AO. Arsenite and cadmium, but not chromium, induce NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 through transcriptional mechanisms, in spite of post-transcriptional modifications. **Toxicol In Vitro.** 2008;22(5):1184- 1190. doi:10.1016/j.tiv.2008.03.010

EMAMVERDIAN A, DING Y, MOKHBERDORAN F, XIE Y. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. **ScientificWorldJournal.** 2015;2015:756120. doi:10.1155/2015/756120

FAGIONI M, D'AMICI GM, TIMPERIO AM, ZOLLA L. Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. **J Proteome Res.** 2009;8(1):310-326. doi:10.1021/pr800507x

FOYER CH, NOCTOR G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redoxhub. **Plant Physiol.** 2011;155(1):2-18. doi:10.1104/pp.110.167569

FRASCH WD. The participation of metals in the mechanism of the F(1)- ATPase. **Biochim Biophys Acta.** 2000;1458(2-3):310-325. doi:10.1016/s0005-2728(00)00083-9

FREITAS, L. C; SILVA, A.C.S.; JUNIOR, T. C. P Proteômica diferencial de *Lemna aequinoctialis* sob estresse por chumbo. Dissertação de mestrado (2020). Programa de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco. "noprolo"

FU S, LU Y, ZHANG X, et al. The ABC transporter ABCG36 is required for cadmium tolerance in rice. **J Exp Bot.** 2019;70(20):5909-5918. doi:10.1093/jxb/erz335

FU, L., HUANG, M., HAN, B. ET AL. Flower induction, microscope-aided cross-pollination, and seed production in the duckweed *Lemna gibba* with discovery of a male-sterile clone. **Sci Rep** 7, 3047 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03240-8>

GASPAR, T., FRANCK, T., BISBIS, B. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation** 37, 263–285 (2002). <https://doi.org/10.1023/A:1020835304842>

GILL SS, ANJUM NA, GILL R, et al. Superoxide dismutase--mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environ Sci Pollut Res Int.** 2015;22(14):10375-10394. doi:10.1007/s11356-015-4532-5

- GILL SS, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol Biochem.** 2010;48(12):909-930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- GÖBEL C, FEUSSNER I. Methods for the analysis of oxylipins in plants. **Phytochemistry.** 2009;70 (13-14):1485-1503. doi:10.1016/j.phytochem.2009.07.040
- GRAVES PR, HAYSTEAD TA. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2002;66(1):39-63. doi:10.1128/mmbr.66.1.39-63.2002
- GUIMARÃES, MARCELO & DE SANTANA, TESSIO & SILVA, EZEQUIEL & ZENZEN, IVAN & LOUREIRO, MARCELO. (2008). Cadmium toxicity and tolerance in plants (Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas). **Revista Trópica - Ciências Agrárias e do Ambiente.** 1. 58-68.
- HALMEMIES-BEAUCHET-FILLEAU A, RINNE M, LAMMINEN M, et al. Review: Alternative and novel feeds for ruminants: nutritive value, product quality and environmental aspects. **Animal.** 2018;12(s2):s295-s309. doi:10.1017/S1751731118002252
- HOANG, P.T.N., SCHUBERT, V., MEISTER, A. *et al.* Variation in genome size, cell and nucleus volume, chromosome number and rDNA loci among duckweeds. **Sci Rep** 9, 3234 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39332-w>
- HU Z, COOLS T, DE VEYLDER L. Mechanisms Used by Plants to Cope with DNA Damage. **Annu Rev Plant Biol.** 2016;67:439-462. doi:10.1146/annurev-arplant-043015-111902
- HUSSEIN, HUSSEIN KHAMIS et al. Estimation of some heavy metals in polluted well water and mercury accumulation in broiler organs. *Braz. arch. biol. Technol. Curitiba* , v. 56, n. 5, p. 767-776, Oct. 2013. doi.org/10.1590/S1516-89132013000500007
- HUYBRECHTS M, CUYPERS A, DECKERS J, et al. Cadmium and Plant Development: An Agony from Seed to Seed. **Int J Mol Sci.** 2019;20(16):3971. Published 2019 Aug 15. doi:10.3390/ijms20163971
- INOUE, MASAHIRO. (2005). Phytochelatins. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17(1), 65-78. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100006>
- ISMAEL MA, ELYAMINE AM, MOUSSA MG, CAI M, ZHAO X, HU C. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. **Metalomics.** 2019;11(2):255-277. doi:10.1039/c8mt00247a
- JIA-YANG LI, JUN WANG, ROBERT S ZEIGLER, The 3,000 rice genomes project: new opportunities and challenges for future rice research. **GigaScience**, Volume 3, Issue 1, December 2014, 2047–217X–3–8, <https://doi.org/10.1186/2047-217X-3-8>

JOZEF CZAK M, BOHLER S, SCHAT H, et al. Both the concentration and redoxstate of glutathione and ascorbate influence the sensitivity of arabidopsis to cadmium. **Ann Bot.** 2015;116(4):601-612. doi:10.1093/aob/mcv075

JUNG IL, RYU M, CHO SK, et al. Cesium Toxicity Alters MicroRNA Processing and AGO1 Expressions in Arabidopsis thaliana. **PLoS One.** 2015;10 (5):e0125514. Published 2015 May 6. doi:10.1371/journal.pone.0125514

KALININA EV, CHERNOV NN, NOVICHKOVA MD. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. **Biochemistry (Mosc).** 2014;79(13):1562-1583. doi:10.1134/S0006297914130082

KIEL MC, KAJI H, KAJI A. Ribosome recycling: An essential process of protein synthesis. **Biochem Mol Biol Educ.** 2007;35(1):40-44. doi:10.1002/bmb.6

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Hum Genet** 26, 231–243 (1975). <https://doi.org/10.1007/BF00281458>

KO, S., SUN, H., OH, M.J. et al. Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed, *Lemna minor*. **Hortic. Environ. Biotechnol.** 52, 511 (2011). <https://doi.org/10.1007/s13580-011-0007-x>

KREIDER AN, FERNANDEZ PULIDO CR, BRUNS MA, BRENNAN RA. Duckweed as an Agricultural Amendment: Nitrogen Mineralization, Leaching, and Sorghum Uptake. **J Environ Qual.** 2019;48(2):469-475. doi:10.2134/jeq2018.05.0207

KRISHNAN, HARI. (2009). Krishnan, H.B. and Natarajan, S.S. 2009. A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. **Phytochemistry** 70:1958-1964.. *Phytochemistry*.

KUMAR A, DUBEY AK, KUMAR V, et al. Over-expression of chickpea glutaredoxin (CaGrx) provides tolerance to heavy metals by reducing metal accumulation and improved physiological and antioxidant defence system. **Ecotoxicol Environ Saf.** 2020;192:110252. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110252

KÜPPER H, KÜPPER F, SPILLER M (1996) Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. **J Exp Bot** 47:259–266

KUTSCHERA U, NIKLAS KJ. Darwin-Wallace Demons: survival of the fastest in populations of duckweeds and the evolutionary history of an enigmatic group of angiosperms. **Plant Biol (Stuttg).** 2015;17 Suppl 1:24-32. doi:10.1111/plb.12171

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

LANE TW, SAITO MA, GEORGE GN, PICKERING IJ, PRINCE RC, MOREL FM. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. **Nature**. 2005;435(7038):42. doi:10.1038/435042^a

LEE SJ, LIM KT. Cell death signal by glycine- and proline-rich plant glycoprotein is transferred from cytochrome c and nuclear factor kappa B to caspase 3 in Hep3B cells. **J Nutr Biochem**. 2008;19(3):166-174. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.02.006

LESZCZYSZYN OI, IMAM HT, BLINDAUER CA. Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions. **Metallomics**. 2013;5(9):1146-1169. doi:10.1039/c3mt00072a

LU DP, CHRISTOPHER DA. Light enhances the unfolded protein response as measured by BiP2 gene expression and the secretory GFP-2SC marker in Arabidopsis. **Physiol Plant**. 2008;134(2):360-368. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01133.x

MA Y, RAJKUMAR M, ROCHA I, OLIVEIRA RS, FREITAS H. Serpentine bacteria influence metal translocation and bioconcentration of Brassica juncea and Ricinus communis grown in multi-metal polluted soils. **Front Plant Sci**. 2015;5:757. Published 2015 Jan 5. doi:10.3389/fpls.2014.00757

MA JF, UENO D, ZHAO FJ, MCGRATH SP. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of Thlaspi caerulescens. **Planta**. 2005;220(5):731-736. doi:10.1007/s00425-004-1392-5.

MAHNAM K, FORUZANDEH S, MIRAKHORLI N, SAFFAR B. Experimental and theoretical studies of cadmium ions absorption by a new reduced recombinant defensin. **J Biomol Struct Dyn**. 2018;36(8):2004-2014. doi:10.1080/07391102.2017.1340851

MARTÍNEZ-BAEZA E, ROJAS E, VALVERDE M. Metal mixture (As-Cd-Pb)-induced cell transformation is modulated by OLA1. **Mutagenesis**. 2016;31(4):463-473. doi:10.1093/mutage/gew010

MEGATELI S, SEMSARI S, COUDERCHET M. Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by Lemna gibba. **Ecotoxicol Environ Saf**. 2009;72(6):1774-1780. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.05.004

MHAMDI, AMNA & QUEVAL, GUILLAUME & CHAOUCH, SEJIR & VANDERAUWERA, SANDY & VAN BREUSEGEM, FRANK & NOCTOR, GRAHAM. (2010). Catalase function in plants: A focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of experimental botany**. 61. 4197-220. doi:10.1093/jxb/erq282

MIROUZE M, SELS J, RICHARD O, et al. A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. **Plant J.** 2006;47(3):329-342. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02788.x

MORAIS, M.B., BARBOSA-NETO, A.G., WILLADINO, L. et al. Salt Stress Induces Increase in Starch Accumulation in Duckweed (*Lemna aequinoctialis*, Lemnaceae): Biochemical and Physiological Aspects. **J Plant Growth Regul** **38**, 683–700 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9882-z>

MUSZYŃSKA E, LABUDDA M, KAMIŃSKA I, GÓRECKA M, BEDERSKA-BŁASZCZYK M. Evaluation of heavy metal-induced responses in *Silene vulgaris* ecotypes. **Protoplasma.** 2019;256(5):1279-1297. doi:10.1007/s00709-019-01384-

MUSZYŃSKA E, LABUDDA M. Effects of lead, cadmium and zinc on protein changes in *Silene vulgaris* shoots cultured in vitro [published online ahead of print, 2020 Aug 8]. **Ecotoxicol Environ Saf.** 2020;204:111086. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111086

NAUMANN B, EBERIUS M, APPENROTH KJ. Growth rate based dose- response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. **J Plant Physiol.** 2007;164(12):1656-1664. doi:10.1016/j.jplph.2006.10.011

NELLAEPALLI, S., OZAWA, S., KURODA, H. et al. O aparato de montagem do fotossistema I consiste nos módulos Ycf3 – Y3IP1 e Ycf4. **Nat Commun** **9**, 2439 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04823-3>

NIETZSCHE M, SCHIEßL I, BÖRNKE F. The complex becomes more complex: protein-protein interactions of SnRK1 with DUF581 family proteins provide a framework for cell- and stimulus type-specific SnRK1 signaling in plants [published correction appears in Front Plant Sci. 2014;5:693]. **Front Plant Sci.** 2014;5:54. Published 2014 Feb 21. doi:10.3389/fpls.2014.00054

NOCTOR G, MHAMDI A, CHAOUCH S, et al. Glutathione in plants: an integrated overview. **Plant Cell Environ.** 2012;35(2):454-484. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x

ONO E, WONG HL, KAWASAKI T, HASEGAWA M, KODAMA O, SHIMAMOTO K. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001;98(2):759-764. doi:10.1073/pnas.021273498

OSMAN F, DIXON J, DOE CL, WHITBY MC. Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. **Mol Cell.** 2003;12(3):761-774. doi:10.1016/s1097-2765(03)00343-5

PÁL M, CSÁVÁS G, SZALAI G, et al. Polyamines may influence phytochelatin synthesis during Cd stress in rice. **J Hazard Mater.** 2017;340:272-280. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.07.016.

PANFILI I, BARTUCCA ML, DEL BUONO D. The treatment of duckweed with a plant biostimulant or a safener improves the plant capacity to clean water polluted by terbuthylazine. **Sci Total Environ.** 2019;646:832-840. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.356

PAPPIREDDI N, MARTIN L, WÜHR M. A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics. **Chembiochem.** 2019;20(10):1210-1224. doi:10.1002/cbic.201800650

PAUNOV, MOMCHIL & KOLEVA, LYUBKA & VASSILEV, ANDON & VANGRONSVELD, JACO & GOLTSEV, VASILIJ. (2018). Effects of Different Metals on Photosynthesis: Cadmium and Zinc Affect Chlorophyll Fluorescence in Durum Wheat. International **Journal of Molecular Sciences.** 19. 787. 10.3390/ijms19030787.

PERFUS-BARBEOCH L, LEONHARDT N, VAVASSEUR A, FORESTIER C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **Plant J.** 2002;32(4):539-548. doi:10.1046/j.1365-313x.2002.01442.x

PETRAT F, PALUCH S, DOGRUÖZ E, et al. Reduction of Fe(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes in vitro: implications for an enzymatic reduction of Fe(III) ions of the labile iron pool. **J Biol Chem.** 2003;278(47):46403-46413. doi:10.1074/jbc.M305291200

PILON-SMITS E. Phytoremediation. **Annu Rev Plant Biol.** 2005;56:15-39. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214

PIROVANI CP, CARVALHO HA, MACHADO RC, et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis.** 2008;29(11):2391-2401. doi:10.1002/elps.200700743

PLOMION C, LALANNE C, CLAVEROL S, et al. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. **Proteomics.** 2006;6(24):6509-6527. doi:10.1002/pmic.200600362

QUAN XQ, ZHANG HT, SHAN L, BI YP. *Yi Chuan.* 2006;28(3):375-382.

RAZINGER J, DERMASTIA M, KOCE JD, ZRIMEC A. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. **Environ Pollut.** 2008;153(3):687-694. doi:10.1016/j.envpol.2007.08.018

- REA PA. Phytochelatin synthase: of a protease a peptide polymerasemade. **Physiol Plant**. 2012;145(1):154-164. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01571.x
- REN Y, CHEN Y, AN J, et al. Wheat expansin gene TaEXPA2 is involved in conferring plant tolerance to Cd toxicity. **Plant Sci**. 2018;270:245-256. doi:10.1016/j.plantsci.2018.02.022
- RIZWAN M, ALI S, ADREES M, et al. Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. **Environ Sci Pollut Res Int**. 2016;23(18):17859-17879. doi:10.1007/s11356-016-6436-4
- SALT DE, WAGNER GJ. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity. **J Biol Chem**. 1993;268(17):12297-12302.
- SARRY JE, KUHN L, DUCRUIX C, et al. The early responses of Arabidopsis thaliana cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. **Proteomics**. 2006;6(7):2180-2198. doi:10.1002/pmic.200500543
- SASAKI A, YAMAJI N, YOKOSHO K, MA JF. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. **Plant Cell**. 2012;24(5):2155-2167. doi:10.1105/tpc.112.096925
- SCHWAGER S, LUMJIAKTASE P, STÖCKLI M, WEISSKOPF L, EBERL L. The genetic basis of cadmium resistance of Burkholderia cenocepacia. **Environ Microbiol Rep**. 2012;4(5):562-568. doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00372.x
- SEMANE B, DUPAE J, CUYPERS A, et al. Leaf proteome responses of Arabidopsis thaliana exposed to mild cadmium stress. **J Plant Physiol**. 2010;167(4):247-254. doi:10.1016/j.jplph.2009.09.015
- SERPİL ÜNYAYAR, AYLA ÇELİK, F.ÖZLEM ÇEKİÇ, AYŞİN GÖZEL, Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*, **Mutagenesis**, Volume 21, Issue 1, January 2006, Pages 77–81, <https://doi.org/10.1093/mutage/gel001>
- SHAFEE TM, LAY FT, PHAN TK, ANDERSON MA, HULETT MD. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. **Cell Mol Life Sci**. 2017;74(4):663-682. doi:10.1007/s00018-016-2344-5
- SHAHID M, DUMAT C, KHALID S, NIAZI NK, ANTUNES PMC. Cadmium Bioavailability, Uptake, Toxicity and Detoxification in Soil-Plant System. **Rev Environ Contam Toxicol**. 2017; 241:73-137. doi:10.1007/398_2016_8
- SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, BALIGA NS, WANG JT, RAMAGE D, AMIN N, SCHWIKOWSKI B, IDEKER T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks **Genome Research** 2003 Nov; 13(11):2498-504

SHARMA MR, DÖNHÖFER A, BARAT C, et al. PSRP1 is not a ribosomal protein, but a ribosome-binding factor that is recycled by the ribosome-recyclingfactor (RRF) and elongation factor G (EF-G). **J Biol Chem**. 2010;285(6):4006- 4014. doi:10.1074/jbc.M109.062299

SHEN M, JU X, XU X, et al. Characterization of Ribose-5-Phosphate IsomeraseB from Newly Isolated Strain *Ochrobactrum* sp. CSL1 Producing L-Rhamnulose from L-Rhamnose. **J Microbiol Biotechnol**. 2018;28(7):1122-1132. doi:10.4014/jmb.1802.02021

SINGH G, TRIPATHI S, SHANKER K, SHARMA A. Cadmium-induced conformational changes in type 2 metallothionein of medicinal plant *Coptis japonica*: insights from molecular dynamics studies of apo, partially and fully metalated forms. **J Biomol Struct Dyn**. 2019;37(6):1520-1533. doi:10.1080/07391102.2018.1461688

SMIRI M, CHAOUI A, EL FERJANI E. Respiratory metabolism in the embryonic axis of germinating pea seed exposed to cadmium. **J Plant Physiol**. 2009;166(3):259-269. doi:10.1016/j.jplph.2008.05.006

SONG X, YUE X, CHEN W, JIANG H, HAN Y, LI X. Detection of Cadmium Risk to the Photosynthetic Performance of *Hybrid Pennisetum*. **Front Plant Sci**. 2019;10:798. Published 2019 Jun 20. doi:10.3389/fpls.2019.00798

SORMANI R, DELANNOY E, LAGEIX S, et al. Sublethal cadmium intoxication in *Arabidopsis thaliana* impacts translation at multiple levels. **Plant Cell Physiol**. 2011;52(2):436-447. doi:10.1093/pcp/pcr001

SREE, K.; BOG, M.; APPENROTH, K. TAXONOMY OF DUCKWEEDS (LEMNACEAE), POTENTIAL NEW CROP PLANTS. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 5, p. 291-302, 4 nov. 2017.

SREE, K.S., DAHSE, H., CHANDRAN, J.N. et al. Duckweed for Human Nutrition: No Cytotoxic and No Anti-Proliferative Effects on Human Cell Lines. **Plant Foods Hum Nutr** **74**, 223–224 (2019). doi.org/10.1007/s11130-019-00725-x

SU C, JIANG Y, YANG Y, ZHANG W, XU Q. Responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to aluminum stress: Physiological and proteomics analyses. **Ecotoxicol Environ Saf**. 2019;170:127-140. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.11.113

TANG J, LI Y, MA J, CHENG JJ. Survey of duckweed diversity in Lake Chao and total fatty acid, triacylglycerol, profiles of representative strains. **Plant Biol (Stuttg)**. 2015;17(5):1066-1072. doi:10.1111/plb.12345

TANG Z, XU M, ITO H, et al. Deciphering the non-coding RNA-level response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). **Plant Signal Behav**. 2019;14 (9): 1629268. doi:10.1080/15592324.2019.1629268.

TERRÓN-CAMERO LC, PELÁEZ-VICO MÁ, DEL-VAL C, SANDALIO LM, Romero-Puertas MC. Role of nitric oxide in plant responses to heavy metal stress: exogenous application versus endogenous production. **J Exp Bot.** 2019;70(17):4477-4488. doi:10.1093/jxb/erz184.

THABIT S, HANDOUSSA H, ROXO M, CESTARI DE AZEVEDO B, S E EL SAYED N, WINK M. *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott Fruits Increase Stress Resistance and Exert Antioxidant Properties in *Caenorhabditis elegans* and Mouse Models. **Molecules.** 2019;24(14):2633. Published 2019 Jul 19. doi:10.3390/molecules24142633.

TOMÀS GINER M, JIMÉNEZ-MARTÍ E, BOFILL ARASA R, et al. Analysis of the soybean metallothionein system under free radical stress: protein modification connected to lipid membrane damage. **Metallomics.** 2018;10(12):1792-1804. doi:10.1039/c8mt00164b.

TYERS M, MANN M. From genomics to proteomics. **Nature.** 2003;422(6928):193-197. doi:10.1038/nature01510.

URUÇ PARLAK K, DEMIREZEN YILMAZ D. Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* L. exposed to cadmium. **Ecotoxicol Environ Saf.** 2013;91:79-85. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.009

VALKO M, MORRIS H, CRONIN MT. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr Med Chem.** 2005;12(10):1161-1208. doi:10.2174/0929867053764635

VIDAKOVIĆ-CIFREK Ž, TKALEC M, ŠIKIĆ S, TOLIĆ S, LEPEDUŠ H, PEVALEK-KOZLINA B. Growth and photosynthetic responses of *Lemna minor* L. exposed to cadmium in combination with zinc or copper. **Arh Hig Rada Toksikol.** 2015;66(2):141-152. doi:10.1515/aiht-2015-66-2618

VINOGRADOVA MV, MALANINA GG, WAITZMAN JS, RICE SE, FLETTERICK RJ. Plant Kinesin-Like Calmodulin Binding Protein Employs Its Regulatory Domain for Dimerization. **PLoS One.** 2013;8(6):e66669. Published 2013 Jun 21. doi:10.1371/journal.pone.0066669

WADA T, PENNINGER JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. **Oncogene.** 2004;23(16):2838-2849. doi:10.1038/sj.onc.1207556

WANG Y, JIANG X, LI K, ET AL. Photosynthetic responses of *Oryza sativa* L. seedlings to cadmium stress: physiological, biochemical and ultrastructural analyses. **Biomaterials.** 2014;27(2):389-401. doi:10.1007/s10534-014-9720-0

WELCHEN E, GONZALEZ DH. Cytochrome c, a hub linking energy, redox, stress and signaling pathways in mitochondria and other cell compartments. **Physiol Plant.** 2016;157(3):310-321. doi:10.1111/ppl.12449

WONG HL, SAKAMOTO T, KAWASAKI T, UMEMURA K, SHIMAMOTO K. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small

GTPase OsRac1 in rice. **Plant Physiol.** 2004;135(3):1447-1456.
doi:10.1104/pp.103.036384

WU Y, YUAN Y, YUAN H, ZHANG W, ZHANG L. Predicting cadmium toxicity with the kinetics of phytochelatin induction in a marine diatom. **Aquat Toxicol.** 2019;207:101-109. doi:10.1016/j.aquatox.2018.12.008

WU, X., COBBINA, SJ, MAO, G. *et al.* Uma revisão da toxicidade e dos mecanismos individuais e das misturas de metais pesados no meio ambiente. **Environ Sci Pollut Res** **23**, 8244–8259 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>

YIN, L., ZHOU, Y., FAN, X. *et al.* Induction of Phytochelatins in *Lemna aequinoctialis* in Response to Cadmium Exposure. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 68, 561–568 (2002). <https://doi.org/10.1007/s001280291>

YOSHIDA Y, FUJIWARA T, IMOTO Y, *et al.* The kinesin-like protein TOP promotes Aurora localisation and induces mitochondrial, chloroplast and nuclear division. **J Cell Sci.** 2013;126(Pt 11):2392-2400. doi:10.1242/jcs.116798

YU, C., ZHAO, X., QI, G. *et al.* Integrated analysis of transcriptome and metabolites reveals an essential role of metabolic flux in starch accumulation under nitrogen starvation in duckweed. **Biotechnol Biofuels** 10, 167 (2017).
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0851-8>

ZAYED, ADEL & GOWTHAMAN, SUVARNALATHA & TERRY, NORMAN. (1998). Phytoaccumulation of Trace Elements by Wetland Plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality - J ENVIRON QUAL.* 27. 10.2134/jeq1998.00472425002700030032x.

ZENG F, ALI S, ZHANG H, *et al.* The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. **Environ Pollut.** 2011;159(1):84-91. doi:10.1016/j.envpol.2010.09.019

ZHANG JW, RUBIO V, ZHENG S, SHI ZZ. Knockdown of OLA1, a regulator of oxidative stress response, inhibits motility and invasion of breast cancer cells. **J Zhejiang Univ Sci B.** 2009;10(11):796-804. doi:10.1631/jzus.B0910009

ZHANG W, DU B, LIU D, QI X. Splicing factor SR34b mutation reduces cadmium tolerance in Arabidopsis by regulating iron-regulated transporter 1 gene. **Biochem Biophys Res Commun.** 2014;455(3-4):312-317. doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.017

ZHAO Z, SHI H, KANG X, *et al.* Inter- and intra-specific competition of duckweed under multiple heavy metal contaminated water. **Aquat Toxicol.** 2017;192:216-223. doi:10.1016/j.aquatox.2017.09.023

ZHAO Z, SHI H, LIU C, *et al.* Duckweed diversity decreases heavy metal toxicity by altering the metabolic function of associated microbial communities.

Chemosphere. 2018;203:76-82. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.03.175

ZHOU L, CHEUNG MY, LI MW, et al. Rice hypersensitive induced reaction protein 1 (OsHIR1) associates with plasma membrane and triggers hypersensitive cell death. **BMC Plant Biol**. 2010;10:290. Published 2010 Dec30. doi:10.1186/1471-2229-10-290

ZHOU Q, CAI Q. The superoxide dismutase genes might be required for appropriate development of the ovule after fertilization in *Xanthoceras sorbifolium*. **Plant Cell Rep**. 2018;37(5):727-739. doi:10.1007/s00299-018-2263-z

ZIEGLER P, ADELMANN K, ZIMMER S, SCHMIDT C, APPENROTH KJ. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. **Plant Biol (Stuttg)**. 2015;17 Suppl 1:33-41. doi:10.1111/plb.12184.