

MARLON GOMES DIAS

**POLIAMINAS COMO ATENUANTES DE ESTRESSE POR CÁDMIO EM
CAPUCHINHA (*Tropaeolum majus* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Antonio Saraiva Grossi

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

D541p
2022
Dias, Marlon Gomes, 1993-
Poliaminas como atenuantes de estresse por cádmio em
capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) / Marlon Gomes Dias. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (50 f.): il.

Orientador: José Antonio Saraiva Grossi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Agronomia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.525>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Plantas - Efeito do cádmio. 2. Capuchinha -
Metabolismo. 3. Metais pesados. 4. Hormônios vegetais.
I. Grossi, José Antonio Saraiva, 1966-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Agronomia. Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 635.921

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

MARLON GOMES DIAS

**POLIAMINAS COMO ATENUANTES DE ESTRESSE POR CÁDMIO EM
CAPUCHINHA (*Tropaeolum majus* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de agosto de 2022.

Assentimento:

Marlon Gomes Dias

Marlon Gomes Dias

Autor

José Antonio Saraiva Grossi

José Antonio Saraiva Grossi

Orientador

*À ciência e a
Todos que confiam nela.
Pessoas boas se reconhecem.*

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, que ainda me deixa com a esperança na humanidade e a capacidade de enfrentar os meus desafios e acreditar.

Aos meus grandes suportes, Papai (Caxuxa) e Mamãe (Terezinha), o apoio incondicional de vocês e todo o mérito da pessoa que me tornei. À Michelle, minha irmã e grande inspiração e modelo a seguir, pela sua coragem que almejo ter um dia. À Herbert e pequeno Arthur que adentraram a família posteriormente, mas todos juntos somos a melhor família que poderia ter.

A Toshik Iarley, por ser meu companheiro dentro e fora do ambiente de trabalho. Este trabalho foi planejado, idealizado, executado e finalizado juntos, portanto, igualmente nosso.

À equipe do laboratório Renata Pedroza, Felipe Ferreira, Ricardo Pires, Fernando Filho, Lucas Bretas, Samuel Lannes e Rodrigo Consentino por todas as risadas e perrengues. Assim como aos funcionários da UEPE Belvedere (Floricultura/UFV), Antônio, Ricardo e Ernesto. A todos os amigos de residência durante o mestrado, em especial à Luiz Ismael Pereira e Inácio Teles, aos grandes amigos da LUVE – UFV e a todos os amigos que Viçosa me proporcionou.

Ao meu orientador, Antonio Grossi, pelos ensinamentos morais e intelectuais e pela paciência de me guiar todo esse tempo juntamente ao meu coorientador Juraci Alves no Laboratório de Biofísica Ambiental onde meus amigos, Daniel Coelho e Ari Gomes, contribuíram nas demandas desse trabalho. Aos professores, a profissão mais digna e mais valorizada por mim, que passaram pelo meu caminho e confiaram no meu potencial para a realização de grandes feitos,

À Universidade Federal de Viçosa, por toda a minha formação profissional e pessoal, desde a graduação e sem previsão de término, pois junto é nesta em que me constitui, cresci, me quebrei e reestruturei a ser quem eu gostaria de ser e posso dizer que consegui. À secretaria de Agricultura, pecuária e Abastecimento de Minas Gerais (SEAPA-MG), pela oportunidade de mostrar o bom profissional que posso ser, em especial a João Ricardo Albanez, Feliciano Nogueira e Gilson Sales.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001A Deus, pelo dom da vida e pela determinação que me destes para enfrentar as adversidades que cruzam a minha jornada.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.

(Aristóteles)

RESUMO

DIAS, M. G., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Poliaminas como atenuantes de estresse por cádmio em capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)** Orientador: José Antonio Saraiva Grossi.

A adubação fosfatada é comum na horticultura intensiva, bem como na floricultura, e, apesar de necessária, pode conter traços de cádmio (Cd), o qual é absorvido e acumulado pelas plantas sem, contudo, apresentar função biológica. As plantas possuem mecanismos de tolerância a metais contaminantes, os quais incluem retenção em determinados compartimentos, como as raízes; complexação em nível celular e ativação de processos metabólicos, como a síntese de poliaminas, para atenuar os efeitos tóxicos. O mercado de flores comestíveis está em expansão, dentre estas, a capuchinha (*Tropaeolum majus* L.), que é medicinal, ornamental e uma planta alimentícia não convencional. Com isso, o objetivo desta dissertação foi avaliar o acúmulo de Cd e o efeito de poliaminas como atenuante do estresse causado por esse metal na fisiologia e bioquímica de capuchinha. O trabalho foi desenvolvido em dois experimentos. O primeiro experimento foi distribuído em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos (0, 5, 10, 20, 40 e 80 μM Cd), com cinco repetições. O segundo experimento foi distribuído em DIC com seis tratamentos (controle (água deionizada), cádmio (0,8 mg kg^{-1} solo), cádmio + espermina (Spm), cádmio + putrescina (Put), cádmio + espermidina (Spd), cádmio + Spm+ Spd + Put), com cinco repetições. O acúmulo de Cd, enzimas do sistema antioxidante, peroxidação de lipídeos, fluorescência de clorofila a, trocas gasosas e índices de clorofila foram avaliados. As plantas de capuchinhas acumularam em suas estruturas quantidades maiores de Cd à medida que aumentou-se as doses, tendendo a ter alta bioconcentração do metal e diminuição da translocação. Além disso, as plantas de capuchinhas tiveram seu sistema antioxidante, trocas gasosas e fluorescência de clorofila afetados negativamente pelo Cd. O Cd afeta negativamente as plantas de capuchinhas, sendo uma alerta para a produção desta planta em áreas com concentrações deste metal. A aplicação de poliaminas aumenta a tolerância da capuchinha ao estresse por Cd através do aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante e diminuição produção de H_2O_2 e peroxidação de lipídios, minimizando os danos causados no aparato e processos fotossintéticos. A aplicação de 1 mM de poliaminas (Spm, Spd e Put e sua combinação) podem ser usadas para diminuir os danos causados pelo estresse por Cd em capuchinha.

Palavras-chave: Flor comestível. Metais Pesados. Fitormônios.

ABSTRACT

DIAS, M. G., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Polyamines as cadmium stress relievers in nasturtium (*Tropaeolum majus*)**. Adviser: José Antonio Saraiva Grossi.

Phosphate fertilization is common in intensive horticulture, as well as in floriculture, and, although necessary, it may contain traces of cadmium (Cd), which is absorbed and accumulated by plants without, however, having a biological function. Plants have mechanisms of tolerance to contaminating metals, which include retention in certain compartments, such as roots; complexation at the cellular level and activation of metabolic processes, such as polyamine synthesis, to attenuate toxic effects. The market for edible flowers is expanding, among them nasturtium (*Tropaeolum majus* L.), which is medicinal, ornamental and an unconventional food plant. With that, the objective of this dissertation was to evaluate the accumulation of Cd and the effect of polyamines as attenuating the stress caused by this metal in the physiology and biochemistry of nasturtium. The work was developed in two experiments. The first experiment was distributed in a completely randomized design (DIC), with six treatments (0, 5, 10, 20, 40 and 80 μM Cd), with five replications. The second experiment was distributed in DIC with six treatments (control (deionized water), cadmium (0.8 mg kg^{-1} soil), cadmium + spermine (Spm), cadmium + putrescine (Put), cadmium + spermidine (Spd), cadmium + Spm+ Spd + Put), with five repetitions. The accumulation of Cd, enzymes of the antioxidant system, lipid peroxidation, chlorophyll a fluorescence, gas exchange and chlorophyll indices were evaluated. Nasturtium plants accumulated higher amounts of Cd in their structures as doses increased, tending to have high metal bioconcentration and reduced translocation. In addition, nasturtium plants had their antioxidant system, gas exchange and chlorophyll fluorescence negatively affected by Cd. Cd negatively affects nasturtium plants, being an alert for the production of this plant in areas with concentrations of this metal. The application of polyamines increases nasturtium tolerance to Cd stress by increasing the activity of antioxidant system enzymes and decreasing H_2O_2 production and lipid peroxidation, minimizing damage to the apparatus and photosynthetic processes. The application of 1 mM of polyamines (Spm, Spd and Put and their combination) can be used to reduce the damage caused by Cd stress in nasturtium.

Keywords: Edible Flower. Heavy Metals. Phytohormones.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Referências	11
2. ARTIGO I – Respostas de <i>Tropaeolum majus</i> ao estresse por cádmio	14
2.1 Resumo	15
2.2 Abstract	15
2.3 Introdução	16
2.4 Material e Métodos	17
2.4.1 Delineamento experimental, material vegetal e tratamentos	17
2.4.2 Variáveis analisadas	17
2.4.3 Análise estatística	19
2.5 Resultados	19
2.6 Discussão	25
2.7 Conclusão	25
2.8 Referências	25
3. ARTIGO II – Poliaminas reduzem os danos do estresse por cádmio em <i>Tropaeolum majus</i>	30
3.1 Resumo	31
3.2 Abstract	31
3.3 Introdução	32
3.4 Material e Métodos	33
3.4.1 Local, delineamento experimental e material vegetal	33
3.4.2 Variáveis analisadas	33
3.4.3 Análise estatística	36
3.5 Resultados	36
3.6 Discussão	43
3.7 Conclusão	45
3.8 Referências	45
5. CONCLUSÕES	50

1. INTRODUÇÃO

A adubação fosfatada é uma necessidade da horticultura intensiva, conforme ocorre no setor de floricultura, assim como a utilização de outros insumos, como pesticidas e demais fertilizantes, os quais podem introduzir na natureza vários contaminantes químicos, incluindo traços de metais (Conrad et al., 2021). A introdução de cádmio (Cd) no solo pode ocorrer por meio de fertilizantes, principalmente adubos fosfatados, lodo de esgoto e materiais de compostagem (Park et al., 2021), o qual pode ser facilmente absorvido pelas plantas e acumular nas raízes, folhas, flores e frutos (ATSDR, 2012). A absorção e distribuição de Cd pelas plantas ocorre de forma semelhante ao cálcio, uma vez que possuem similaridade química, sendo que a biodisponibilidade no solo é dependente das condições de pH. A presença de Cd nos alimentos é variável e dependente de vários fatores, os quais incluem a biodisponibilidade no solo, a espécie de planta e a parte considerada para consumo, fazendo com o controle dessa contaminação na dieta seja etapa fundamental para a garantia de segurança alimentar (Schaefer et al., 2020).

Entre todos os estressores abióticos que ameaçam as plantas, a contaminação dos solos e águas por metais pesados é de particular importância, porque é um problema que vem afetando de forma persistente as lavouras e hortaliças há várias décadas, com consequências ainda mais exacerbadas, dados os efeitos do acúmulo desses compostos no solo. Além disso, é um problema relativamente desafiador para os produtores, porque as estratégias de extração ou remediação de metal ainda são muito caras e os regulamentos de uso ainda não foram estabelecidos (Spormann et al., 2020).

A floricultura é um ramo da horticultura onde se cultiva flores, podendo elas serem utilizadas como flor de vaso, flor de corte, planta ornamental ou flor comestível. Este setor, principalmente no Brasil, se destaca no cultivo, com acréscimos anuais de 5 a 8% desde 2006 (IBRAFLOR, 2019). As flores podem ser utilizadas na alimentação na forma de saladas, sopas, entradas, sobremesas e bebidas. Além de conferir beleza estética, apresentam sabor e fragrância típicos que agregam valor ao prato servido (Rop et al., 2012; Benvenuti et al., 2016). Atualmente, o mercado demanda por produtos que garantem a segurança alimentar e, nesse sentido, disponibilizar produtos inovadores, com propriedades nutracêuticas e benefícios à saúde, é um dos desafios da produção de flores comestíveis (Pires et al., 2019)

Dentre as plantas comestíveis utilizadas no Brasil, a capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) (Tropaeolaceae), popularmente conhecida como capuchinha, chaguinha e nastúrcio, é, também, ornamental e medicinal, com flores vistosas, simples ou dobradas, nas tonalidades vermelha,

alaranjada e amarela, podendo alcançar 2 a 3 metros de comprimento e 30 a 40 cm de altura (Melo et al., 2018). Compostos bioativos têm sido abundantemente encontrados nesta planta, como carotenóides (zeaxantina, luteína e caroteno), antocianinas (delfinidina, cianidina, delfinidina e derivados de pelargonidina), flavonóides (quercetina e glicosídeos de caempferol), compostos de enxofre (glucotropaeolina), ácidos fenólicos, pepino-bitacinos e vitamina C (Bazytko et al., 2013; Bawazeer et al., 2021). Suas folhas e flores têm sido usadas como tratamento de doenças como hipertensão, inflamação e infecção do trato urinário, distúrbios na vesícula biliar, doenças crônicas como doença pulmonar obstrutiva, infecções de rins e bexiga, além de possuir potencial anticarcinogênico (Valsalam et al., 2019). Flores e folhas de *T. majus* são consideradas uma excelente fonte dietética de luteína, o que reduz o risco de degeneração macular e, também, possui atividades diuréticas, anti-hipertensivas e antidiabéticos (Jurca et al., 2018).

Plantas encontram-se naturalmente expostas a uma ampla gama de condições de estresse ambiental, incluindo temperaturas extremas, seca, salinidade, inundação, toxicidade de poluentes e vários estresses oxidativos, os quais podem afetar negativamente o crescimento e impedir que as plantas atinjam seu pleno potencial de crescimento (Forni et al., 2017).

As poliaminas (PAs) são polications alifáticos, de baixo peso molecular, presentes em bactérias, animais e plantas (Liu et al., 2015). As PAs ocorrem em formas livres ou conjugadas, em associação com moléculas pequenas, como os ácidos fenólicos, ou ligadas a macromoléculas. As concentrações celulares de PAs, geralmente, variam dependendo do crescimento ou do estágio de desenvolvimento da planta, do estado nutricional, bem como em resposta a condições ambientais (Pál et al., 2021). As PAs estão envolvidas em muitos processos de desenvolvimento de plantas, como iniciação e desenvolvimento floral, divisão celular, embriogênese, crescimento de raízes, desenvolvimento de órgãos reprodutivos, tuberização, desenvolvimento e amadurecimento de frutos, senescência foliar e respostas a estresse bióticos e abióticos (Sarwat et al., 2013).

As principais PAs em plantas são a putrescina (Put), a espermidina (Spd) e a espermina (Spm), e atuam como importante contra o estresse abiótico (Handa et al., 2018). Alguns dos papéis das PAs na tolerância e/ou melhoria do estresse nas plantas são: (i) manter o equilíbrio do potencial hídrico, juntamente com prolina, glicinabetaína e ácido gama-aminobutírico (GABA); (ii) interagir com macromoléculas como DNA, RNA, complexos de transcrição e tradução e membranas celulares para estabilizá-las; (iii) eliminar diretamente espécies reativas de oxigênio e promover a produção de enzimas e metabólitos antioxidantes; (iv) atuar como moléculas de sinalização na via de resposta ao estresse regulada por ABA e através da produção

de H₂O₂; (v) regular vários canais iônicos; e; (vi) participar na morte celular programada (Minocha et al., 2014).

1.1. Referências

- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for cadmium**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2012.
- Bawazeer, S., Rauf, A., Shah, S. U. A., Shawky, A. M., Al-Awthan, Y. S., Bahattab, O. S., Uddin, G. , Sabir, J., El-Esawi, M. A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Tropaeolum majus*: Phytochemical screening and antibacterial studies. **Green Processing and Synthesis**, v. 10, n. 1, p. 85-94, 2021.
- Bazyłko, A., Granica, S., Filipek, A., Piwowarski, J., Stefańska, J., Osińska, E., Kiss, A. K. Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 88-94, 2013.
- Conrad, S. R., White, S. A., Santos, I. R., Sanders, C. J. Assessing pesticide, trace metal, and arsenic contamination in soils and dam sediments in a rapidly expanding horticultural area in Australia. **Environmental Geochemistry and Health**, p. 1-23, 2021.
- Forni, C., Duca, D., Glick, B. R. Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 410, p. 335–356. 2017
- Gupta, N., Yadav, K. K., Kumar, V., Krishnan, S., Kumar, S., Nejad, Z. D, Khane M.A.M., Alam, J. Evaluating heavy metals contamination in soil and vegetables in the region of North India: Levels, transfer and potential human health risk analysis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 103563, 2021.
- Handa, A. K., Fatima, T., Mattoo, A. K. Polyamines: bio-molecules with diverse functions in plant and human health and disease. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 10, 2018.
- IBRAFLOR. Instituto Brasileiro de Floricultura. 2019. **O mercado de flores no Brasil**. Disponível em: Disponível em: <https://www.ibraflor.com.br/numeros-setor>. Acessado em: 24 mar 2021.
- Jurca, T., Baldea, I., Filip, G. A., Olteanu, D., Clichici, S., Pallag, A., Pallag, A., Vicas, L., Marian, E., Micle, O., Muresan, M. The effect of *Tropaeolum majus* L. on bacterial infections and in vitro efficacy on apoptosis and DNA lesions in hyperosmotic stress, **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 391–401, 2018.

- Liu, J. H., Wang, W., Wu, H., Gong, X., Moriguchi, T. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 827, 2015.
- Melo, A. C., Costa, S. C. A., Castro, A. F., Souza, A. N. V., Sato, S. W., Lívero, F. A. R., Lourenço, E. L. B., Baretta, I. P., Lovato, E. C. W. Hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* promotes anxiolytic effects on rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 5, p. 589–593, 2018.
- Minocha, R., Majumdar, R., Minocha, S. C. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 175, 2014.
- Pál, M., Szalai, G., Gondor, O. K., & Janda, T. Unfinished story of polyamines: Role of conjugation, transport and light-related regulation in the polyamine metabolism in plants. **Plant Science**, v. 308, p. 110923, 2021.
- Park, H. J., Kim, S. U., Jung, K. Y., Lee, S., Choi, Y. D., Owens, V. N., Kumar, S., Yun, S. W., Hong, C. O. Cadmium phytoavailability from 1976 through 2016: Changes in soil amended with phosphate fertilizer and compost. **Science of the Total Environment**, v. 762, p. 143132, 2021.
- Pires, T. C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. Edible flowers: Emerging components in the diet. **Trends in Food Science & Technology**, v. 93, p. 244-258, 2019.
- Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Neugebauerova, J., Vabkova, J. Edible flowers-a new promising source of mineral elements in human nutrition. **Molecules**, v.17, n. 6, p. 6672–6683, 2012.
- Sarwat, M., Naqvi, A. R., Ahmad, P., Ashraf, M., Akram, N. A. Phytohormones and microRNAs as sensors and regulators of leaf senescence: assigning macro roles to small molecules. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1153–1171, 2013.
- Schaefer, H. R., Dennis, S., Fitzpatrick, S. Cadmium: Mitigation strategies to reduce dietary exposure. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 2, p. 260-267, 2020.
- Spormann, S., Soares, C., Teixeira, J., & Fidalgo, F. Polyamines as key regulatory players in plants under metal stress—a way for an enhanced tolerance. **Annals of Applied Biology**, v. 178, p. 209-226, 2020.
- Valsalam, S., Agastian, P., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ghilan, A. K. M., Kaviyarasu, K., Ravindran, B., Chang, S. W., Arokiyaraj, S. Rapid biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from the leaf extract of *Tropaeolum majus* L. and its enhanced in-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and anticancer properties. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 191, p. 65–74, 2019.

Wan, A. C., Tai, B. C., Du, C. Food security and nutrition-a systematic approach. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 738-745, 2021.

Artigo I**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Tropaeolum majus* AO ESTRESSE POR CÁDMIO**

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Tropaeolum majus* AO ESTRESSE POR CÁDMIO

Resumo

A capuchinha (*Tropaeolum majus*) é uma planta com flores comestíveis, sendo cada vez mais utilizada na alimentação humana. Para o seu cultivo, assim como para as demais culturas, é necessário o uso de adubação, calagem e irrigação, além da tendência atual da reutilização de água e compostagem, os quais podem inserir diversos contaminantes ao solo, incluindo o cádmio (Cd). Mesmo em baixas concentrações no solo, o Cd pode ser absorvido pelas plantas e se acumular na cadeia trófica, constituindo um risco à saúde humana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo do Cd em planta de capuchinha e os efeitos na fotossíntese e metabolismo enzimático. O experimento foi realizado em estufa e distribuído em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (0, 5, 10, 20, 40 e 80 μM de Cd) e cinco repetições. As plantas de capuchinhas acumularam em suas estruturas quantidades maiores de Cd à medida que aumentou-se as doses, além disso, as plantas de capuchinhas tiveram seu sistema antioxidante alterando as folhas em doses superiores a 47 μM , trocas gasosas nas maiores doses de Cd e fluorescência de clorofila afetados pelo Cd em doses superiores a 48 μM . O Cd afeta negativamente as plantas de capuchinhas, sendo uma alerta para a produção desta planta em áreas com essas concentrações deste metal.

Palavras-chave: capuchinha, metal pesado, fotossíntese, sistema antioxidante

Abstract

Nasturtium (*Tropaeolum majus*) is a plant with edible flowers, being increasingly used in human food. For its cultivation, as for other crops, it is necessary to use fertilization, liming and irrigation, in addition to the current trend of water reuse and composting, which can introduce various contaminants into the soil, including cadmium (Cd). Even at low concentrations in the soil, Cd can be absorbed by plants and accumulate in the food chain, posing a risk to human health. The objective of this work was to evaluate the accumulation of Cd in nasturtium plant and the effects on photosynthesis and enzymatic metabolism. The experiment was carried out in an oven and distributed in a completely randomized design, with five treatments (0, 5, 10, 20, 40 and 80 μM of Cd) and five replications. Nasturtium plants accumulated higher amounts of Cd in their structures as doses increased, in addition, nasturtium plants had their antioxidant system changing leaves at doses higher than 47 μM , gas exchange at higher doses of Cd and chlorophyll fluorescence affected by Cd at doses greater than 48 μM . Cd negatively affects nasturtium plants, being an alert for the production of this plant in areas with these concentrations of this metal.

Keywords: nasturtium, heavy metal, photosynthesis, antioxidant system

2.3. Introdução

O uso de flores na alimentação tem se tornado mais frequente a cada dia, na forma de saladas, sopas, entradas, sobremesas e bebidas. Além de conferir beleza estética, apresentam sabor e fragrância típicos que agregam valor ao prato servido (Rop et al., 2012; Benvenuti et al., 2016). A floricultura tem se expandido no agronegócio, com excelentes perspectivas ao longo dos anos, com acréscimos anuais de 5 a 8% desde 2006 (IBRAFLOR, 2019; AGROSTAT, 2022).

A capuchinha é uma flor comestível e é, também, considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC), cujas características nutricionais, como a presença de ácidos graxos, glucosinolatos, flavonoides, triterpenos e tetracíclicos, a tornam uma boa opção, tanto para fins de consumo quanto comerciais (Xu et al., 2021; Milião et al., 2022). Diversos procedimentos são necessários para a produção de alimentos, como adubação, calagem, irrigação, além da tendência atual da reutilização de água e compostagem, e tudo isso podem estar inserindo contaminantes ao solo, incluindo o cádmio (Cd) (Park et al., 2021). A contaminação dos alimentos por Cd é consequência da contaminação generalizada, mesmo em baixas concentrações no solo, o qual pode ser proveniente de diversas fontes antropogênicas como adubação, mineração, produtos eletrônicos, galvanoplastia (Clemens et al., 2013).

A absorção de Cd varia entre as espécies e variedades de plantas e, dentro da planta, também há variação na transferência das raízes para as outras partes, como folhas e flores, sendo que o acúmulo nas partes comestíveis representa grandes riscos em relação a saúde (Qin et al., 2015). Em relação à saúde humana, os danos tóxicos podem ocorrer nos rins, nos sistemas respiratório, ósseo e reprodutivo, fazendo com que o Cd seja considerado de elevado risco na classificação da Agência para Registro de Doenças e Substâncias Tóxicas para metais (Latif et al., 2020).

Devido às variações ambientais em experimentos em condições de estufa, campo ou hidropônicas, é difícil fazer afirmações gerais sobre o que constitui um nível tóxico de Cd às plantas (Van der Ent et al., 2013). Um fator chave é o tempo de exposição ao metal tóxico, que varia, entre os diferentes estudos, de horas a meses. Existem algumas evidências sobre a fisiologia, respostas e competição molecular entre esses elementos tóxicos, desde a captação até à destoxificação (Farooq et al., 2022). Portanto, o acúmulo e as respostas fisiológicas de *T. majus* em presença de diferentes concentrações de Cd precisam ser explorados no contexto da

produção em massa de alimentos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo do Cd na planta de capuchinha e os efeitos na fotossíntese e metabolismo enzimático.

2.4. Material e Métodos

2.4.1. Delineamento experimental, material vegetal e tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (0, 5, 10, 20, 40 e 80 μM de cádmio, na forma de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), e cinco repetições, assim como feito com *Helianthus annuus* (Gadallah, 1995). Sementes de *T. majus* (variedade Semi-dobrada sortida, Feltrin[®]) foram plantadas em bandeja de polietileno, com areia lavada, e 15 dias após semeadura (DAS), as plântulas com duas folhas expandidas, hastes de mesma cor e comprimento superior a 15 cm, foram selecionadas e transplantadas (uma planta por vaso) para vasos de polipropileno (9,8 x 13 x 10,5 cm) contendo substrato comercial Topstrato[®]). As plantas foram fertirrigadas uma vez por semana com 100 mL de solução de 2 g L^{-1} de adubo NPK 20-20-20 + micronutrientes (Peters[®] Professional), até o início da aplicação dos tratamentos. A irrigação foi realizada diariamente, mantendo o substrato a 80% da capacidade retenção do vaso, de acordo com metodologia proposta por Girardi et al. (2016). O Cd foi aplicado diariamente do 55^o ao 70^o dias após o plantio (DAP), sendo aplicados 100 mL diretamente no substrato, com efeito acumulativo em cada vaso, com auxílio de uma proveta. Ao final do período de exposição, as plantas foram coletadas, lavadas para remoção de resíduos sólidos e separadas em raiz, caule/pecíolo, folhas e flores.

2.4.2. Variáveis analisadas

2.4.2.1. Determinação da concentração de Cd

Raízes, caule/pecíolo, folhas e flores de *T. majus* foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 70 °C, até atingir massa seca constante. O material vegetal foi mineralizado em mistura de ácido nítrico e perclórico (3:1, v/v), a 200 °C, e a concentração de Cd foi determinada por espectrometria de absorção atômica (Shimadzu AA-6701F) (Marin et al., 1993).

2.4.2.2. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada com base no teor de malondialdeído (MDA), adotando o método de Hodges et al. (1999). Folhas e raízes (200 mg) foram maceradas em 2,0 mL de etanol:água 80:20 (v/v) e centrifugado a 10.000 $\times g$ por 10 min a 4 °C. Uma alíquota de

0,5 mL de sobrenadante foi adicionada a 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). As amostras foram, então, misturadas vigorosamente, aquecidas a 95 °C em banho-maria por 30 min, resfriadas e centrifugadas a 3.000xg por 10 min. A absorbância foi lida em 440, 532 e 600 nm. Os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ de massa fresca.

2.4.2.3. Enzimas do sistema antioxidante

Para determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase (POX) 0,3 g de folhas e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas em 2 mL de um meio de extração constituído de tampão de fosfato 0,1 M (pH 6,8), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos, a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático na determinação da atividade dessas enzimas.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de tetrazólio nitroazul em 50% e os resultados foram expressos em U mg proteína⁻¹ min⁻¹. A atividade enzimática foi estimada a partir de medidas de degradação de H₂O₂ a 240 nm (Havir e Mchale, 1987). O ensaio para determinar a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi realizada em meio de reação contendo tampão fosfato 50 mM (pH 6,0), ácido ascórbico 1 mM e H₂O₂ 2 mM e a taxa de oxidação do ascorbato será monitorada a 290 nm (Nakano e Asada, 1981) e os resultados foram expressos em μmol AsA mg⁻¹ proteína min⁻¹.

A atividade da peroxidase (POX) foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação contendo 25 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,8, 20 mM de pirogalol e 20 mM de H₂O₂ (Nakano e Asada, 1981). A quantificação foi determinada pelo aumento da absorbância em 420 nm ($E = 2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em μmoles purpurogalina min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

2.4.2.4. Trocas gasosas, índice SPAD e fluorescência de clorofila a

As determinações das trocas gasosas, fluorescência e índices de clorofilas foram realizadas aos 71 dias após o plantio (DAP). Um analisador de gás infravermelho (IRGA – modelo LCPro, ADC BioScientific Ltd.) foi usado para a avaliação das trocas gasosas, sendo as medições aferidas entre as 8 e 10 h da manhã. Foram avaliadas a taxa de assimilação líquida

de CO_2 ($A = \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática ($g_s = \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração de carbono interno ($C_i = \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$) e transpiração ($E = \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

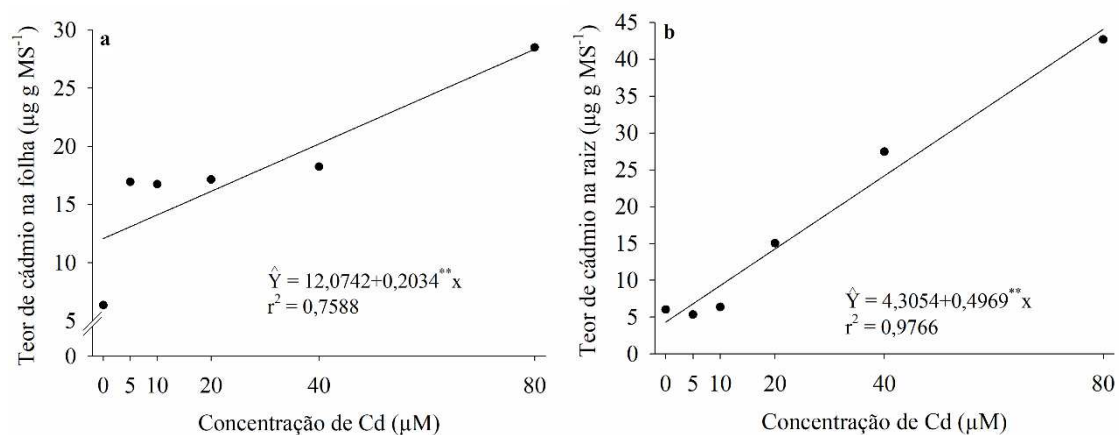
Os parâmetros da fotossíntese baseados na fluorescência da clorofila foram medidos usando o MultispeQ v2.0, utilizando o protocolo Photosynthesis Rides, com auxílio do software PhotosynQ (Kuhlgert et al., 2016), em folhas intactas totalmente expandidas, em condições ambientais, entre 8:00 e 10:30 h. O rendimento quântico do PSII (F_v/F_m), eficiência real do PSII (Φ_{II}), rendimento induzido por processos de regulação negativa (Φ_{NPQ}), rendimento para outras perdas de energia (Φ_{NO}), diminuição da dissipação não fotoquímica de energia luminosa absorvida (NPQt) e índice relativo de clorofila (SPAD) foram avaliados.

2.4.3. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos (teste F) foi realizada uma análise de regressão polinomial. O programa estatístico R foi utilizado (R Core Team, 2021) para análises estatísticas.

2.5. Resultados

O incremento de Cd nas raízes foi de 11,54%. A maior concentração de Cd ($14,75 \mu\text{g}$) nas flores foi na concentração de $65 \mu\text{M}$ de Cd. O incremento de Cd nas folhas foi de 1,68% (Figura 1).



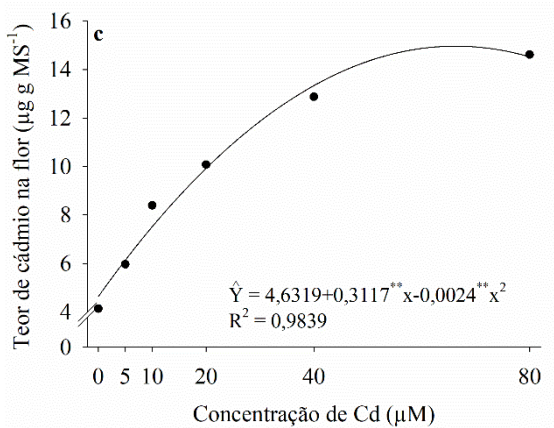
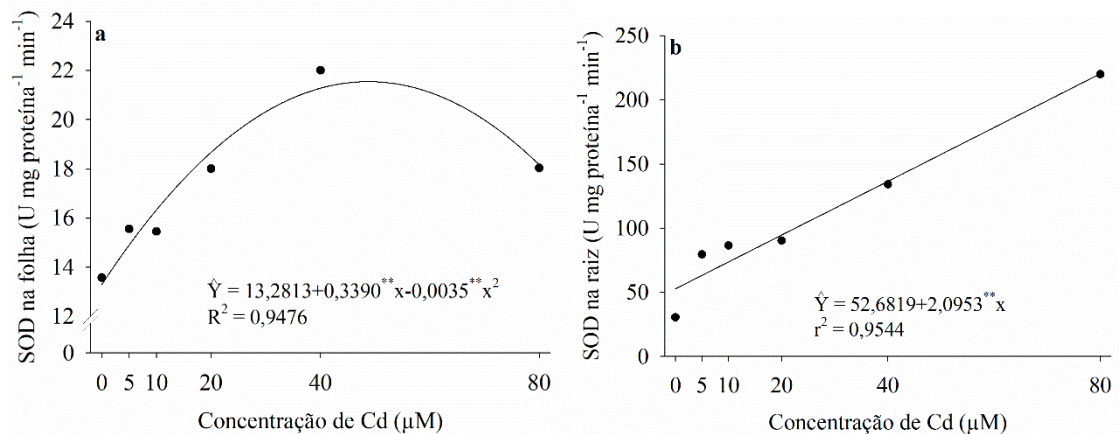


Figura 1. Teor de cádmio na folha (a), teor de cádmio na raiz (b) e teor de cádmio na flor (c) de *Tropaeolum majus* irrigadas com cádmio.

A maior atividade de SOD (21,49 U mg proteína⁻¹ min⁻¹) nas folhas de *T. majus* foi observada na concentração estimada de 48,43 µM de Cd, diminuindo nas concentrações mais elevadas. O aumento das concentrações de Cd resultou no aumento da atividade da SOD nas raízes, com acréscimo de 4%. O aumento nas doses de Cd não apresentou variação na atividade de APX nas folhas. Houve um significativo decréscimo da atividade de APX na raiz, com o aumento da concentração de Cd. A maior POX (3,12 µmol H₂O₂ mg min⁻¹ proteína⁻¹) nas folhas foi observado na concentração 45,25 µM de Cd. A menor atividade da POX (40,99 µmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹) nas raízes foi observada na concentração 5,23 µM de Cd. A maior peroxidação de lipídeos (71,62 nmol ml⁻¹) nas folhas foi observada na concentração de 47,29 µM de Cd. A menor concentração de TBARs (4,53 nmol ml⁻¹) nas raízes foi observada na concentração de 56,65 µM de Cd (Figura 2).



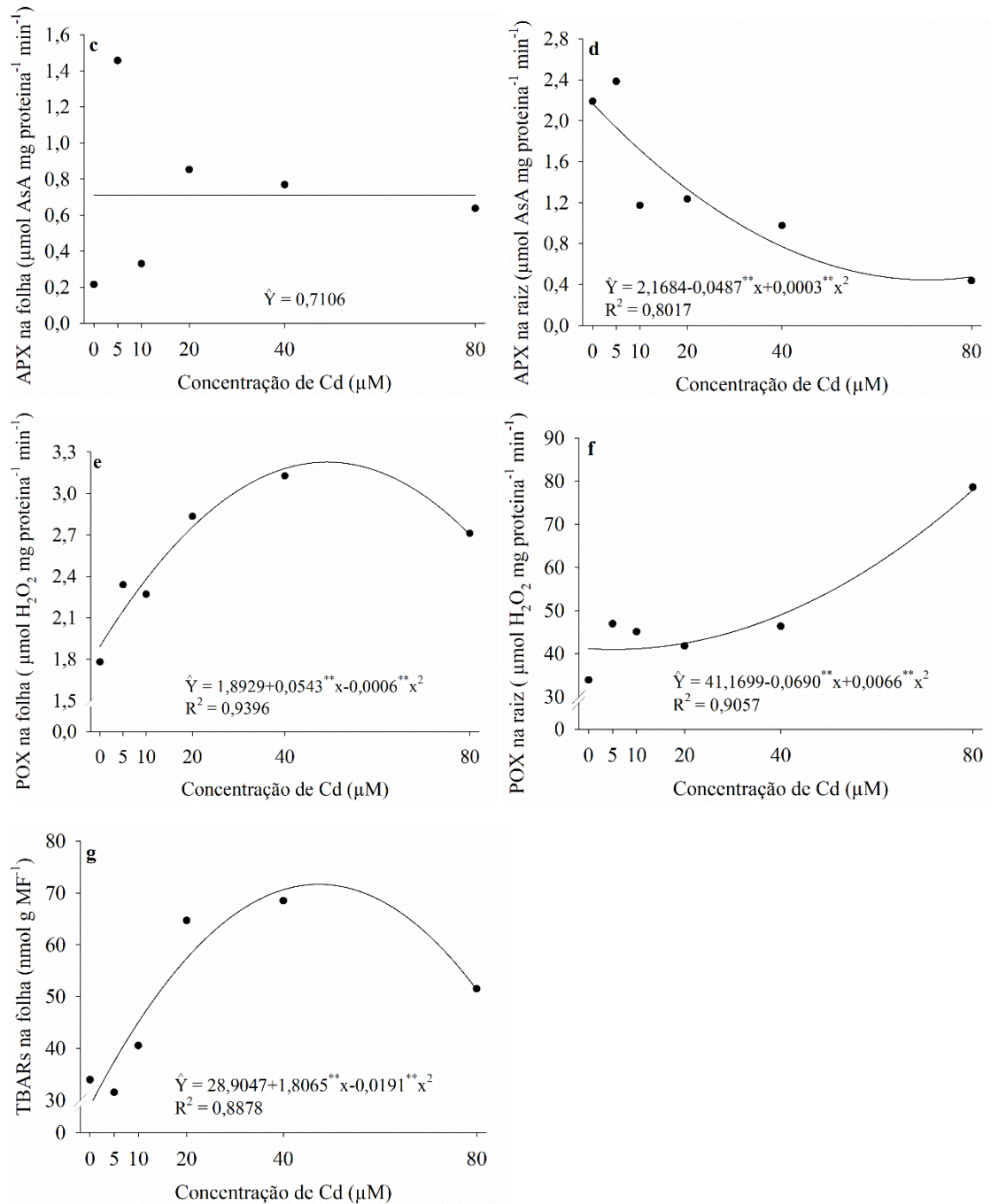


Figura 2. Superóxido dismutase (SOD – a e b), ascorbato peroxidase (APX – c e d), peroxidase (POX – e e f) e peroxidação de lipídeos (TBARs – g e h) em folhas de *Tropaeolum majus* irrigadas com cádmio.

O maior rendimento quântico do PSII (Fv/Fm – 0,75) foi observado na concentração de 57,14 μM de Cd, diminuindo nas doses mais elevadas. A maior eficiência atual do PSII (ΦII – 0,67) foi observado na concentração de 58,97 μM de Cd, diminuindo nas concentrações mais elevadas (Figura 4). O menor rendimento quântico da extinção não fotoquímica relacionada à fotoproteção (ΦNPQ – 0,14) foi observado na concentração de 58,17 μM de Cd, aumentando

nas doses mais elevadas. O maior rendimento por outras perdas ($\Phi_{NO} = 0,22$) foi observado na concentração de 58,14 μM de Cd, diminuindo nas concentrações mais elevadas. O aumento das concentrações de Cd diminuiu a dissipação fotoquímica por absorbância de energia luminosa (NPQt), com decréscimo de 0,8%. O aumento das concentrações de Cd gerou acréscimos no índice relativo de clorofila (SPAD) de 0,19%.

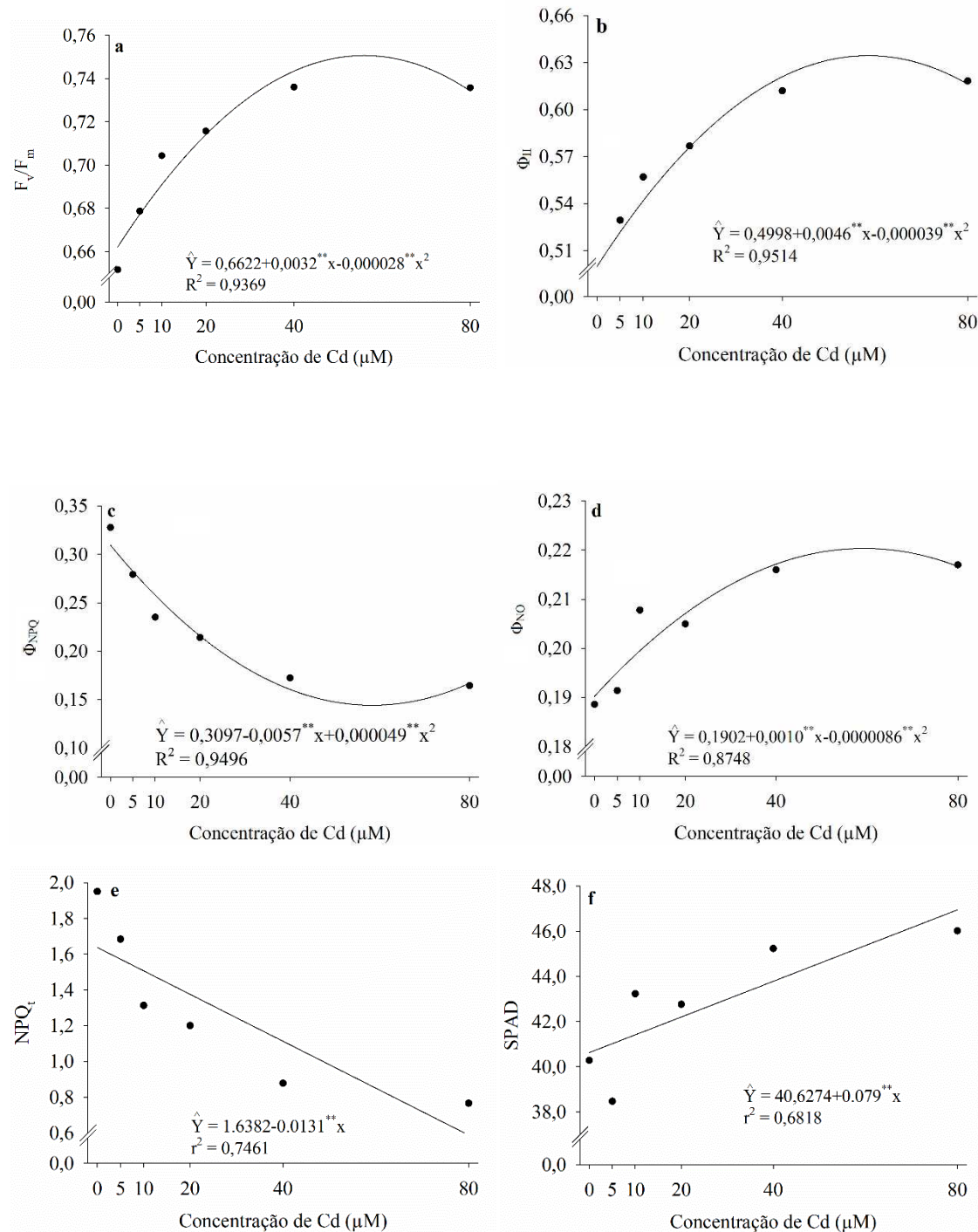


Figura 4. Rendimento quântico do PSII (F_v/F_m – a), eficiência real do PSII (Φ_{II} – b), rendimento induzido por processos de regulação negativa (Φ_{NPQ} – c), rendimento para outras perdas de

energia ($\Phi_{NO} - d$), diminuição da dissipação não fotoquímica de energia luminosa absorvida (NPQt - e) e índice relativo de clorofila (SPAD - f) de *Tropaeolum majus* irrigadas com cádmio.

O aumento das concentrações de Cd diminuiu a condutância estomática (gs), com decréscimo de 0,58%. A menor fotossíntese líquida (A - 6,5 mol CO₂ m⁻² s⁻¹) foi observada na maior concentração de Cd (80 μM). A maior taxa de transpiração (E - 2,19 mmol H₂O m⁻² s⁻¹) foi observada na concentração de 6,5 μM de Cd, diminuindo nas concentrações mais elevadas. A menor concentração de carbono interno (Ci - 287,8 μmol CO₂ mol ar⁻¹) foi observada na em 71,76 μM de Cd (Figura 5).

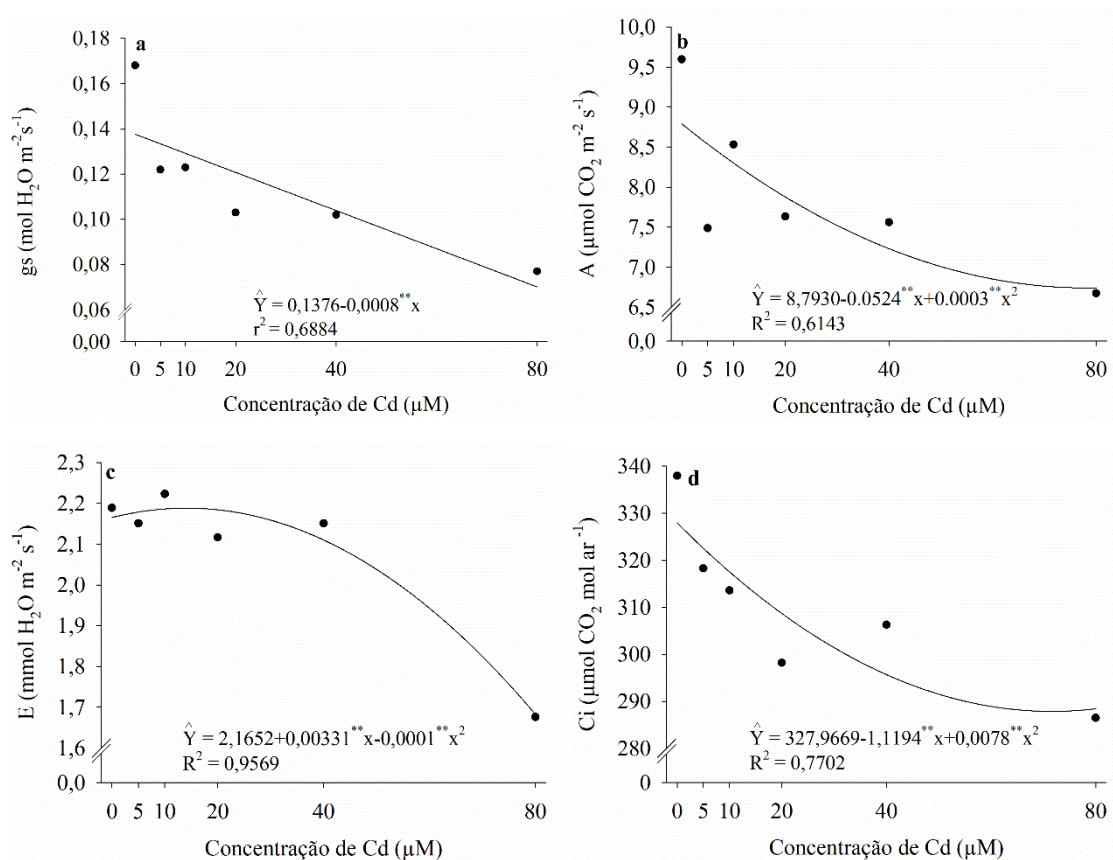


Figura 5. Condutância estomática (gs – a), fotossíntese líquida (A – b), transpiração (E – c), concentração de carbono interno (Ci – d) de *Tropaeolum majus* irrigadas com cádmio.

2.6. Discussão

Os maiores teores de Cd foram observados nas raízes (Figura 1) e isso pode estar relacionado ao aumento da produção de antioxidantes, precipitação na parede celular, compartimentação vacuolar e quelação com compostos tiolados (Zhou et al., 2015). Resultados semelhantes onde o aumento da concentração de Cd aumentou, também, a translocação foram observados em *Solanum melongena* e *Solanum torvum* (Mori et al., 2009).

A aplicação de Cd aumentou a atividade das enzimas SOD e APX nas folhas e raízes de capuchinha. Contudo, observou-se que esse comportamento foi mais expressivo nas raízes, visto que mesmo na maior concentração de Cd (80 μM) as atividades dessas enzimas nas raízes continuaram a aumentar, o que pode estar relacionado à maior acumulação de Cd nas raízes (Figura 1). Isso pode ser uma estratégia dessa planta para diminuir os danos causados pelo Cd.

Em condições de estresse as plantas tendem a aumentar o sistema antioxidante enzimático para diminuir os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse comportamento foi observado na diminuição da peroxidação lipídica nas raízes (Figura 1h), o que foi relacionado ao aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD e APX). A regulação das EROs através das enzimas antioxidantes foi uma forma que as plantas de capuchinha tiveram para aclimatar-se ao estresse causado pelo aumento das concentrações de Cd. Comportamento similar foi observado no sistema antioxidante de *Triticum aestivum* (Khan et al., 2007), *Oryza sativa* (Chien et al., 2001), *Sorghum bicolor* (Hassan et al., 2020), *Conyza canadenses* (Zhou et al., 2015) e *Erigeron annuus* (Zhang et al., 2021).

A translocação e acúmulo de Cd nas folhas afetou o sistema antioxidante e causou danos ao aparelho fotossintético (Figura 4). Concentrações acima de 48 μM de Cd causaram redução nas atividades das enzimas SOD e APX e, conseqüentemente, não conseguiu impedir os danos causados por esse metal no aparelho fotossintético, o que pode ter sido induzido pelo aumento das EROs. Concentrações de Cd, acima de 57,14 μM , diminuí a razão F_v/F_m que é um parâmetro indicador de danos foto-oxidativos no fotossistema II (Sharma e Dietz, 2009).

As plantas de capuchinha utilizaram a dissipação não fotoquímica de energia luminosa absorvida (NPQ) e o rendimento induzido por processos de regulação negativa (Φ_{NPQ}) como uma válvula de escape de excesso de energia no aparato fotossintético (Moustakas et al., 2019). Um dos efeitos do Cd é a inativação de parte dos centros de reação do PSII, que são convertidos nos chamados “sumidouros de energia”, transformando, assim, a energia de excitação das clorofilas do complexo antena em energia térmica (Paunov et al., 2018). O aumento dos valores de Φ_{NPQ} após a exposição ao Cd, em relação aos valores de controle, resultou em valores de Φ_{NO} mais elevados, o que pode ser explicado pelo mecanismo fotoprotetor de extinção não fotoquímica, que permite o sequestro de EROs abaixo dos níveis críticos (Galiova et al., 2019). Assim, os danos do aparato fotossintético aconteceram, também, no índice relativo de clorofila (SPAD), onde o aumento dos níveis de Cd aumentou a sua síntese (Sun et al., 2019).

O aumento dos teores de Cd nas folhas, seguidos pela diminuição da atividade das enzimas SOD e APX e desregulação no aparato fotossintético, causou diminuição nas trocas gasosas devido ao excesso desse metal nas folhas. A diminuição das trocas gasosas causada

pelo aumento de Cd está relacionada aos efeitos deste metal na diminuição da abertura estomática que, conseqüentemente, diminui a absorção de CO₂ e liberação de H₂O (Farid et al., 2013). Além disso, a diminuição da transpiração pode ter contribuído para a redução da absorção de Cd pelas raízes (Pietrini et al., 2015). Alterações similares nas trocas gasosas, causadas pelo Cd, foram observadas em *Oryza sativa* (Liu et al., 2020), *Solanum melongena* e *Solanum torvum* (Qin et al. 2015).

2.7. Conclusão

As plantas de capuchinhas acumularam em suas estruturas quantidades maiores de Cd à medida que aumentou-se as doses, tendendo a ter alta bioconcentração do metal e diminuição da translocação. Além disso, as plantas de capuchinhas tiveram a e fluorescência de clorofila e seu sistema antioxidante alterando as folhas em doses superiores a 47 µM, trocas gasosas nas maiores doses de Cd. O Cd afeta negativamente as plantas de capuchinhas, sendo uma alerta para a produção desta planta em áreas com essas concentrações do metal.

2.8. Referências

- AGROSTAT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Indicadores Gerais Agrostat**. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. Acesso em: 22 fev 2022.
- Bao, T., Sun, T., Zang, P., Niu, Z. Iron-deficiency induces cadmium uptake and accumulation in *Solanum nigrum* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 338-342, 2009.
- Benvenuti, S., Bortolotti, E., & Maggini, R. Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers. **Scientia Horticulturae**, v. 199, p. 170-177, 2016.
- Chien, H. F., Wang, J. W., Lin, C. C., & Kao, C. H. Cadmium toxicity of rice leaves is mediated through lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 3, p. 205-213, 2001.
- Clemens, S., Aarts, M. G., Thomine, S., & Verbruggen, N. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 2, p. 92-99, 2013.
- Farid, M., Shakoob, M. B., Ehsan, S., Ali, S., Zubair, M., & Hanif, M. S. Morphological, physiological and biochemical responses of different plant species to Cd stress. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, v. 3, n. 53.60, 2013.

- Farooq, M. U., Ishaq, I., Barutcular, C., Skalicky, M., Maqbool, R., Rastogi, A. & Zhu, J. Mitigation effects of selenium on accumulation of cadmium and morpho-physiological properties in rice varieties. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 170, p. 1-13, 2022.
- Gadallah, M. A. A. Effects of cadmium and kinetin on chlorophyll content, saccharides and dry matter accumulation in sunflower plants. *Biologia Plantarum*, v. 37, n. 2, p. 233, 1995.
- Galiova, M.V., Szakova, J., Prokes, L., Cadkova, Z., Coufalik, P., Kanicky, V., Otruba, V., & Tlustos, P. Variability of trace element distribution in *Noccaea* spp., *Arabidopsis* spp., and *Thlaspi arvense* leaves: the role of plant species and element accumulation ability. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 3, p. 1-14, 2019.
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- Girardi, L.B., Peiter, M.X., Bellé, R.A., Robaina, A.D., Torres, R.R., Kirchner, J.H., & Ben, L.H.B. (2016). Evapotranspiration and crop coefficients of potted *Alstroemeria* × *Hybrida* grown in greenhouse. **Irriga**, v. 21, n. 4, p. 817-829, 2016.
- Hassan, M.J., Ali Raza, M., Ur Rehman, S., Ansar, M., Gitari, H., Khan, I. & Li, Z. Wajid, M., Ahmed, M., Shah, G.A., Peng, A. & Li, Z. Effect of cadmium toxicity on growth, oxidative damage, antioxidant defense system and cadmium accumulation in two sorghum cultivars. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1575, 2020.
- Havir, E.A., Mchale, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, n. 4, p. 604-611, 1999.
- Khan, N. A., Samiullah, Singh, S., & Nazar, R. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 193, n. 6, p. 435-444, 2007.
- Kuhlgert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M. I., Roth, M. G., Bi, K., TerAvest, D., Weebadde P. & Kramer, D. M. MultispeQ Beta: a tool for large-scale plant phenotyping connected to the open PhotosynQ network. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 10, p. 160592, 2016.

- Latif, J., Akhtar, J., Ahmad, I., Mahmood-ur-Rehman, M., Shah, G. M., Zaman, Q., Rizwan, M. Unraveling the effects of cadmium on growth, physiology and associated health risks of leafy vegetables. **Brazilian Journal of Botany**, v. 43, n. 4, p. 799-811, 2020.
- Li, S., Yang, W., Yang, T., Chen, Y., & Ni, W. Effects of cadmium stress on leaf chlorophyll fluorescence and photosynthesis of *Elsholtzia argyi* - a cadmium accumulating plant. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, n. 1, p. 85-92, 2015.
- Liu, H., Yang, L., Li, N., Zhou, C., Feng, H., Yang, J., & Han, X. Cadmium toxicity reduction in rice (*Oryza sativa* L.) through iron addition during primary reaction of photosynthesis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, p. 110746, 2020.
- Liu, W., Shang, S., Feng, X., Zhang, G., & Wu, F. Modulation of exogenous selenium in cadmium-induced changes in antioxidative metabolism, cadmium uptake, and photosynthetic performance in the 2 tobacco genotypes differing in cadmium tolerance. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 92-99, 2015.
- Marin, A. R., Pezeshki, S. R., Masschelen, P. H., & Choi, H. S. Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 16, n. 5, p. 865-880, 1993.
- Milião, G. L., de Oliveira, A. P. H., de Souza Soares, L., Arruda, T. R., Vieira, É. N. R., & Junior, B. R. D. C. L. Unconventional Food Plants: nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, p. 100124, 2022.
- Mori, S., Uruguchi, S., Ishikawa, S., & Arao, T. Xylem loading process is a critical factor in determining Cd accumulation in the shoots of *Solanum melongena* and *Solanum torvum*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 1, p. 127-132, 2009.
- Moustakas, M., Hanć, A., Dobrikova, A., Sperdoui, I., Adamakis, I. D. S., & Apostolova, E. Spatial heterogeneity of cadmium effects on *Salvia sclarea* leaves revealed by chlorophyll fluorescence imaging analysis and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Materials**, v. 12, n. 18, p. 2953, 2019.
- Nakano, Y., & Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- Park, H. J., Kim, S. U., Jung, K. Y., Lee, S., Choi, Y. D., Owens, V. N., Kumar, S., Yun, S. W., Hong, C. O. Cadmium phytoavailability from 1976 through 2016: Changes in soil amended with phosphate fertilizer and compost. **Science of the Total Environment**, v. 762, p. 143132, 2021.

- Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J., & Goltsev, V. Effects of different metals on photosynthesis: cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 787, 2018.
- Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P. R., & Moreira, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.
- Pietrini, F., Iori, V., Bianconi, D., Mughini, G., Massacci, A., & Zacchini, M. Assessment of physiological and biochemical responses, metal tolerance and accumulation in two eucalypt hybrid clones for phytoremediation of cadmium-contaminated waters. **Journal of Environmental Management**, v. 162, p. 221-231, 2015.
- Qin, Q., Li, X., Zhuang, J., Weng, L., Liu, W., & Tai, P. Long-distance transport of cadmium from roots to leaves of *Solanum melongena*. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 10, p. 2224-2232, 2015.
- R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Viena, Austria, 2021.
- Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Neugebauerova, J., & Vabkova, J. Edible flowers-a new promising source of mineral elements in human nutrition. **Molecules**, v.17, n. 6, p. 6672–6683, 2012.
- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 43-50, 2009.
- Sun, J., Wu, M., Hang, Y., Lu, B., Wu, X., & Chen, Q. Estimating cadmium content in lettuce leaves based on deep brief network and hyperspectral imaging technology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 8, p. e13293, 2019.
- Van der Ent, A., Baker, A. J., Reeves, R. D., Pollard, A. J., & Schat, H. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. **Plant and Soil**, v. 362, n. 1, p. 319-334, 2013.
- Xu, W., Lu, N., Kikuchi, M., & Takagaki, M. Effects of node position and electric conductivity of nutrient solution on adventitious rooting of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) Cuttings. **Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 363, 2021.
- Zhang, H., Heal, K., Zhu, X., Tigabu, M., Xue, Y., & Zhou, C. Tolerance and detoxification mechanisms to cadmium stress by hyperaccumulator *Erigeron annuus* include molecule synthesis in root exudate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 219, p. 112359, 2021.

Zhou, C., Zhang, K., Lin, J., Li, Y., Chen, N., Zou, X., Hou, X. & Ma, X. Physiological responses and tolerance mechanisms to cadmium in *Conyza canadensis*. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, n. 3, p. 280-289, 2015.

Artigo II**POLIAMINAS REDUZEM OS DANOS DO ESTRESSE POR CÁDMIO EM
*Tropaeolum majus***

POLIAMINAS REDUZEM OS DANOS DO ESTRESSE POR CÁDMIO EM

Tropaeolum majus

Resumo

O cádmio (Cd) é um metal pesado que causa danos ao crescimento e desenvolvimento das plantas. A aplicação de poliaminas pode ser uma alternativa para mitigar os efeitos nocivos desse estresse em plantas. A capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) é uma planta ornamental, medicinal e comestível cultivada e consumida em diversos países. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação de poliaminas (espermina, putrescina e espermidina) como atenuantes do estresse por cádmio em capuchinha. O teor de Cd, atividade enzimática (SOD, APX e POX), peroxidação lipídica, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), fluorescência de clorofila a, trocas gasosas e índices de clorofilas foram avaliados. A aplicação de Cd aumentou a produção de peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídios e diminuiu as trocas gasosas e índices de clorofilas. A aplicação de poliaminas aumentou o acúmulo de Cd e atividade das enzimas do sistema antioxidante e diminuiu os danos causados por esse metal na fluorescência de clorofila, trocas gasosas e índices de clorofilas. A aplicação de poliaminas aumenta a tolerância da capuchinha ao estresse por Cd através do aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante e diminuição produção de H₂O₂ e peroxidação de lipídios, minimizando os danos causados no aparato e processos fotossintéticos. A aplicação de 1 mM de poliaminas (Spm, Spd e Put e sua combinação) podem ser usadas para diminuir os danos causados pelo estresse por Cd em capuchinha.

Palavras-chave: enzimas antioxidantes, fluorescência de clorofila, trocas gasosas

Abstract

Cadmium (Cd) is a heavy metal that causes damage to plant growth and development. The application of polyamines can be an alternative to mitigate the harmful effects of this stress on plants. Nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) is an ornamental, medicinal, and edible plant cultivated and consumed in several countries. Thus, the objective of this work was to evaluate the application of polyamines (spermine, putrescine, and spermidine) as attenuators of cadmium stress in nasturtium. Cd content, enzymatic activity (SOD, APX and POX), lipid peroxidation, hydrogen peroxide (H₂O₂), chlorophyll a fluorescence, gas exchange, and chlorophyll indices were evaluated. Cd application increased H₂O₂ production and lipid peroxidation and decreased gas exchange and chlorophyll indices. Polyamines application increases nasturtium tolerance to Cd stress by increasing the activity of the enzymes of the antioxidant system and decreasing the H₂O₂ production and lipid peroxidation, minimizing the damage caused to the apparatus

and photosynthetic processes. The application of 1 mM of polyamines (Spm, Spd and Put and their combination) can be used to reduce the damage caused by Cd stress in nasturtium.

Keywords: antioxidant enzymes, chlorophyll a fluorescence, gas exchange

3.3. Introdução

O desempenho do agronegócio brasileiro é positivo e todas suas ramificações merecem atenção. O agronegócio representa 27,4% do PIB nacional, e ainda assim possui áreas que continuam carentes de pesquisas para obter produtos de qualidade e ter resiliência frente às mudanças climáticas. A floricultura vem demonstrando sua expansão desde 2006 e a utilização das flores em diversas ocasiões, desde datas comemorativas, em praças com projeto paisagístico, na casa dos brasileiros, chegando até mesmo no prato do consumidor, demonstra a força deste mercado (IBRAFLOR, 2019; AGROSTAT, 2022).

As flores comestíveis são relatadas há anos na história, porém, com o surgimento do termo plantas alimentícias não convencionais, muitas destas ganharam mais espaço no mercado, como é o caso da capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). A capuchinha é uma planta ornamental e medicinal, possui flores e folhas comestíveis, tem rápido crescimento, cujas características fazem com que sua cultura se popularize no Brasil e ganhe cada vez mais espaço entre as escolhas dos consumidores. O plantio desta espécie não é exclusividade numa floricultura, onde, na maioria das vezes, são produzidas diversas outras culturas alimentícias, com todas as técnicas agrônômicas necessárias para a produção (Brondani et al., 2016; Milião et al., 2022).

A produção agrícola de qualidade exige que se faça correção e adubação sucessivas no solo, além da utilização de fontes alternativas de nutrição, como fertirrigação e uso de compostagem, para um ciclo virtuoso de produção. Estes procedimentos podem inserir metais e metaloides na agricultura, como o cádmio (Cd), prejudicando a curto e longo prazo o negócio. O Cd é um metal pesado não essencial, altamente tóxico para organismos vivos e humanos, e possui atividade biológica em organismos terrestres e aquáticos (Chellaiah, 2018). A absorção pela planta pode causar clorose e crescimento inapropriado, além de efeitos no fotossistema, como a inibição da fixação de carbono e diminuição do teor de clorofila, afetando a atividade fotossintética (Gallego et al., 2012). A inserção do Cd na induz estresse osmótico, diminuindo o teor de água relativo da folha, a condutância estomática e a transpiração (Rizwan et al., 2016). A toxicidade do Cd causa, também, a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em danos às membranas das plantas e destruição de biomoléculas e organelas celulares (Abbas et al., 2017), além da inibição da absorção de nutrientes (Xu et al., 2017).

As poliaminas (PAs) são policátions alifáticos, de baixo peso molecular, presentes em bactérias, animais e plantas (Liu et al., 2015). Em plantas estão envolvidas em diversas funções fisiológicas, como crescimento celular, regulação gênica, diferenciação, desenvolvimento e até na imunidade (Bae et al., 2018). A aplicação exógena de PAs tem sido usada com sucesso para aumentar a tolerância ao estresse abiótico em plantas (Aldesuquy et al., 2014), principalmente a putrescina (Put), a espermidina (Spd) e a espermina (Spm) (Handa et al., 2018). A aplicação de poliaminas aliviaram os efeitos danosos do estresse salino (Santos Filho et al., 2022; Silva et al., 2022a; Silva et al., 2022b) e déficit hídrico (Silva et al., 2022c) em capuchinha, porém, ainda não existem estudos sobre os efeitos atenuantes desses fitormônios em plantas de capuchinha sob estresse por Cd, o que constitui o objetivo desse estudo.

3.4. Material e métodos

3.4.1. Local, delineamento experimental e material vegetal

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos (controle (água deionizada), cádmio, (0,8 mg kg⁻¹ substrato), cádmio + Spd, cádmio + Put, cádmio + Spm, cádmio + Spd + Put + Spd), com cinco repetições. Sementes de capuchinha (variedade Semi-dobrada sortida, Feltrin[®]) foram plantadas em bandeja de polietileno com areia lavada e 15 dias após semeadura, as plântulas foram selecionadas e transplantadas (uma planta por vaso) para vasos de polipropileno (9,8 x 13 x 10,5 cm) contendo substrato comercial (Topstrato[®]). As plantas foram fertirrigadas semanalmente com 100 mL de solução de 2 g L⁻¹ de adubo NPK 20-20-20 + micronutrientes (Peters[®] Professional), uma vez por semana até o início dos tratamentos. A irrigação foi realizada diariamente, mantendo o substrato a 80% da capacidade retenção do vaso (Girardi et al., 2016). O cádmio (Cd) foi aplicado aos 7 dias após o plantio (DAP), onde as plantas recebiam com 0,8 mg kg⁻¹ substrato. As poliaminas foram aplicadas aos 50, 55 e 60 DAP e, aos 80 DAP, as plantas foram coletadas. A concentração de poliaminas usada foi de 1 mM (Spormann et al., 2020). As plantas foram pulverizadas com cerca de 10 mL de cada solução, preparadas em água deionizada contendo Tween 80, a 0,05%, como agente tensoativo.

3.4.2. Variáveis analisadas

3.4.2.1. Determinação da concentração de Cd

Raízes, caule/pecíolo, folhas e flores de *T. majus* foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 70 °C até atingir massa seca constante. O material vegetal foi mineralizado em mistura de ácido nítrico e perclórico (3:1, v/v), a 200 °C, e a concentração de Cd foi determinada por espectrometria de absorção atômica (Shimadzu AA-6701F) (Marin et al., 1993).

3.4.2.2. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Amostras de 0,3 g de folhas e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL em um meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM e centrifugadas a 10.000 xg por 15 minutos a 4 °C (Kuo e Kao, 2003), o sobrenadante foi coletado e utilizado na determinação da concentração de H₂O₂ das amostras.

Alíquotas de 20 µL de sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 80 µL de sulfato ferroso amoniacal 250 µM em ácido sulfúrico 25 mM, 50 µL de laranja de xilenol 250 µM e 50 µL de sorbitol 100 mM, em um volume final de 200 µL (Gay e Gebicki, 2000). A mistura foi então homogeneizada e mantida no escuro por 30 minutos e a absorbância determinada em 560 nm. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Estados Unidos). A solução estoque do meio de reação possuía: 625 µM de sulfato ferroso amoniacal em 62,5 mM de ácido sulfúrico, 1 mM de laranja de xilenol e 400 mM de sorbitol. Brancos para os reagentes e extratos vegetais foram preparados e subtraídos das amostras. As concentrações de H₂O₂ foram estimadas com base em curva de calibração, que foi previamente preparada com padrões de H₂O₂, sendo os resultados expressos em nmol de H₂O₂ g⁻¹ MF.

3.4.2.3. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada com base no teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), adotando o método de Hodges et al. (1999). Folhas e raízes (200 mg) foram maceradas em 2,0 mL de etanol:água 80:20 (v/v) e centrifugado a 10.000 xg por 10 min a 4 °C. Uma alíquota de 0,5 mL de sobrenadante foi adicionada a 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) e 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). As amostras foram, então, misturadas vigorosamente, aquecidas a 95 °C em banho-maria por 30 min, resfriadas e centrifugadas a 3.000 x g por 10 min. A absorbância foi lida em 440, 532 e 600 nm. O teor de TBARS foi calculado usando as seguintes equações: Os resultados foram expressos em **nmol g⁻¹ MF**.

3.4.2.4. Enzimas do sistema antioxidante

Para determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase (POX) 0,3 g de folhas e raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas em 2 mL de um meio de extração constituído de tampão de fosfato 0,1 M (pH 6,8), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos, a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático na determinação da atividade dessas enzimas.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de tetrazólio nitroazul em 50% e os resultados foram expressos em U mg proteína⁻¹ min⁻¹. A atividade enzimática foi estimada a partir de medidas de degradação de H₂O₂ a 240 nm (Havir e Mchale, 1987). O ensaio para determinar a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi realizada em meio de reação contendo tampão fosfato 50 mM (pH 6,0), ácido ascórbico 1 mM e H₂O₂ 2 mM e a taxa de oxidação do ascorbato será monitorada a 290 nm (Nakano e Asada, 1981) e os resultados foram expressos em μmol AsA mg⁻¹ proteína min⁻¹.

A atividade da peroxidase (POX) foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação contendo 25 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,8, 20 mM de pirogalol e 20 mM de H₂O₂ (Nakano e Asada, 1981). A quantificação foi determinada pelo aumento da absorbância em 420 nm ($E = 2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em μmoles purpurogalina min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

3.4.2.5. Trocas gasosas, fluorescência de clorofila a e índices de clorofilas

As determinações das trocas gasosas, fluorescência e índices de clorofilas foram realizadas aos 70 dias após o plantio (DAP). Um analisador de gás infravermelho (IRGA – modelo LCPro, ADC BioScientific Ltd.) foi usado para a avaliação das trocas gasosas, sendo as medições aferidas entre as 8 e 10 h da manhã. Foram avaliadas a taxa de assimilação líquida de CO₂ ($A = \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática ($g_s = \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração de carbono interno ($C_i = \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$) e transpiração ($E = \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

A fluorescência de clorofila a foi medida com um MultispeQ v2.0, utilizando o protocolo Photosynthesis Rides, com auxílio do software PhotosynQ (Kuhlgert et al., 2016), em folhas intactas totalmente expandidas, em condições ambientais, entre 8:00 e 10:30 h. A Fluorescência inicial (F_0'), fluorescência máxima (F_m'), rendimento da fluorescência em estado

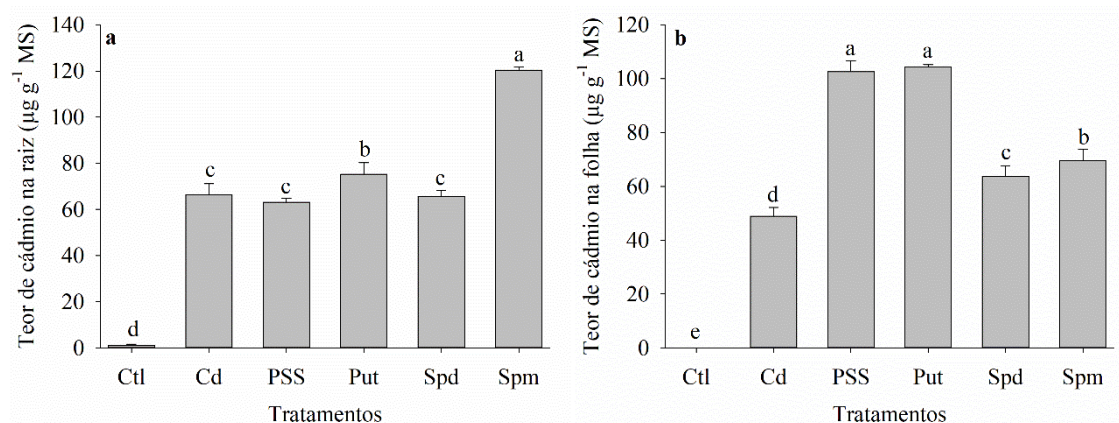
estacionário (F_s), eficiência intrínseca do PSII (F_v'/F_m'), eficiência atual do PSII (Φ_{II}), rendimento para outras perdas de energia (Φ_{NO}), rendimento induzido por processos de regulação negativa (Φ_{NPQ}), dissipação não fotoquímica da energia luminosa absorvida (NPQt), fração de centros PSII abertos com base no “modelo de lago” do PSII (qL) e fluxo linear de elétrons (LEF) foram avaliados. Os índices de clorofilas a e b foram avaliados com um clorofilômetro portátil (Clorofilog, Falker) e foram expressados em índices de clorofila Falker (ICF).

3.4.3. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e, quando significativos, foi realizada um teste de Skott-Knott ($P \leq 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o software R versão 4.1.0 (R Core Team, 2021).

3.5. Resultados

A aplicação de espermina (Spm) e putrescina (Put) aumentou o acúmulo de Cd nas raízes de capuchinha (44,89 e 11,80%, Figura 1a) em comparação com plantas sob aplicação de Cd e sem poliaminas. A aplicação de espermina, putrescina e a combinação das três poliaminas (PSS) aumentou o acúmulo de Cd nas folhas (29,64, 53,15 e 52,39%, Figura 1b). O teor de Cd na flor não teve diferença entre a aplicação de Spm e PSS e plantas crescidas com aplicação de Cd sem poliaminas, contudo, a aplicação de Put e espermidina (Spd) diminuiu o acúmulo deste metal (33,32 e 25,44%, Figura 1c).



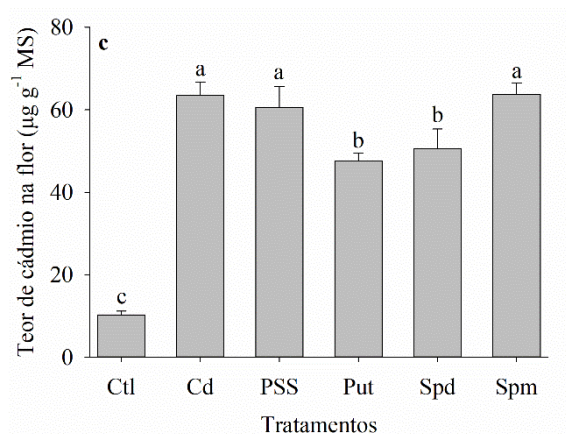
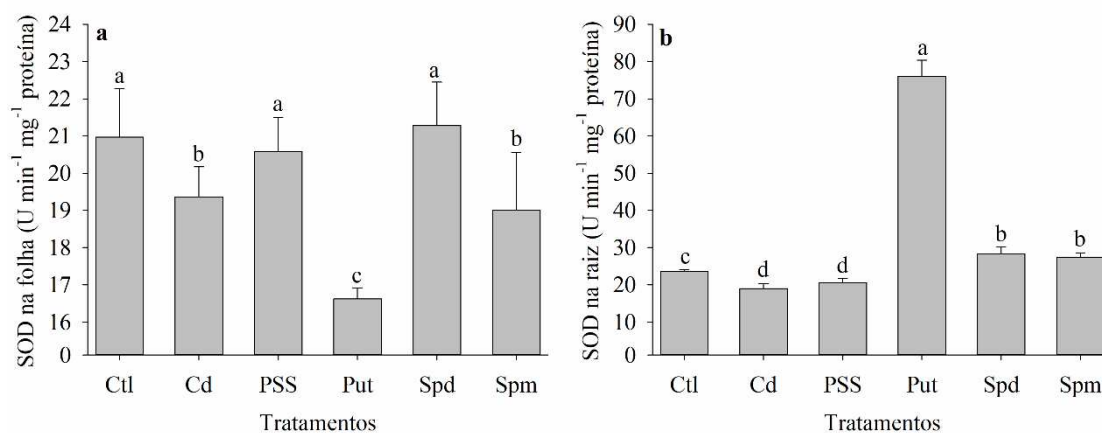


Figura 1. Teor de cádmio na raiz (a), na folha (b) e na flor (c) de *Tropaeolum majus* cultivadas sob aplicação de poliaminas e cádmio. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott ($P \leq 0,05$).

A aplicação de Spd e PSS aumentou a atividade de enzima SOD nas folhas de capuchinha (9,03 e 5,94%, Figura 2a) em comparação com plantas com aplicação Cd e sem poliaminas, enquanto que a aplicação de Put, Spd e Spm aumentou 75,02, 32,97 e 30,95%, respectivamente, a atividade desta enzima nas raízes (Figura 2b). A atividade da APX nas folhas e raízes aumentou em plantas sob aplicação de Cd e Spm (85,77 e 87,31%), Spd (82,25 e 31,01%) Put (57,39 e 32,55%) e PSS (52,95 e 46,41%), respectivamente (Figuras 2c e 2d). Contudo, plantas de capuchinha cultivadas sob a aplicação de Cd e sem aplicação de poliaminas tiveram maior atividade da POX nas folhas (82,42%) e na raiz (22,54%) em relação às plantas do controle (Figura 2e e 2f). No entanto, a aplicação de Put aumentou a atividade desta enzima (39,38%) nas raízes de plantas cultivadas sob estresse por Cd em comparação com plantas sob Cd e sem aplicação de poliaminas.



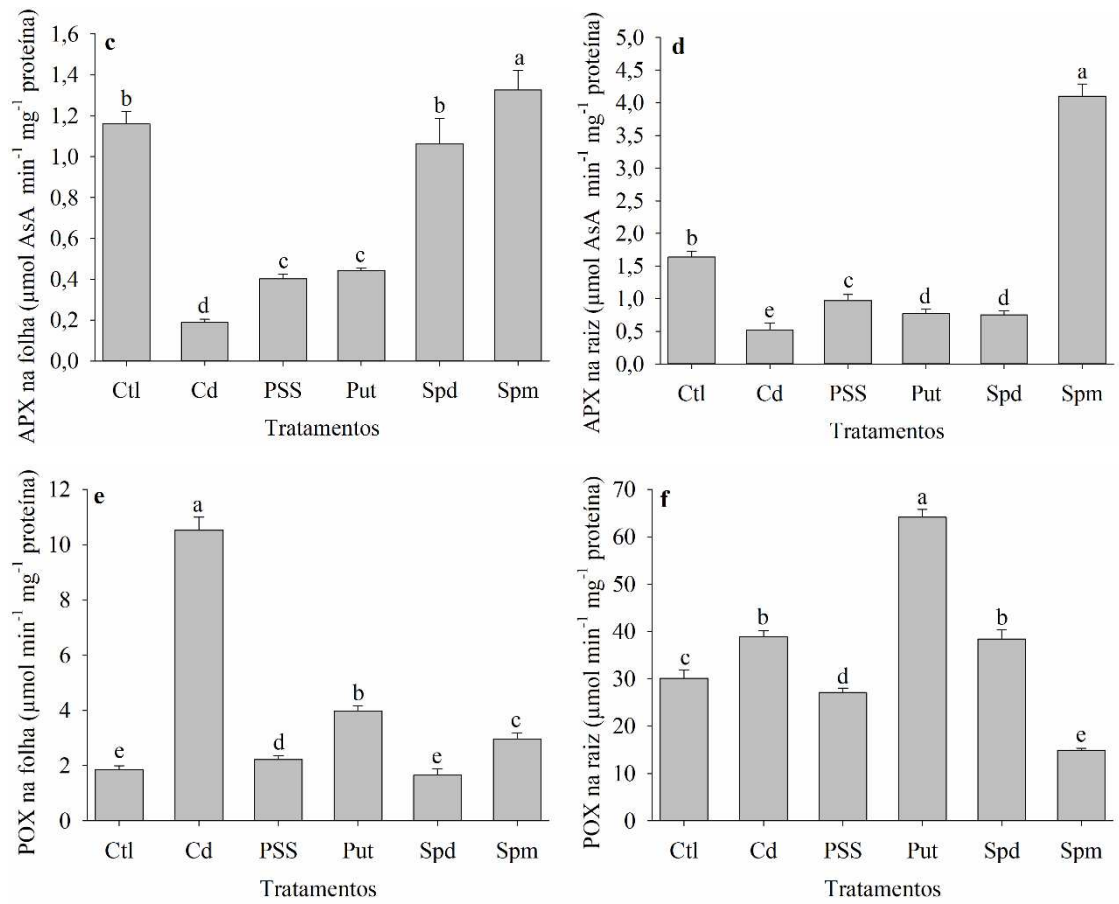


Figura 2. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD – a e b), ascorbato peroxidase (APX – c e d) e peroxidase (POX – e e f) em folhas e raízes de *Tropaeolum majus* cultivadas sob aplicação de poliaminas e cádmio. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott ($P \leq 0,05$).

A aplicação de Put aumentou (44%) a produção de H_2O_2 em folhas de plantas sob estresse por Cd (Figura 3a) e a aplicação de Spd e Spm aumentou (21,74 e 23,70%) a produção de H_2O_2 nas raízes (Figura 3b) em comparação com plantas cultivadas sob Cd e sem aplicação de poliaminas. A aplicação de PSS e Spd diminuiu (26,91 e 40,93%) a peroxidação de lipídeos em folhas (Figura 3c), enquanto a aplicação de Put e Spm aumentou (61,62 e 58,35%) a peroxidação nas raízes (Figura 3d).

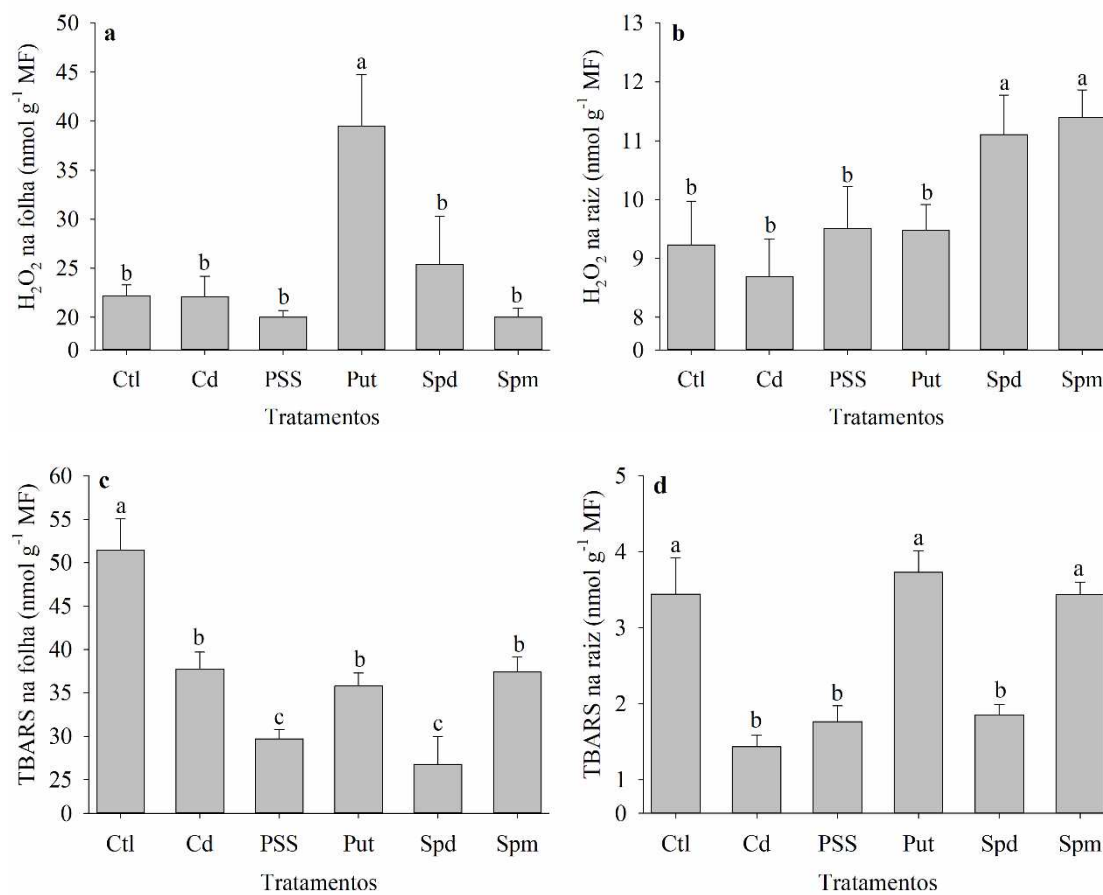


Figura 3. Peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – a e b) e peroxidação de lipídeos (TBARS – c e d) em folhas e raízes de *Tropaeolum majus* cultivadas sob aplicação de poliaminas e cádmio. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott ($P \leq 0,05$).

A aplicação de Put e Spm diminuiu os danos causados pelo Cd e aumentou (11,37 e 11,68%) a fluorescência inicial (F_0'), assim como o rendimento da fluorescência em estado estacionário (F_s) (18,56 e 19,88%) de capuchinha (Figura 4a e 4c). A aplicação de poliaminas não diminuiu os efeitos danosos do estresse por Cd na fluorescência máxima (F_m') (Figura 4b). A aplicação de PSS e Spd diminuiu os danos causados pelo Cd na eficiência intrínseca do PSII (F_v'/F_m' – Figura 4d).

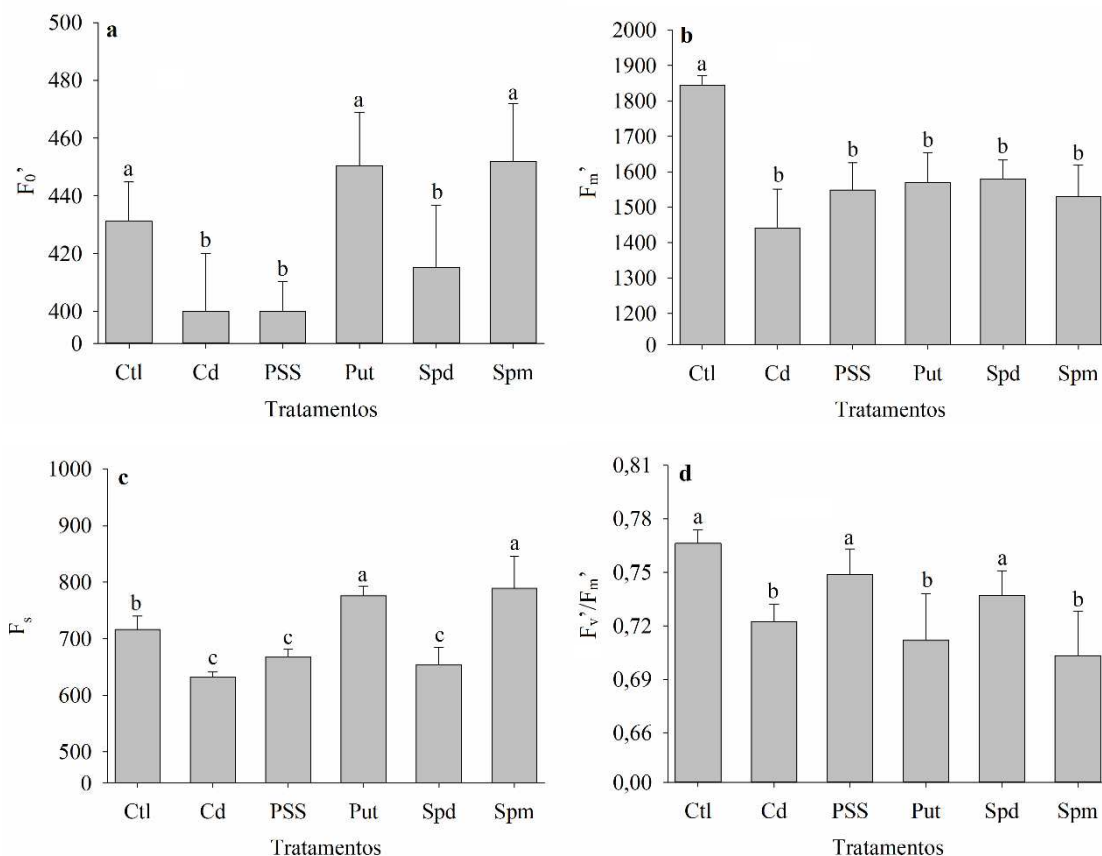


Figura 4. Fluorescência inicial (F_0' - a), fluorescência máxima (F_m' - b), rendimento da fluorescência em estado estacionário (F_s - c) e eficiência intrínseca do PSII (F_v'/F_m' - d) de *Tropaeolum majus* cultivadas sob aplicação de poliaminas e cádmio. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott ($P \leq 0,05$).

A aplicação de Put e Spm diminuiu (19,31 e 16,67%, respectivamente) os efeitos danosos do estresse por Cd na eficiência atual do PSII (Φ_{II} – Figura 5a). A aplicação de PSS e Spm diminuiu (9,97 e 6,83%, respectivamente) os efeitos danosos do Cd no rendimento para outras perdas de energia (Φ_{NO} – Figura 5b). A aplicação de PSS e Spd diminuiu os efeitos danosos do Cd no rendimento induzido por processos de regulação negativa (Φ_{NPQ} – 19,72 e 15,08%) e na dissipação não fotoquímica da energia luminosa absorvida (NPQt – 25,20 e 18,99%), além da aplicação de Spm (20,42%) (Figuras 5c e 5d). A aplicação de PSS, Put e Spm diminuiu os efeitos danosos do Cd na fração de centros PSII abertos com base no “modelo de lago” do PSII (qL – 3,68, 15,12 e 21,45%) (Figura 5e). A aplicação de PSS e Spm diminuiu os efeitos danosos do Cd no fluxo linear de elétrons (LEF – 15,47 e 21,52%) (Figura 5f).

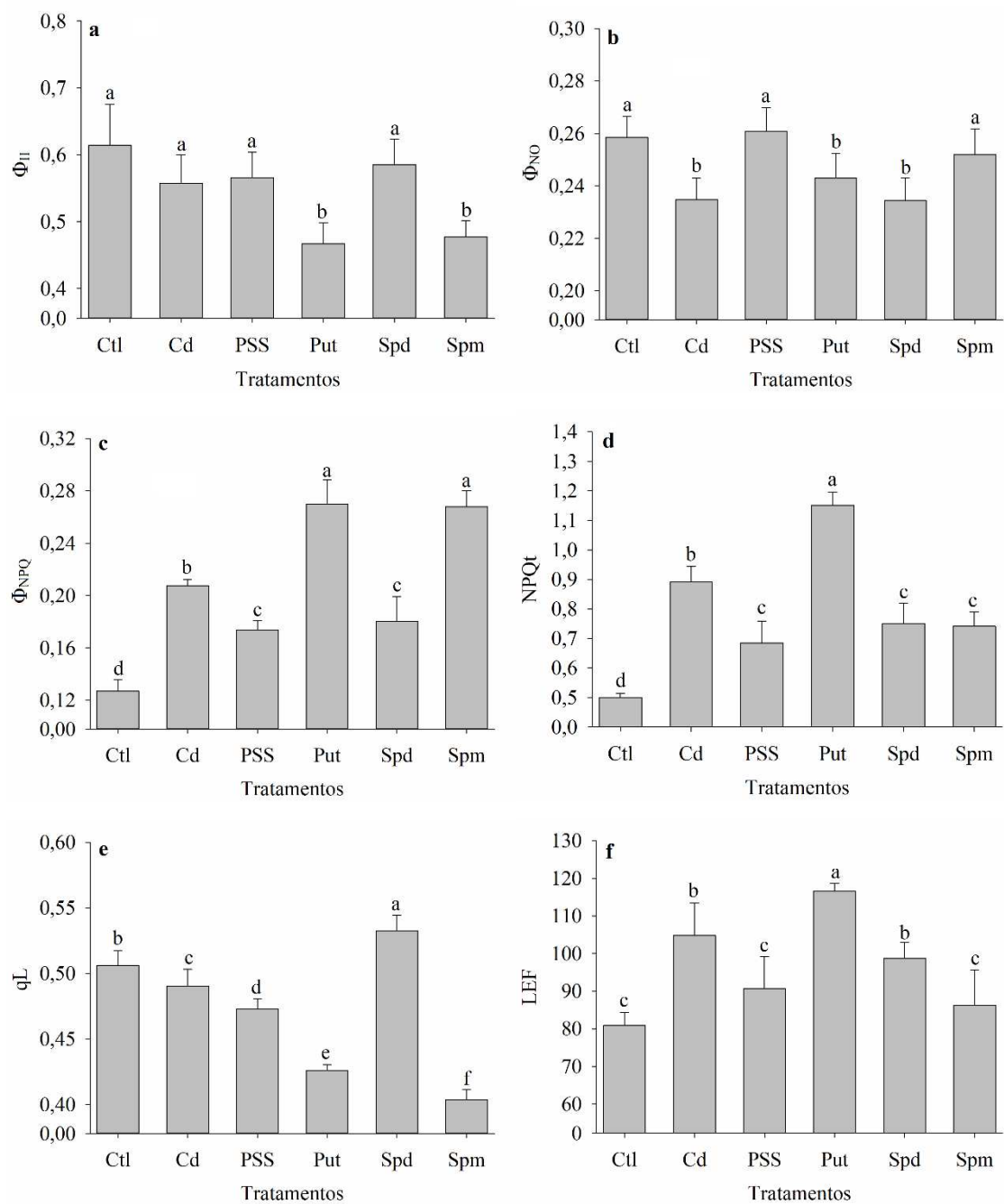


Figura 5. Eficiência atual do PSII (Φ_{II} – a), rendimento para outras perdas de energia (Φ_{NO} – b), rendimento induzido por processos de regulação negativa (Φ_{NPQ} – c), dissipação não fotoquímica da energia luminosa absorvida (NPQt – d), fração de centros PSII abertos com base no “modelo de lago” do PSII (qL – e) e fluxo linear de elétrons (LEF – f) de *Tropaeolum majus* cultivadas sob aplicação de poliaminas e cádmio. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott ($P \leq 0,05$).

A aplicação de Cd diminuiu a condutância estomática (g_s – 14,10%) em relação às plantas sem aplicação de Cd (Ctl). Plantas cultivadas sob aplicação de Put e Spd e Cd tiveram

maior g_s (27,44 e 23,53%) em relação às plantas com aplicação de Cd, enquanto que a plantas cultivadas com Cd e sob aplicação de PSS e Spm foram semelhantes às plantas sem aplicação de Cd (Figura 6a). A aplicação de Put diminuiu (14,33%) os danos causados pelo Cd e aumentou a fotossíntese líquida (A) (Figura 6b), assim como, a aplicação de Put e Spd na taxa de transpiração (E – 15,56 e 22,07%) (Figura 6c). A aplicação de todas as poliaminas aumentaram a concentração de carbono interno (C_i) em plantas cultivadas com Cd (Figura 6d).

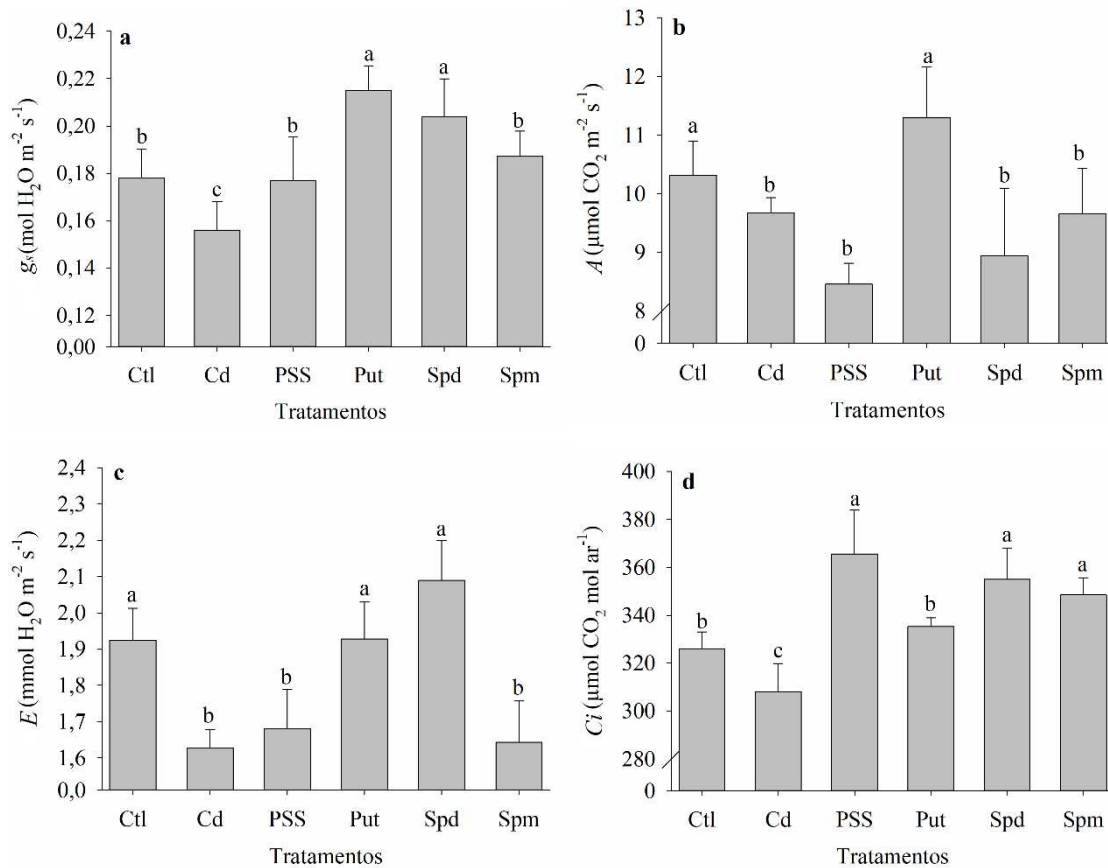


Figura 6. Condutância estomática (g_s – a), fotossíntese líquida (A – b), taxa de transpiração (E – c), concentração de carbono interno (C_i – d) de *Tropaeolum majus* cultivadas sob aplicação de poliaminas e cádmio. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott ($P \leq 0,05$).

A aplicação de Spm diminuiu os danos causados pela irrigação com Cd e aumentou os índices de clorofila a (7,42%), clorofila b (9,40%) e clorofila total (7,87%), em relação às plantas que foram cultivadas com Cd e sem aplicação de poliaminas, assim como, esses valores foram iguais às plantas sem aplicação de Cd (Figura 7).

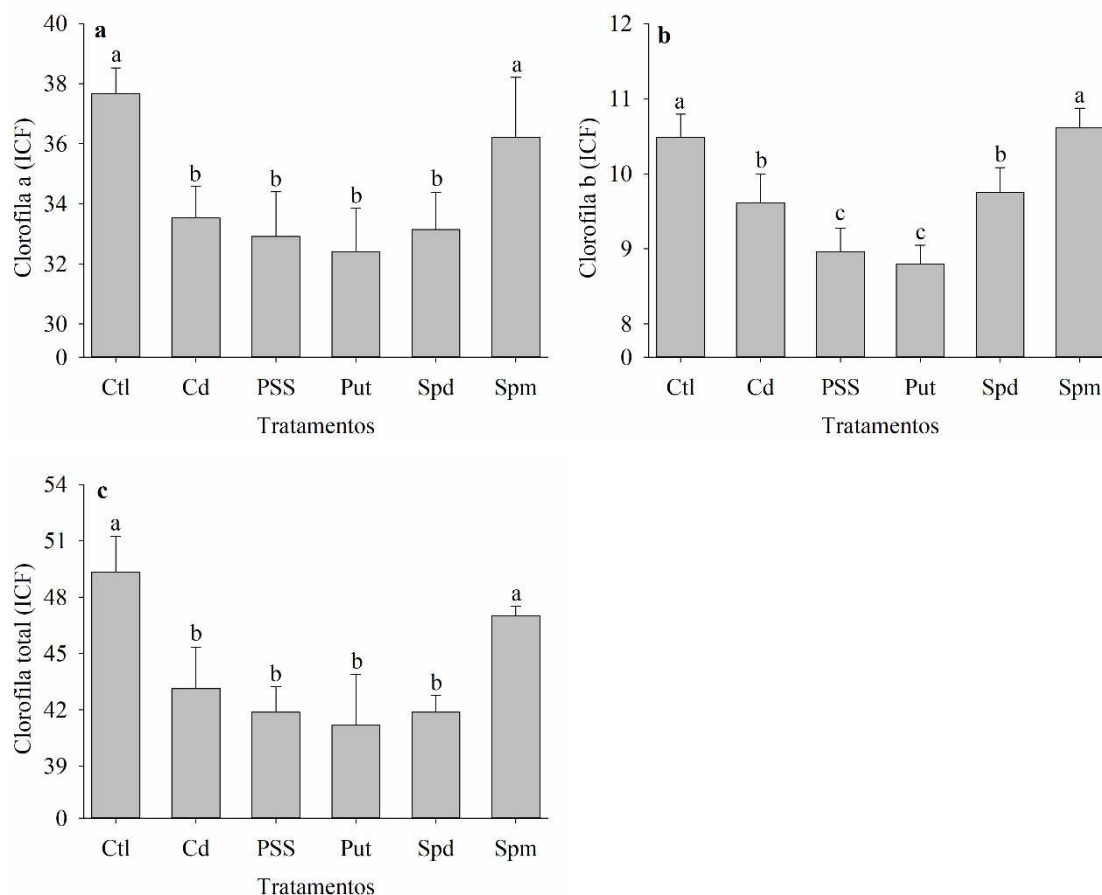


Figura 7. Clorofila a (a), clorofila b (b) e clorofila total (c) de *Tropaeolum majus* cultivadas sob aplicação de poliaminas e cádmio. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott ($P \leq 0,05$).

3.6. Discussão

A diminuição do acúmulo de Cd pode estar relacionado a ação dessas poliaminas na compartimentalização desse metal na raiz e nas folhas e diminuindo o seu acúmulo nos órgãos reprodutivos, caracterizando um mecanismo de aclimação dessa planta ao estresse causado por esse metal. O acúmulo de Cd na parte aérea da planta está relacionado à alta mobilidade que esse metal tem através do xilema, acumulando-se em qualquer parte da planta causando crescimento atrofiado, clorose e epinastia foliar (Zhao et al., 2006).

A aplicação de poliaminas aumentou a atividade das enzimas do sistema antioxidante em folhas e raízes de capuchinha cultivadas sob irrigação com Cd (Figura 2) devido a manutenção da integridade das membranas através da diminuição da peroxidação lipídica (Figura 3). A ação das poliaminas na ativação das vias da glioxilase e de antioxidantes induzem a tolerância de plantas em condições de estresse (Hasan et al., 2021). As enzimas do sistema antioxidante têm papel fundamental na produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio

(EROs) (Tchounwou et al., 2012), cuja produção desordenada poderia causar estresse oxidativo.

O principal mecanismo da fitotoxicidade causada pelo Cd é a indução de estresse oxidativo (Grobelak et al., 2019). O aumento da produção de H_2O_2 em folhas e raízes de plantas cultivadas com Cd (Figura 3) pode ter sido um mecanismo de aclimatação da planta ao estresse, visto que ERO em pequenas quantidades serve como um sinalizador do estresse. Esse aumento pode estar relacionado, também ao aumento da APX, mediado pela aplicação de poliaminas (Figura 2) que transforma essa ERO em água e a ajuda na sua remoção (Nadeem et al., 2019). A aplicação de poliaminas diminuiu a peroxidação de lipídeos em folhas e raízes (Figura 3) devido ao aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante mediadas pela aplicação desses fitormônios (Figura 2) que têm a capacidade de quelar o Cd, diminuindo a sua nocividade (Jozefczak et al., 2015).

A aplicação de poliaminas diminuiu os danos causados pelo Cd na fluorescência inicial (F_0'), rendimento da fluorescência em estado estacionário (F_s) e eficiência intrínseca do PSII (F_v'/F_m') (Figura 4) devido à ação desses fitohormônios, os quais entram rapidamente nos cloroplastos de plantas sob estresse, aumentando a proteção da estrutura e função do aparelho fotossintético (Li et al., 2018).

A aplicação de poliaminas diminuiu os efeitos danosos do estresse por Cd na eficiência atual do PSII (Φ_{II}), rendimento para outras perdas de energia (Φ_{NO}), rendimento induzido por processos de regulação negativa (Φ_{NPQ}), dissipação não fotoquímica da energia luminosa absorvida (NPQt) e no fluxo linear de elétrons (LEF) (Figura 5). Com isso, a aplicação desses fitormônios manteve a integridade dos cloroplastos de plantas sob estresse por Cd devido as poliaminas possuírem propriedades neutralizantes de ácidos e antioxidantes e estabilização de membranas e parede celular (Shi et al., 2013).

O Cd altera a ultraestrutura do cloroplasto e reduz a taxa fotossintética líquida, a condutância estomática e a transpiração foliar (Souza et al., 2011), contudo, a aplicação de poliaminas diminuiu os danos causados por esse metal nas trocas gasosas desta planta devido esses fitormônios estarem associados a manutenção do desempenho fotossintético, atuando diretamente nos tilacóides dos cloroplastos e promovendo a atividade da Rubisco (Qian et al., 2021). Além disso, a aplicação desses fitormônios aumentou a atividade das enzimas do sistema antioxidante (Figura 2), diminuiu a peroxidação lipídica (Figura 3) e manteve a integridade do aparato fotossintético (Figura 4 e 5), fazendo com as trocas gasosas fossem mantidas em plantas sob estresse por Cd (Figura 6). A manutenção desses processos fisiológicos mediados pela aplicação de poliaminas estar relacionado ao papel desses fitormônios na regulação dos

sistemas antioxidantes (Figura 2), além da diminuição da produção de EROs e manutenção do status redox (Tanou et al., 2014).

O Cd causa danos na estrutura dos cloroplastos e na função do fotossistema, reduzindo os pigmentos fotossintéticos (Chen et al., 2014; Rizwan et al., 2016), mas a aplicação de Spm diminuiu os danos causados pela irrigação com Cd e aumentou os índices de clorofila a, clorofila b e clorofila total (Figura 7), devido ao papel deste fitohormônio em regular o sistema antioxidante e aliviar o estresse oxidativo através da eliminação de EROs (Nahar et al., 2016), assim como na manutenção da estabilidade e permeabilidade das membranas celulares (Sharma et al., 2021).

3.7. Conclusões

A aplicação de poliaminas aumenta a tolerância da capuchinha ao estresse por Cd através do aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante e diminuição produção de peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídios, minimizando os danos causados no aparato e processos fotossintéticos. A putrescina obteve destaque, aumentando a concentração de Cd nas raízes e folha e diminuindo nas flores, além de influenciar positivamente nos demais parâmetros. A aplicação de 1 mM de poliaminas (Spm, Spd e Put e sua combinação) podem ser usadas para diminuir os danos causados pelo estresse por Cd em capuchinha.

3.8. Referências

- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Zia-ur-Rehman, M., Qayyum, M. F., OK, Y. S & Murtaza, G. Effect of biochar on alleviation of cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown on Cd-contaminated saline soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 26, p. 25668-25680, 2018.
- AGROSTAT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Indicadores Gerais Agrostat. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- Aldesuquy, H., Haroun, S., Abo-Hamed, S., & El-Saied, A. W. Involvement of spermine and spermidine in the control of productivity and biochemical aspects of yielded grains of wheat plants irrigated with waste water. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 1, n. 1, p. 16-28, 2014.
- Bae, D. H., Lane, D. J., Jansson, P. J., & Richardson, D. R. The old and new biochemistry of polyamines. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 9, p. 2053-2068, 2018.

- Bao, T., Sun, T., Zang, P., Niu, Z. Iron-deficiency induces cadmium uptake and accumulation in *Solanum nigrum* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 338-342, 2009.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- Brondani, J. C., Cuelho, C. H. F., Marangoni, L. D., de Lima, R., Guex, C. G., Bonilha, I. F., & Manfron, M. P. Traditional usages, botany, phytochemistry, biological activity and toxicology of *Tropaeolum majus* L.-A review. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 15, n. 4, p. 264-273, 2016.
- Chance, B., & Maehly, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, v. 2, p. 764-775, 1955.
- Chellaiah, E. R. Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. **Applied Water Science**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2018.
- Chen, C., Zhou, Q., Cai, Z. Effect of soil HHCB on cadmium accumulation and phytotoxicity in wheat seedlings. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 10, p. 1996-2004, 2014.
- Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales, E., Zawoznik, M.S, P., Groppa, M.D, & Benavides, M. P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p. 33-46, 2012.
- Gay, C., & Gebicki, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, v. 284, p. 217-220, 2000.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**. v. 59, p. 309–314, 1977.
- Girardi, L.B., Peiter, M.X., Bellé, R.A., Robaina, A.D., Torres, R.R., Kirchner, J.H., & Ben, L.H.B. (2016). Evapotranspiration and crop coefficients of potted *Alstroemeria* × *Hybrida* grown in greenhouse. **Irriga**, v. 21, n. 4, p. 817-829, 2016.
- Grobelak, A., Świętek, J., Murtaś, A., Jaskulak, M. (2019). Cadmium-induced oxidative stress in plants, cadmium toxicity, and tolerance in plants: from physiology to remediation. In: **Cadmium toxicity and tolerance in plants**. Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 213-231.
- Handa, A. K., Fatima, T., Mattoo, A. K. Polyamines: bio-molecules with diverse functions in plant and human health and disease. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 10, 2018.

- Hasan, M. M., Skalicky, M., Jahan, M. S., Hossain, M. N., Anwar, Z., Nie, Z. F., Alabdallah, N. M., Brestic, M., Hejnak, V., Fang, X. W. Spermine: its emerging role in regulating drought stress responses in plants. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 261, 2021.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, n. 4, p. 604-611, 1999.
- IBRAFLOR - Instituto Brasileiro de Floricultura. 2019. **O mercado de flores no Brasil**. Disponível em: Disponível em: <https://www.ibraflor.com.br/numeros-setor>. Acessado em: 16 fev 2022.
- Jozefczak, M., Bohler, S., Schat, H., Horemans, N., Guisez, Y., Remans, T., ... Cuypers, A. Both the concentration and redox state of glutathione and ascorbate influence the sensitivity of arabidopsis to cadmium. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 601-612, 2015.
- Kar, M., & Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.
- Kuhlgert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M. I., Roth, M. G., Bi, K., TerAvest, D., Weebadde P. & Kramer, D. M. MultispeQ Beta: a tool for large-scale plant phenotyping connected to the open PhotosynQ network. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 10, p. 160592, 2016.
- Kuo, M. C., & Kao, C. H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 1, p. 149-152, 2003.
- Li, L., Gu, W., Li, J., Li, C., Xie, T., Qu, D., Meng, Y., Li, C., Wei, S. Exogenously applied spermidine alleviates photosynthetic inhibition under drought stress in maize (*Zea mays* L.) seedlings associated with changes in endogenous polyamines and phytohormones. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 129, p. 35-55, 2018.
- Li, Y., Chen, Z., Xu, S., Zhang, L., Hou, W., Yu, N. Effect of combined pollution of Cd and B [a] P on photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics of wheat. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 24, n. 1, 2015.
- Liu, J. H., Wang, W., Wu, H., Gong, X., Moriguchi, T. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 827, 2015.
- Marin, A. R., Pezeshki, S. R., Masschelen, P. H., & Choi, H. S. Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 16, n. 5, p. 865-880, 1993.

- Milião, G. L., de Oliveira, A. P. H., de Souza Soares, L., Arruda, T. R., Vieira, É. N. R., & Junior, B. R. D. C. L. Unconventional Food Plants: nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, p. 100124, 2022.
- Nadeem, M., Li, J., Yahya, M., Sher, A., Ma, C., Wang, X., Qiu, L. Research progress and perspective on drought stress in legumes: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 2541, 2019.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Rahman, A., Alam, M.M., Mahmud, J.A., Suzuki, T., Fujita, M. Polyamines confer salt tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) by reducing sodium uptake, improving nutrient homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification systems. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1104, 2016.
- Nakano, Y., & Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P. R., & Moreira, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.
- Qian, R., Ma, X., Zhang, X., Hu, Q., Liu, H., Zheng, J. Effect of exogenous spermidine on osmotic adjustment, antioxidant enzymes activity, and gene expression of *Gladiolus gandavensis* seedlings under salt stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 4, p. 1353-1367, 2021.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Viena, Austria, 2021.
- Rizwan, M., Ali, S., Abbas, T., Zia-ur-Rehman, M., Hannan, F., Keller, C., Al-Wabel, M.I., & Ok, Y. S. Cadmium minimization in wheat: a critical review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 43-53, 2016.
- Santos Filho, F. B. D., Silva, T. I. D., Dias, M. G., & Grossi, J. A. S. Polyamines mitigate the harmful effects of salt stress on the growth and gas exchange of nasturtium. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 46, p. e000722, 2022.
- Sharma, K., Gupta, S., Thokchom, S.D., Jangir, P., Kapoor, R. Arbuscular mycorrhiza-mediated regulation of polyamines and aquaporins during abiotic stress: deep insights on the recondite players. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 1072, 2021.
- Shi, H., Ye, T., Chan, Z. Comparative proteomic and physiological analyses reveal the protective effect of exogenous polyamines in the bermudagrass (*Cynodon dactylon*) response to salt and drought stresses. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 11, p. 4951-4964, 2013.

- Silva, T. I., Dias, M. G., Araújo, N. O., Santos, M. N. S., Cruz, R. R. P., Dias, T. J., ... & Barbosa, J. G. Spermine reduces the harmful effects of salt stress in *Tropaeolum majus*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 28, n. 3, p. 687-696, 2022a.
- Silva, T. I., Dias, M. G., de Araújo, N. O., de Sousa Santos, M. N., Ribeiro, W. S., dos Santos Filho, F. B., ... & Grossi, J. A. S. Spermine reduces the harmful effects of drought stress in *Tropaeolum majus*. **Scientia Horticulturae**, v. 304, p. 111339, 2022c.
- Silva, T. I., Dias, M. G., Grossi, J. A. S., Ribeiro, W. S., Moraes, P. J., Araújo, F. F., & Barbosa, J. G. Application of phytohormones as attenuators of salt stress in *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **Acta Botanica Croatica**, v. 81, p. 51-60, 2022b.
- Souza, V. L., Almeida, A. A. F., Lima, S. G., Cascardo, J. C. D. M., Silva, D. D. C., Mangabeira, P. A., Gomes, F. P. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L.(Rubiaceae). **Biometals**, v. 24, n. 1, p. 59-71, 2011.
- Spormann, S., Soares, C., Teixeira, J., & Fidalgo, F. Polyamines as key regulatory players in plants under metal stress—a way for an enhanced tolerance. **Annals of Applied Biology**, v. 178, p. 209-226, 2020.
- Tanou, G., Ziogas, V., Belghazi, M., Christou, A., Filippou, P., Job, D., Fotopoulos, V., Molassiotis, A. (2014). Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 4, p. 864-885, 2014.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. Heavy metal toxicity and the environment. **Molecular, clinical and environmental toxicology**, p. 133-164, 2012.
- Xu, Z. M., Li, Q. S., Yang, P., Ye, H. J., Chen, Z. S., Guo, S. H., Wang, L.L., Bao-Yan, H. & Zeng, E. Y. Impact of osmoregulation on the differences in Cd accumulation between two contrasting edible amaranth cultivars grown on Cd-polluted saline soils. **Environmental Pollution**, v. 224, p. 89-97, 2017.
- Zhao, F. J., Jiang, R. F., Dunham, S. J., McGrath, S. P. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **New Phytologist**, v. 172, n. 4, p. 646-654, 2006.

4. CONCLUSÕES

As plantas de capuchinhas acumularam em suas estruturas quantidades maiores de Cd à medida que aumentou-se as doses, tendendo a ter alta bioconcentração do metal e diminuição da translocação. Além disso, as plantas de capuchinhas tiveram a e fluorescência de clorofila e seu sistema antioxidante alterando as folhas em doses superiores a $47 \mu\text{M}$, trocas gasosas nas maiores doses de Cd. A aplicação de poliaminas aumenta a tolerância da capuchinha ao estresse por Cd através do aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante e diminuição produção de peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídios, minimizando os danos causados no aparato e processos fotossintéticos. A putrescina obteve destaque, aumentando a concentração de Cd nas raízes e folha e diminuindo nas flores, além de influenciar positivamente nos demais parâmetros. A aplicação de 1 mM de poliaminas (Spm, Spd e Put e sua combinação) podem ser usadas para diminuir os danos causados pelo estresse por Cd em capuchinha. O Cd é um problema para a produção de capuchinhas e as poliaminas podem ser usadas como solução.