

DARLIELVA DO ROSÁRIO FREITAS

ENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO, ZERO VALENTE NÃO CONVENCIONAL, NA TOLERÂNCIA AO CÁDMIO EM *Lemna valdiviana*

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

Orientador: Juraci Alves de Oliveira

Coorientador: Vinícius Melo da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

F866e
2023

Freitas, Darlielva do Rosário, 1991-
Envolvimento de nanopartículas de ferro, zero valente não convencional, na tolerância ao cádmio em *Lemna Valdiviana* / Darlielva do Rosário Freitas. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (36 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2023.

Referências bibliográficas: f. 31-36.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.516>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Lemna valdiviana* - Efeito do cádmio.
2. Fitorremediação. 3. Antioxidantes. 4. Estresse (Fisiologia).
5. Estresse oxidativo. I. Oliveira, Juraci Alves de, 1965-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 684.64


DARLIELVA DO ROSÁRIO FREITAS

ENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRO, ZERO VALENTE NÃO CONVENCIONAL, NA TOLERÂNCIA AO CÁDMIO EM *Lemna valdiviana*


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

APROVADA: 31 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **DARLIELVA DO ROSARIO FREITAS**
Data: 02/09/2023 09:33:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DarIELVA do Rosário Freitas
Autora

Documento assinado digitalmente
 **JURACI ALVES DE OLIVEIRA**
Data: 04/09/2023 07:34:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Juraci Alves de Oliveira
Orientador

AGRADECIMENTOS

À minha família, à Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a Pós-graduação, e o programa de Pós-graduação em Biologia Celular, como um todo, pela ótima formação acadêmica e profissional, gratidão por ter conhecido bons professores nessa caminhada.

Ao meu orientador, Juraci Oliveira e ao Vinícius, pela orientação, por ter me acolhido e aceito e me ajudado melhorar a proposta de trabalho, por se dispor a discutir o andamento deste trabalho comigo e por todo o ensinamento repassado.

Aos meus amigos, que me acolheram em suas casas, e tive o prazer de conhecer e de conviver durante este período: Rodrigo, Haira, Carla e Laís, sempre dispostos a me receber nesses meus “vai e vem”.

Aos meus companheiros de laboratório, Ana Defeo, Aristides Filho, Daniel Coelho, Fernando Brito, Laís Manso, Pedro Henrique, Vinícius Silva e à Técnica Taline, pela ajuda no trabalho, ensinamentos repassados e amizade cultivada. Aos amigos Zulemara e Breno que fiz nas disciplinas e tornavam as madrugadas mais leves; e aos que fiz em Viçosa e meus amigos da vida que me deram apoio e incentivo.

À Professora Renata e seu Orientado Gustavo, pela ajuda e por ceder o espaço do Laboratório de Química da UFV para síntese das nanopartículas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

FREITAS, Darlielva do Rosário, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Envolvimento de nanopartículas de ferro zero valente não convencional, na tolerância ao cádmio em *Lemna valdiviana***. Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientador: Vinícius Melo da Silva.

A fitorremediação é um conceito que abrange uma diversidade de técnicas de baixo custo, na qual plantas são utilizadas para o tratamento de ambientes contaminados por diferentes classes de compostos químicos, incluindo ambientes com concentrações de metais acima dos limites definidos na legislação ambiental. As *Lemnas sp.* são monocotiledôneas aquáticas, de pequeno tamanho e de crescimento rápido o que, associado ao potencial de bioacumulação, tem chamado a atenção para fins de fitorremediação. A presente pesquisa utilizou a espécie *Lemna valdiviana*, que tem se mostrado eficiente na remoção de arsênio e outros poluentes metálicos do meio aquático e, portanto, participa como uma possível bioacumuladora de cádmio (Cd). Este elemento foi detectado em concentrações superiores às permitidas (5 ppb) no rio Fumaça, que nasce dentro do Parque Estadual Serra do Brigadeiro (PESB). Para este estudo, avaliamos a influência do ferro, na forma iônica e de nanopartículas “verdes” (ferro zero valente – nZVI), sintetizadas de forma não convencional, na absorção e nos danos bioquímicos causados pelo Cd em plantas de *Lemna valdiviana*. Para tanto, as plantas mantidas apenas em solução nutritiva de Clark (controle) e submetidas aos tratamentos contendo Fe, na forma de Fe-EDTA e na forma de nZVI, na concentração de 50 mg L⁻¹, e Cd, na concentração de 0,02 mg L⁻¹, por 48 h. As plantas cultivadas em presença de Cd e de Fe, na forma salina e de nanopartículas, acumularam maiores concentrações de Cd sem, contudo, aumentar os danos celulares em comparação ao tratamento com Cd de forma isolada. De modo geral, podemos concluir que o sistema antioxidante enzimático atuou para mitigar os danos oxidativos e que a suplementação com Fe, em ambas formas químicas, atuou de forma benéfica na mitigação de danos celulares.

Palavras-chave: Sistema antioxidante. Fitorremediação. Estresse abiótico

ABSTRACT

FREITAS, Darlielva do Rosário, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2023. **Involvement of unconventional zero valent iron nanoparticles in cadmium tolerance in *Lemna valdiviana***. Advisor: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisor: Vinícius Melo da Silva.

Phytoremediation is a concept that covers a diversity of low-cost techniques, in which plants are used for the treatment of environments contaminated by different classes of chemical compounds, including environments with concentrations of metals above the limits defined in environmental legislation. The *Lemnias sp. nov.* They are aquatic monocots, of small size and fast growth, which, associated with the potential for bioaccumulation, has drawn attention to phytoremediation purposes. The present research used the species *Lemna valdiviana*, which has been shown to be efficient in removing arsenic and other metallic pollutants from the aquatic environment and, therefore, participates as a possible bioaccumulator of cadmium (Cd). This element was detected in concentrations higher than those allowed (5 ppb) in the Fumaça River, which rises within the Serra do Brigadeiro State Park (PESB). For this study, we evaluated the influence of iron, in ionic form and "green" nanoparticles (zero valent iron – nZVI), synthesized in an unconventional way, on the absorption and biochemical damage caused by Cd in *Lemna valdiviana* plants. Therefore, the plants kept only in Clark's nutrient solution (control) and submitted to treatments containing Fe, in the form of Fe-EDTA and in the form of nZVI, in the concentration of 50 mg L⁻¹, and Cd, in the concentration of 0.02 mg L⁻¹, for 48 h. Plants grown in the presence of Cd and Fe, in the saline and nanoparticle form, they accumulated higher concentrations of Cd without, however, increasing cell damage compared to treatment with Cd alone. In general, we can conclude that the enzymatic antioxidant system acted to mitigate oxidative damage and that supplementation with Fe, in both chemical forms, acted beneficially in the mitigation of cellular damage.

Keywords: Antioxidant system. Phytoremediation. Abiotic stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Obtenção e aclimatação do material vegetal	10
2.2. Síntese das nZVI “verdes”	11
2.3. Aplicação dos tratamentos	12
2.4. Determinação do teor de Fe adsorvido na superfície das raízes e folhas	13
2.5. Determinação da concentração de Cd e Fe	13
2.6. Peroxidação lipídica	14
2.7. Determinação de espécies reativas de oxigênio	14
2.8. Determinação da atividade enzimática antioxidante	15
2.8.1. Obtenção dos extratos enzimáticos	15
2.8.2. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD)	15
2.8.3. Determinação da atividade da catalase (CAT)	15
2.8.4. Determinação da atividade das peroxidases (POX)	16
2.8.5. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX)	16
2.9. Determinação de proteínas	16
2.10. Antioxidantes não enzimáticos ascorbato total e tióis totais	17
2.10.1. Ascorbato total	17
2.10.2. Compostos Tiolados	17
2.11. Análise estatística	18
3. RESULTADOS	19
3.1 Adsorção de ferro e absorção de cádmio e ferro	19
3.2. Peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio	22
3.3. Sistema antioxidante enzimático	23
3.4. Antioxidantes não enzimáticos: ascorbato e tióis	24
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

Águas contaminadas têm sido uma grande preocupação ambiental, pois podem ser responsáveis por uma série de problemas ao longo da cadeia alimentar (Moulis et al. 2010). A contaminação ocorre por várias ações antrópicas como, descarte não regulamentado industriais e doméstico de resíduos orgânicos e inorgânicos, atividades agrícolas ao utilizarem pesticidas, fertilizantes, bem como por atividades de mineradoras (Rai et al. 2022; Sucio et al. 2022). Os subprodutos dessas atividades muitas vezes são metalóides como arsênio (As) e metais, cromo (Cr), ferro (Fe), mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), cádmio (Cd) e alumínio (Al), aumentando a disponibilidade desses elementos no meio ambiente (Kiran et al. 2021).

Os metais, em concentrações permitidas, não causam danos biológicos, e alguns são essenciais, como Fe, Cu, Mn e Zn, presentes em estruturas e atividades celulares. Neste caso, a deficiência pode causar alterações metabólicas e fisiológicas, como por exemplo a deficiência de ferro nas plantas, que afeta o complexo clorofila-proteína e induz a senescência das folhas (Zou et al. 2021). Observa-se, também, a participação de vários elementos, como o Fe, Zn, Mn e Cu, atuando como cofatores enzimáticos, com implicações diretas nas atividades de várias enzimas (Young et al. 2021). Outros elementos, contudo, como o As, Hg, Pb e Cd, não fazem parte do metabolismo celular e, portanto, podem provocar alterações bioquímicas, morfológicas e fisiológicas nas plantas. Cita-se, por exemplo, os elementos As e Cd, os quais competem pelo sistema de absorção com os nutrientes fosfato e cálcio, respectivamente (Moulis et al. 2010). Estes elementos, por não terem função biológica, apenas irão acumular e causar danos às plantas (Coelho et al. 2020). Metais potencialmente tóxicos, mesmo que essenciais, em concentrações elevadas, podem apresentar toxicidade para as plantas (Repkina et al. 2023), e os não essenciais apresentam uma toxicidade ainda maior (Coelho et al. 2022).

O Cd é um metal tóxico com limite permitido pela regulamentação da União Europeia 5 µg/L em água doce e pelo CONAMA 10 µg/L, uma vez que mesmo em concentrações reduzidas apresenta toxicidade tanto para plantas como para animais (Hu et al. 2021). O Cd é considerado substância muito tóxica para os humanos, sendo classificado como carcinogênico, segundo Registro de Doenças e Tóxicas da América (ATSDR) (Hu et al. 2021). O Cd está associado a insuficiência renal, osteoporose e

outras enfermidades, como a doença Itaí-Itaí, inicialmente diagnosticada em pessoas no Japão, a qual foi associada ao consumo prolongado de arroz contaminado por Cd (Zhou et al. 2021; Cui et al. 2022). Assim, o Cd tem sido objeto de grande preocupação ambiental, em escala mundial, o que tem motivado a estudos por alternativas para remediação de solos e águas contaminadas (Gabriele et al. 2021).

O Cd foi encontrado recentemente em uma região próxima à cabeceira do rio Fumaça (Valvassori, 2018), localizado no limite noroeste da bacia do Rio Paraíba do Sul. Esse rio nasce dentro do Parque Estadual Serra do Brigadeiro (PESB), o qual é o divisor de águas das bacias do rio Doce e do rio Paraíba do Sul, que são as duas bacias hidrográficas mais importantes da região Sudeste (CTA, 2005).

A fitorremediação é um método que vem sendo bem aplicado para remoção de diversos contaminantes em solos e águas, sendo uma alternativa que apresenta baixo custo quando comparado a outros tratamentos físicoquímicos (Gabriele et al. 2021). Espécies vegetais da família das Lemnaceae são exemplos de plantas aquáticas utilizadas na fitorremediação de As, B, Co, Cu e Hg, (Türker et al. 2017), (Souza et al. 2018), (Souza et al. 2019) (Coelho et al. 2020). Estudos com *Lemna minor* submetida ao Cd mostraram que essa planta pode acumular este metal (Xue et al. 2018; Peršić et al. 2019) e, assim como outras macrófitas aquáticas, podem melhorar a eficiência do processo de fitorremediação quando utilizadas em conjunto com nanopartículas.

As nanopartículas (tamanho ≤ 100 nm) fazem parte do grupo dos nanomateriais que vêm sendo bem explorados em diversas áreas, incluindo a preservação do meio ambiente (Emmanuel et al. 2023). As nanopartículas de ferro zero valente (nZVI), em que o Fe participa como doador de elétrons, são consideradas agentes redutores, atuantes em processos de oxirredução.

As pesquisas envolvendo nanopartículas associadas a plantas para aplicação em processos de fitorremediação são, ainda, muito incipientes. Alguns trabalhos não têm obtido sucesso no aumento da eficiência do processo de fitorremediação com o uso de nanopartículas, conforme Pontes et al. (2020), em que a exposição das plantas de *L. valdiviana* a nanopartículas de óxido de cobre causou decréscimo no processo fotossintético. Da mesma forma, são poucos os trabalhos que avaliam o quanto o acúmulo dessas nanopartículas possam ser benéficas às plantas. Estima-se que as nanopartículas metálicas e ametálicas são benéficas para a atenuação de estresse por metais potencialmente tóxicos (Zou et al. 2021) como: as nanopartículas (Nps)

ametálicas SiNps, em arroz, milho e coentro; HPAnps arroz, tabaco, azevém e *Brassica chinensis*; SeNps, em arroz e repolho chinês, nanopartículas metálicas ZnONps aplicadas em soja, trigo, arroz e milho; TiO₂Nps em milho e soja; e nanopartículas à base de ferro como FeO₃Nps e nanopartículas de ferro zero valente (nZVINps), em girassol arroz e trigo.

Vale ressaltar que as nanopartículas, em geral, podem ser sintetizadas a partir de diferentes elementos químicos e de maneiras distintas, o que influencia em suas propriedades (da Silva Freitas et al. 2021). As nanopartículas de ferro zero valente (nZVI) são bons adsorventes e suas propriedades eletrônicas (Zou et al. 2021). Elas têm sido produzidas pelo Laboratório de Química da UFV, de maneira não convencional, buscando alternativas para produção das mesmas com menor dano e toxicidade para o meio ambiente fazendo com que possam ser utilizadas em ambientes contaminados. Michálková et al. (2017), utilizando girassol em ambientes contaminados com Cd e utilizando nZVI fim de remediar, demonstrou ser benéfica para o crescimento, porém, diminuiu o acúmulo de metal pesado na planta. Em outro estudo (Guha et al. 2020) estudaram o efeito de nZVI em arroz cultivados em solos contaminados com Cd, e a presença das nZVI resultou em benefício as para plantas, com concentração de Cd maior nos vacúolos, além de uma regulação dos genes da captação de Fe e Cd (Guha et al. 2020).

Neste trabalho buscamos entender se as nanopartículas podem melhorar a resposta ao estresse provocado por Cd em *Lemna valdiviana*, além disso, se a presença de nZVI pode melhorar a capacidade de bioacumulação de Cd para fins de utilização na fitorremediação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Obtenção e aclimação do material vegetal

Espécimes de *Lemna valdiviana* (Araceae) foram coletados no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil) (Figura 1), desinfetadas com hipoclorito de sódio 1%, durante 1 min, lavadas em água corrente, transferidas para solução nutritiva de Clark (1975), ½ força iônica, pH 5,5, e mantidas em sala de crescimento de plantas, com intensidade luminosa, temperatura e fotoperíodo controlados ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 16/8 h claro/escuro), por 3 dias, para aclimação às condições experimentais.

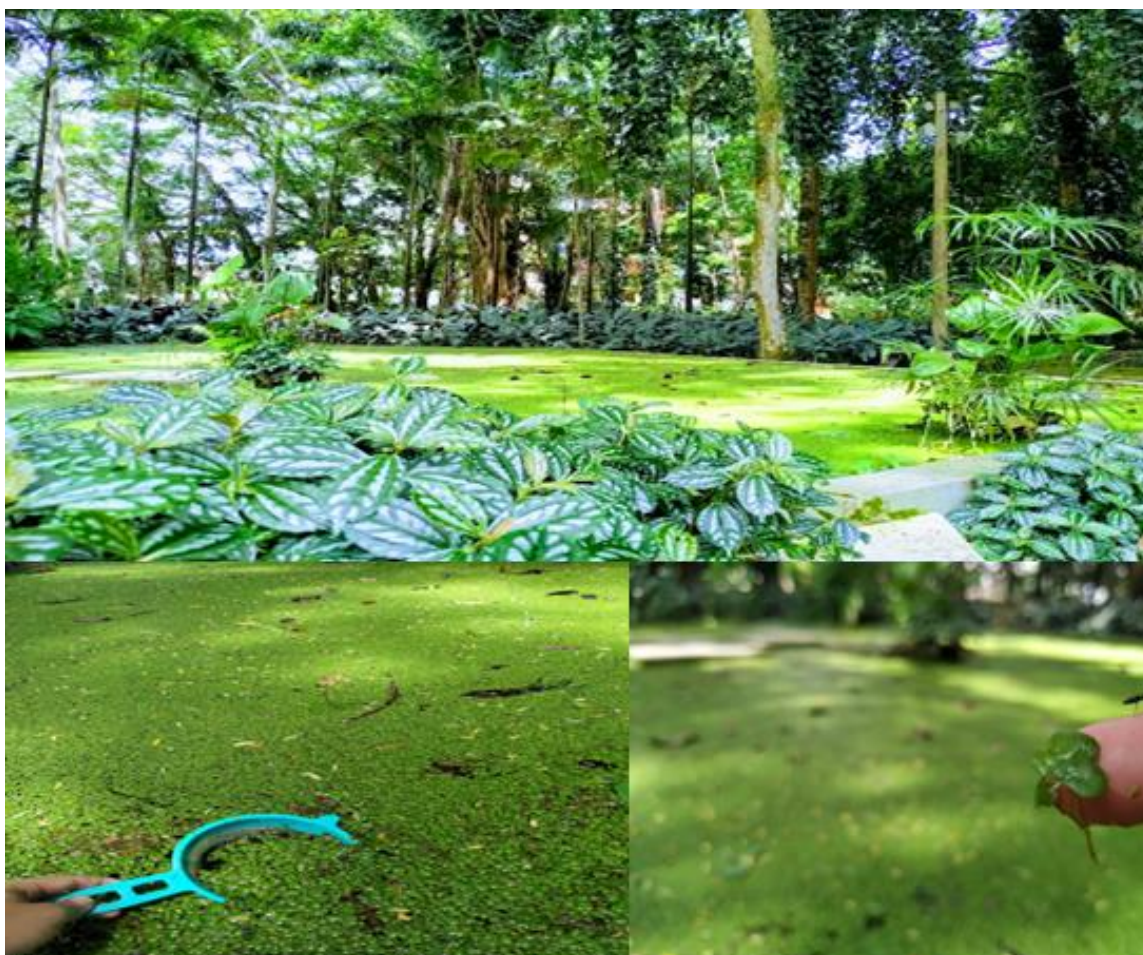


Figura 1. Local de coleta das plantas - Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil)
Fonte: Freitas (2023).

2.2. Síntese das nZVI “verdes”

Os materiais vegetais coletados foram lavados com água deionizada e submetidos à secagem em estufa com renovação/circulação de ar (MARCONI MA 035), a 60 °C, por 3 dias . Em seguida, os materiais secos foram ser moídos em um moinho tipo Wiley (Tecnal TE-680), coletando-se a fração passante pela peneira (malha mesh 30) acoplada ao equipamento e armazenada em dessecador. A amostras desse material foi adicionada água deionizada, para obtenção de concentração equivalente a 60 g L⁻¹, e o sistema mantido em aquecimento a 80 °C, por 1 h, com agitação constante. Em seguida, a suspensão resultante foi peneirada (malha com abertura de 1 mm) e a fração passante submetida à centrifugação (2500 xg), por 5 min. O sobrenadante foi coletado e filtrado à vácuo, utilizando-se papel de filtro qualitativo de celulose, com gramatura de 80 g m⁻², para obtenção do extrato redutor (o filtrado), o qual foi utilizado na reação de síntese das nZVI.

A síntese das nanopartículas de ferro zero valente (nZVI), utilizando redutores obtidos a partir de materiais vegetais (Figura 2), foi realizada conforme a metodologia proposta por Wang et al. (2014), com algumas adaptações. A produção das nZVI ocorreu pela adição do extrato redutor, por gotejamento, a uma solução de FeSO₄ 0,1 mol L⁻¹, na razão volumétrica de 2:1. Durante o procedimento, o sistema reacional esteve sob temperatura ambiente e agitação constante, por meio de um agitador magnético, até esgotar a solução de extrato redutor. A solução resultante, contendo as nZVI em suspensão (concentração teórica de Fe 0,03 mol L⁻¹), foi armazenada sob refrigeração (em torno de 4 °C) até a sua caracterização ou utilização nos experimentos.

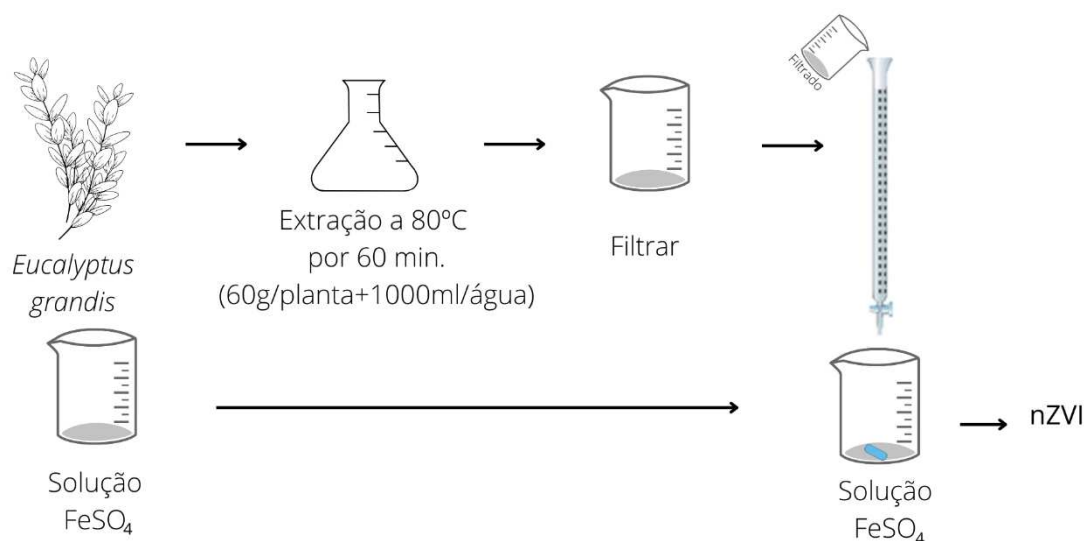


Figura 2. Fluxograma ilustrativo da síntese das nanopartículas de ferro zero valente (nZVI) a partir de uma solução de FeSO_4 e material vegetal (*E. grandis*).

2.3. Aplicação dos tratamentos

Após o período de aclimação, massa fresca de 3 g das plantas foram transferidas para recipientes contendo 0,2 L de solução nutritiva de Clark, nas mesmas condições descritas anteriormente (Figura 3), onde permaneceram por 2 dias nos seguintes tratamentos conforme a tabela abaixo.

Tratamento	Condições
1- Controle	Plantas mantidas apenas em solução nutritiva de Clark
2 - Fe	Solução nutritiva + Fe-EDTA 50 mg/L
3 - nZVI	Solução nutritiva + nZVI 50 mg/L
4 - Cd	Solução nutritiva + nitrato de cádmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,02 mg/L
5 - Cd+Fe	solução nutritiva + nitrato de cádmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,02 mg/L + Fe-EDTA 50 mg/L
6 - Cd+nZVI	solução nutritiva + nitrato de cádmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,02 mg/L + nZVI 50 mg/L

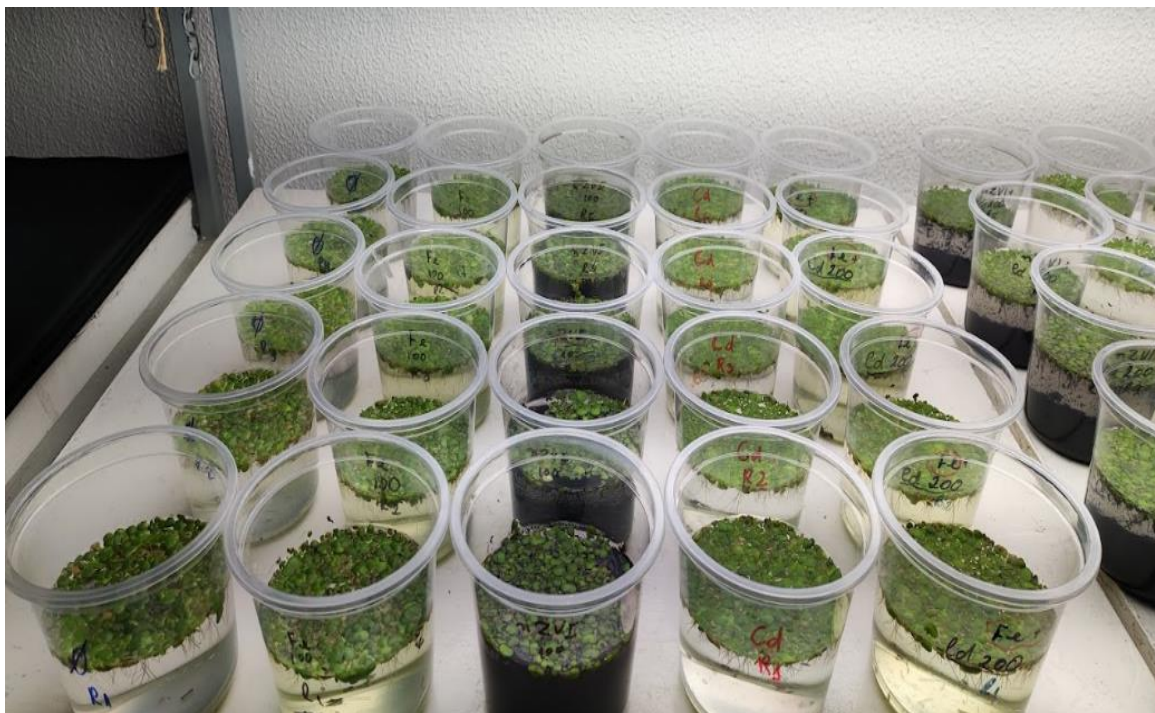


Figura 3. Sala de crescimento de plantas com condições controladas ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 16/8 h claro/escuro).

2.4. Determinação do teor de Fe adsorvido na superfície das raízes e folhas

O material vegetal referente às massas frescas, antes de passarem pelo procedimento de secagem em estufa, foram previamente lavadas com solução extratora contendo 40 mL de citrato de sódio 0,3 M ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 5 mL bicarbonato de sódio 1 M (NaHCO_3) e 3 g de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) por grama de massa fresca para remover óxidos de Fe adsorvidos, conforme a metodologia descrita por Taylor & Crowder (1983).

2.5. Determinação da concentração de Cd e Fe

As plantas foram coletadas, lavadas em água deionizada e secas em estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o peso seco constante. O extrato mineral foi obtido por digestão com mistura ácida nitro-perclórica (2:1) do material vegetal seco (planta inteira) à temperatura máxima de $220 \text{ }^\circ\text{C}$ (Nieniewska e Curtius 1986). Após a digestão, as amostras foram filtradas e completou-se o volume para 25 mL com água desionizada. Depois disso, as amostras foram analisadas usando um espectrofotômetro de absorção atômica (AA-6701F, Shimadzu Corporação).

2.6. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com o método de Hodges et al. (1999). Amostras de 0.15 g foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas com 2 mL do meio de extração constituído de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), seguido de centrifugação a 10.000 xg por 15 min, à 4 °C. Alíquotas do sobrenadante de 0,5 mL, foram adicionadas a 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Uma segunda alíquota de mesmo volume foi adicionada 1,5 mL de solução de TCA 20% sem TBA e, em seguida incubados em banho-maria, à temperatura de 95 °C, por 30min. A reação foi paralisada em banho de gelo, por 10 min, sendo o extrato de centrifugação a 3.000 xg, por 10 min, à 4°C. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a determinação da concentração do complexo aldeído malônico-TB e a absorbância do sobrenadante lida a 532 nm. O valor para absorção não específica em 600 nm e 440 nm foi subtraído, a quantidade de complexo TBARS-TBA (pigmento vermelho) calculada a partir do coeficiente de extinção de 157 mM⁻¹ cm⁻¹ e resultados expressos em nmol g⁻¹ MF.

2.7. Determinação de espécies reativas de oxigênio

Para determinar a concentração de ânion superóxido (O₂^{•-}), amostras de 0.05 g da planta foram adicionadas em 2 mL do meio de extração, constituído de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100 µM, β-nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20 µM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr 2001). Em seguida 100 µL epinefrina 25,2 mM em ácido clorídrico 0,1 N foi adicionado ao extrato para iniciar a reação, seguida da incubação em 28 °C, sob agitação constante por um tempo de 5 min, seguida da leitura na absorvância a 480 nm, também no tempo de 5 min, (Boveris et al. 2002), sendo os resultados serão expressos em µmol g⁻¹ de massa fresca.

Para determinar a concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), amostras de 0,2 g da planta foi adicionada ao meio de extração utilizando tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6.5, contendo hidroxilamina 1 mM, seguido de centrifugadas a 10.000 xg, por 15 minutos, à temperatura de 4 °C (Kuo e Kao 2003). Na sequência, 50 µL do extrato obtido (sobrenadante) foram adicionadas em um meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de

xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki 2000) e mantidas no escuro por 30 minutos, seguida da leitura da absorvância a 560 nm. As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva analítica, sendo resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa fresca.

2.8. Determinação da atividade enzimática antioxidante

2.8.1. Obtenção dos extratos enzimáticos

Amostras de 0,3 g de plantas foram maceradas utilizando nitrogênio líquido e 2 mL do meio de extração, constituído por tampão fosfato de potássio 0,10 M, pH 6,8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,10 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1,0 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Para a APX, o meio de extração foi constituído de tampão fosfato de potássio 50,0 mM, pH 7,0; ascorbato 1,0 mM e EDTA 1,0 mM (Nakano e Asada, 1981). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 12.000 xg, por 15 min a 4 °C, sendo o sobrenadante o extrato bruto para análise da atividade das enzimas dismutase do superóxido, catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato.

2.8.2. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi determinada utilizando 50 μL do extrato enzimático a 5 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM . A reação ocorreu em câmara com iluminação (lâmpada fluorescente de 15 W) à 25 °C e, após 5 min, a iluminação foi interrompida para a realização da leitura, em espectrofotômetro, da absorvância em 560 nm, sendo a atividade expressa em $\text{mmoles min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de proteína, seguindo as metodologias propostas por Giannopolitis e Ries (1977) e Beauchamp e Fridovich (1971).

2.8.3. Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi mensurada utilizando 200 μL do extrato enzimático bruto, adicionado a 2,8 mL do meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM (Havir e Maehly 1987). O decréscimo da

absorvância, no primeiro minuto de reação, foi determinado em espectrofotômetro a 240 nm, à 25 °C utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, conforme Anderson et al. (1995), e a atividade enzimática expressa em $\text{mmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.8.4. Determinação da atividade das peroxidases (POX)

A determinação da atividade das peroxidases consistiu da utilização de extrato bruto enzimático de 200 μL , adicionado a 4,8 mL do meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM (Nakano e Asada, 1981). A produção de purpurogalina na reação foi determinada pelo incremento da absorvância, durante o primeiro minuto de reação, a 420 nm à 25 °C, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, conforme Chance e Maehly (2006) e o resultado expresso em $\text{mmoles min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de proteína.

2.8.5. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de plantas foram homogeneizadas em 2 mL do meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ascorbato 1 mM e EDTA 1 mM (Nakano e Asada 1981).

Para a determinação da atividade da enzima, uma alíquota de 200 μL do extrato bruto foram adicionados a 2,8 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H_2O_2 1 mM. (Nakano e Asada 1981, modificado por Koshiba 1993). O decréscimo na absorvância, a 290 nm à 25°C, foi medido durante o primeiro minuto da reação e a atividade enzimática será calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a atividade enzimática expressa em $\text{mmoles min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de proteína (Nakano e Asada 1981).

2.9. Determinação de proteínas

Para quantificação da concentração de proteínas, usadas para base da atividade enzimática, seguiu-se o método proposto por Bradford (1976). Em 100 μL do extrato enzimático bruto, adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford. Após 20 min de reação no escuro, a absorvância a 595 nm foi determinada e os teores de proteínas foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões de BSA.

2.10. Antioxidantes não enzimáticos ascorbato total e tióis totais

2.10.1. Ascorbato total

Na determinação da concentração de ascorbato total, amostras de 0,3 g de massa fresca de planta, coletadas após 3 horas do reestabelecimento do período luminoso, foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6% (p/v), centrifugadas a 15000 xg, por 5 min, a 4 °C. À alíquota de 200 µL do sobrenadante adicionaram-se 400 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4 e 200 µ de DTT. A mistura ficou em repouso, por 15 min, antes de ser acrescida de 200 µL de N-etilmaleimida 0,5% (p/v), 1 mL de TCA 10% (p/v), 800 µL de ácido fosfórico 42 % (v/v), 800 µL de 2-dipiridil 4% (p/v) e 400 µL de cloreto de ferro (III) 3% (p/v). Após agitação vigorosa e incubação a 42 °C, por 45 min, a reação foi paralisada em banho de gelo e a absorvância determinada a 525 nm (Kampfenkel et al. 1995). Os teores de ascorbato total foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos de ascorbato, tendo sua concentração expressa em µmol de AA g⁻¹ MF.

2.10.2. Compostos Tiolados

Amostras de 150 mg, de folhas e raízes, foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de meio de extração constituído de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 1 mM e ácido ascórbico 1% (p/v), seguido de centrifugação a 10000 xg, por 10 min, a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para determinação de tióis totais e não proteicos.

Para tióis totais, alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram adicionadas a 750 µL de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,2, 50 µL do reagente de Ellman [ácido 5,5' – ditio-bis (2- nitrobenzóico)] 0,01 M e 3,95 mL de metanol (Sedlak e Lindsay, 1968). Após 15 min de reação a 37 °C, a absorvância foi determinada a 412 nm e, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar 13100 M⁻¹, foi calculado o teor de tióis totais e os resultados expressos em µmol de SH g⁻¹ MF.

Para determinação dos tióis não-proteicos, alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) e

0,8 mL de H₂O desionizada, seguido de centrifugação a 10000 xg, durante 15 min. Às alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionados 2 mL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e 50 µL de reagente de Ellman 0,01 M. Após 5 min à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 412 nm e, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 13100 M⁻¹, calculou-se o teor de tióis não-proteicos, sendo os resultados expressos em µmol de SH g⁻¹ MF (Sedlak e Lindsay, 1968).

2.11. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo 6 tratamentos com 4 repetições, e cada unidade experimental constituída de 3 g de massa fresca de plantas/repetição. Os dados de natureza paramétrica e os dados paramétricos, obtidos após transformações pelo modelo da família Box-Cox, foram avaliadas estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico R (R CORE TEAM, 2016). Os dados que não atenderam os requisitos para a ANOVA foram avaliados por modelo boxplot.

3. RESULTADOS

3.1 Adsorção de ferro e absorção de cádmio e ferro

Para o metal ferro (Fe), na forma de placa aderida na superfície da planta, foram observados maiores valores de distribuição de dados nos tratamentos nZVI e nZVI+Cd (Figura 4). Nestes tratamentos, as concentrações de Fe desorvidos da superfície da planta ultrapassaram valores de 4 ppm na solução de desorção, em pelo menos 50% dos dados analisados, e indicam que a placa de Fe possui maiores tendências de concentração quando a planta é submetida a este elemento na forma de nanopartícula.

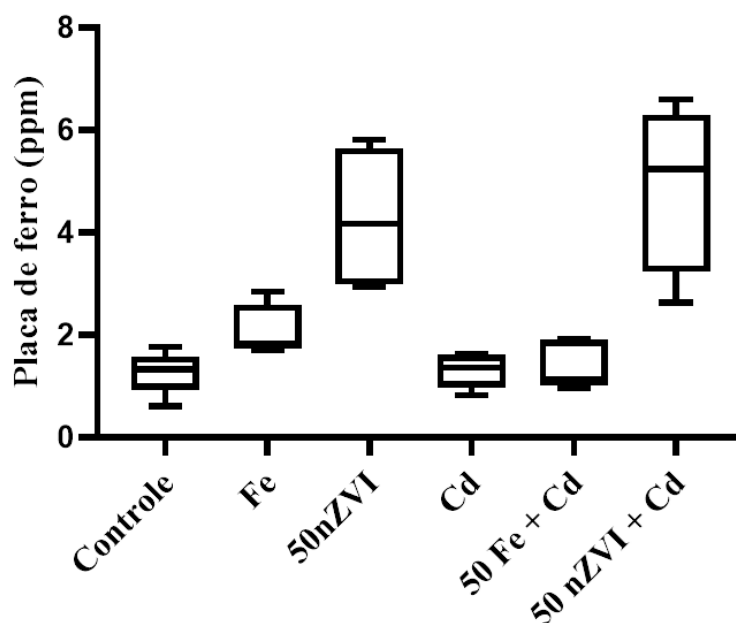


Figura 4. Concentração de ferro na solução de desorção de ferro adsorvido às raízes e folhas de plantas de *L. valdiviana*, expostas a tratamentos com Fe iônico e nanoparticulado (nZVI), por 48 horas. No diagrama de caixas (boxplot), linhas pretas horizontais no centro da caixa representam a mediana; as caixas estendem-se do 25º ao 75º percentil da distribuição de valores de cada grupo; linhas verticais que se estendem denotam valores adjacentes (ou seja, os valores mais extremos dentro da faixa interquartil 1,5 do 25º e 75º percentil de cada grupo).

A maior concentração de Fe adsorvido pôde ser constatada, inclusive, pela análise visual como observado na (Figura 5) em que as raízes e folhas apresentaram coloração escura, característico da presença das nanopartículas.



Figura 5. Observação da formação da placa de ferro formada em plantas de *L. valdiviana*, expostas a tratamentos com Fe iônico e nanoparticulado (nZVI), por 48 horas, ferro adsorvido às raízes e folhas.

Os dados obtidos para a avaliação da exposição de *L. valdiviana* aos metais cádmio (Cd) e Fe (interno e externo a planta) indicaram distribuição não normal e variâncias não homogêneas, dois fatores necessários para o uso da análise de variância e testes de média. Uma vez que a presença de resultados não detectáveis (de valor zero) impossibilitaram a transformação dos dados, utilizou-se o modelo boxplot para representar e avaliar esses dados.

Para o metal Cd, as maiores tendências de distribuição de dados referentes aos teores deste elemento na planta, ocorreram para os tratamentos em que foram aplicados, conjuntamente, Cd e Fe, na forma iônica e de nanopartículas (Figura 6 A). Destaca-se que os nesses tratamentos, os valores obtidos estiveram acima de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca da planta em 75 e 50% dos dados dos tratamentos contendo Fe na forma salina (Fe + Cd) e de nanopartícula (nZVI+Cd), respectivamente. Esses resultados podem indicar que uma maior remoção de Cd pode ser favorecida pela presença do elemento Fe na solução.

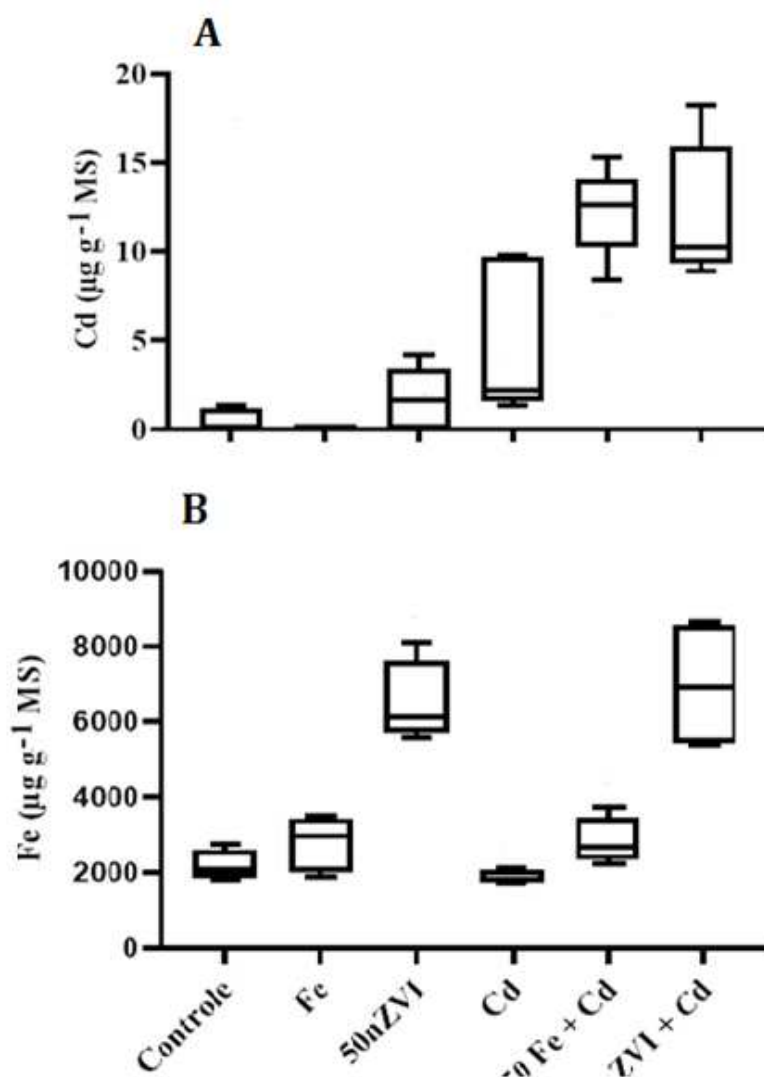


Figura 6. Concentração de Fe (A) e Cd (B) nas plantas de *Lemna valdiviana*, após 48 h de exposição aos tratamentos com Fe, nZVI, Cd, Fe + Cd, nZVI + Cd. No diagrama de caixas (boxplot), linhas pretas horizontais no centro da caixa representam a mediana; as caixas estendem-se do 25º ao 75º percentil da distribuição de valores de cada grupo; linhas verticais que se estendem denotam valores adjacentes (ou seja, os valores mais extremos dentro da faixa interquartil 1,5 do 25º e 75º percentil de cada grupo).

As maiores tendências da distribuição de dados de acúmulo de Fe na planta foram observadas nos tratamentos de Fe na forma de nanopartícula (nZVI e nZVI+Cd), com pelo menos 50% da distribuição dos valores nesses tratamentos acima dos 6000 µg g⁻¹ MS (Figura 6 B). Os demais tratamentos com exposição da planta ao Fe na forma salina (Fe e Fe+Cd) obtiveram menores tendências de distribuição de dados e medianas abaixo de 4000 µg g⁻¹ MS. Esses resultados indicam que as plantas de *L. valdiviana* absorvem mais eficientemente o elemento ferro na forma nanoparticulada.

A presença de Fe, nas duas formas químicas, resultou em tendência de maior acúmulo de Cd nas plantas, comparados com o tratamento contendo Cd isoladamente (Figura 5A). Por sua vez, a presença do Cd nos tratamentos contendo Fe iônico não interferiu na absorção desse nutriente pelas plantas, da mesma forma que ocorreu nos tratamentos com nZVI (Figura 5B). Fica evidente, dessa forma, a interferência do Fe na absorção do Cd, mas o Cd não interfere na absorção de Fe.

3.2. Peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio

Plantas submetidas ao Cd apresentaram as maiores concentrações do biomarcador de peroxidação lipídica (MDA), tanto em presença de Fe iônico quanto de nanopartículas (Figura 7A). Todavia, é possível evidenciar que as Znvi apresentaram tendência de atenuar os danos tóxicos do Cd, comparativamente aos tratamentos com Fe + Cd.

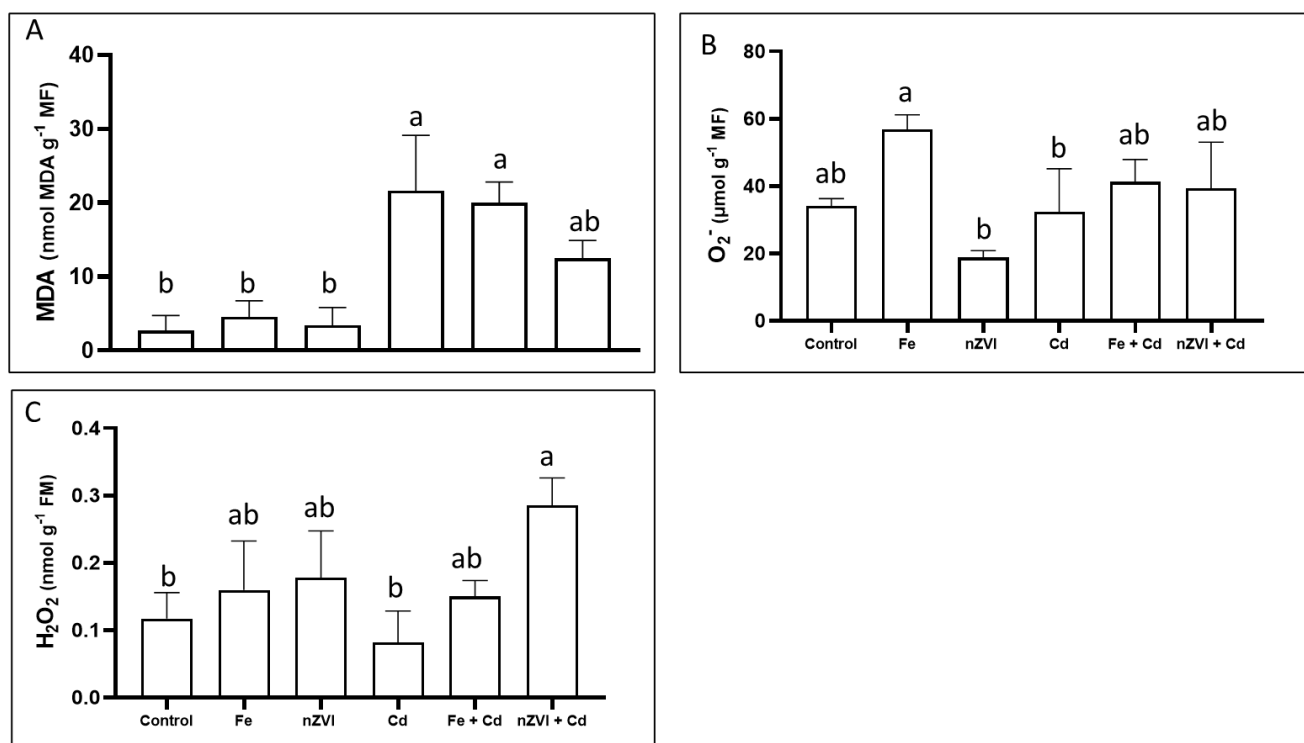


Figura 7. Concentração de malondialdeído (MDA) (A), ânion superóxido (B) e peróxido de hidrogênio (C) em *Lemna valdiviana*, após 48 h de exposição aos tratamentos: controle, Fe, Nzvi, Cd, Fe + Cd, Nzvi + Cd. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Os agentes causadores de peroxidação lipídica, representados pelas concentrações do radical O₂⁻ (Figura 7B) e peróxido de hidrogênio (Figura 7C), não

tiveram alteração significativa entre os tratamentos, de forma que pudessem evidenciar a participação nos danos às membranas. Vale ressaltar, entretanto, que essas concentrações expressam uma condição momentânea, enquanto que a concentração de MDA expressa um dano relativamente mais persistente.

3.3. Sistema antioxidante enzimático

A atenuação dos danos tóxicos de um agente poluente envolve a participação de um pool de enzimas antioxidantes representadas, dentre outras, pela dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POX) e peroxidase do ascorbato (APX).

A atividade da SOD manteve-se sem alterações significativas, independente dos tratamentos contendo Cd, indicando que, possivelmente, essa enzima não teve participação efetiva em evitar os efeitos do estresse oxidativo (Figura 8A). Corroborando esses resultados, observa-se a relação da atividade dessa enzima com as concentrações de superóxido e peróxido de hidrogênio.

A atividade da CAT manteve atividade igual ao controle apenas no tratamento Fe iônico nos demais tratamentos houve um aumento da atividade, nota-se que o aumento da atividade nos tratamentos nZVI, Fe +Cd e nZVI + Cd correlaciona com seu substrato H_2O_2 que, estatisticamente, se encontram mais elevados (Figura 8B). Especialmente no tratamento nZVI + Cd observa-se a maior atividade dessa enzima, indicando o papel atenuador de danos oxidativos, conforme relacionado com o biomarcador MDA. A atividade antioxidante da POX (Figura 8C) aumentou, principalmente, nos tratamentos na presença da nanopartícula, porém, também se observa um aumento no tratamento Fe+ Cd, o qual não é observado quando os tratamentos foram aplicados isolados.

A atividade da APX (Figura 8D) foi maior no controle, comparativamente a todos os demais tratamentos, independente da presença de Cd ou de Fe, na forma iônica ou de nanopartículas. Essa enzima tem uma função bastante específica em termos de substrato, o que pode ter afetado a sua atividade, conforme demonstrado com os dados de concentração de ascorbato, os quais tiveram apenas pequenas alterações entre os diversos tratamentos.

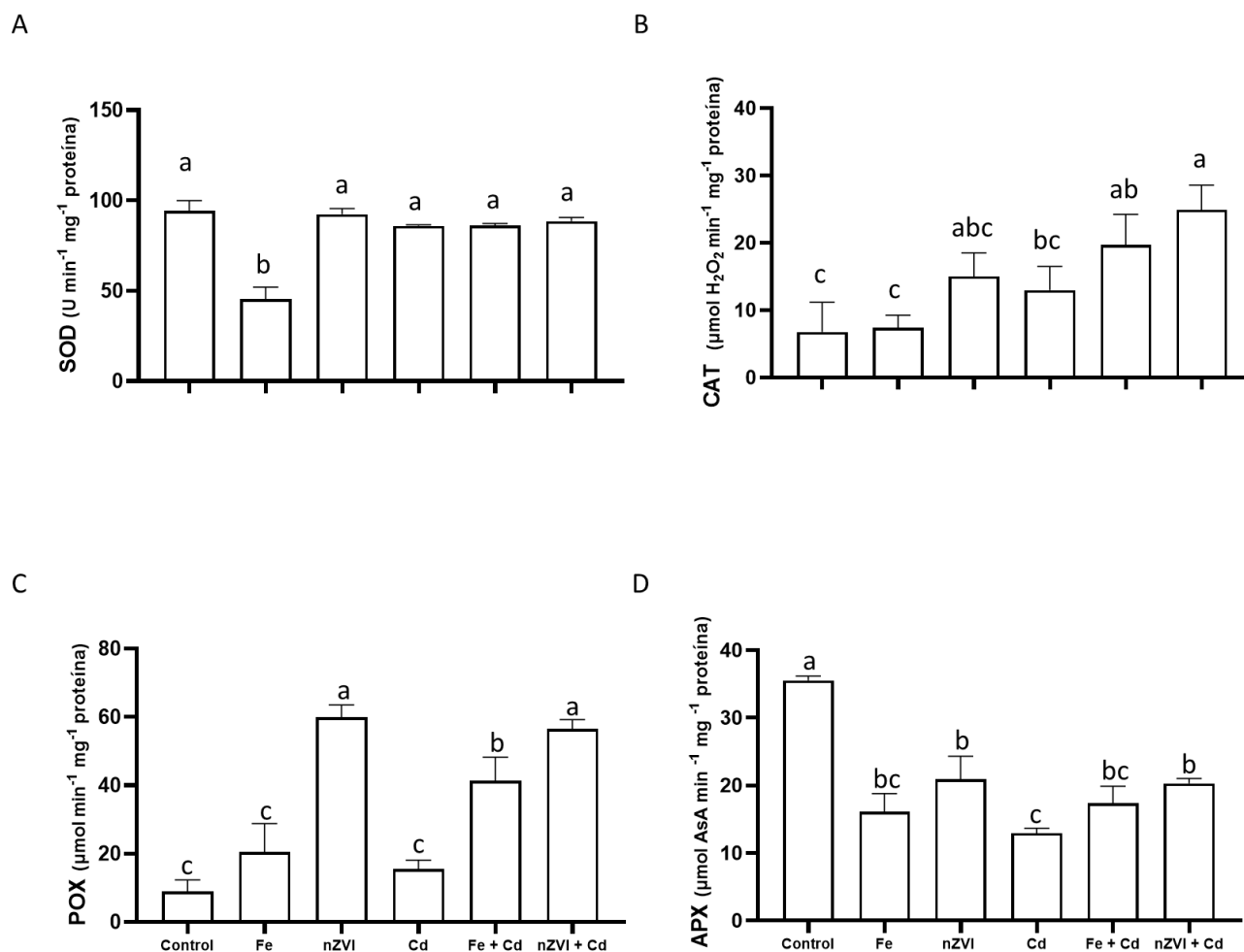


Figura 8. Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) **(A)**, catalase (CAT) **(B)**, peroxidases (POX) **(C)** e peroxidase do ascorbato (APX) **(D)** em plantas de *Lemna valdiviana*, após 48 h de exposição aos tratamentos: controle, Fe, nZVI, Cd, Fe + Cd, nZVI + Cd. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

3.4. Antioxidantes não enzimáticos: ascorbato e tióis

Os teores de ascorbato total tiveram pequenas alterações entre os tratamentos, o que não é suficiente para explicar o papel e a participação dessa substância como um agente antioxidante (Figura 9A). Os tratamentos contendo Fe, Cd e nZVI, de forma isolada ou em conjunto, apresentaram os maiores teores de tióis. Maiores tendências, contudo, foram observadas nos tratamentos com nZVI, em presença ou não de Cd (Figura 9B).

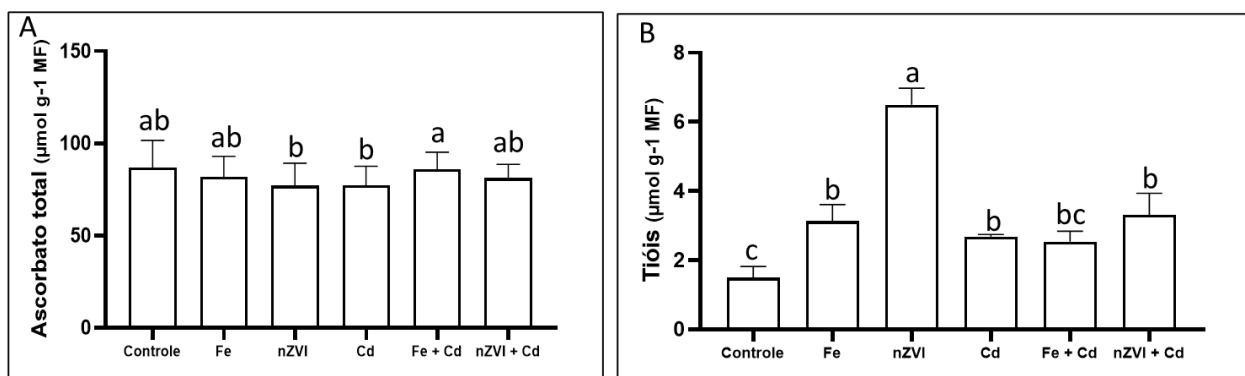


Figura 9. Concentração de ascorbato (A) e de tióis totais (B) em *Lemna valdiviana*, após 48 h de exposição aos tratamentos: controle, Fe, nZVI, Cd, Fe + Cd, nZVI + Cd. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

4. DISCUSSÃO

A absorção de Fe, por meio de transportadores, pode estar envolvida com a absorção de Cd (Nakanishi et al. 2006; Takahashi et al. 2011; Bashir et al. 2014; Huang et al. 2018), evidenciando que o Cd não é absorvido por um transportador específico em plantas. Essa absorção pode ocorrer pelas mesmas vias utilizadas na aquisição de nutrientes, como proteínas canais de transporte de cátions, ATPases de metais potencialmente tóxicos, transportadores regulados por zinco e proteínas semelhantes a transportadoras reguladas por Fe (Bari et al. 2019; Zou et al. 2023).

A presença de agentes quelantes, como o EDTA, aumentam a absorção de Fe, e isso está relacionado, também, à maior absorção de Cd, tanto para o Fe na forma iônica como em nanopartículas (Tananonchai et al. 2023). Experimento conduzido com arroz mostrou que o uso de nZVI resultou em diminuição da expressão gênica de transportadores de Fe, mas ocorreu aumento de genes responsáveis pelo sequestro do Cd para os vacúolos (Guha et al. 2020). Dessa forma, é possível inferir que, apesar de ocorrer elevação da concentração de Cd no meio celular, isso não reflete em maior intensidade de dano biológico, uma vez que este elemento pode estar sendo transportado para o vacúolo.

A presença de Fe em concentrações elevadas, ou mesmo na forma de nanopartículas, resulta na formação de uma camada de material adsorvido nas raízes denominada placa de Fe, especialmente no tratamento com nZVI, a qual adsorve, também, em maior proporção o cádmio e, com isso, pode corroborar para uma maior absorção desse elemento (Huang et al. 2018).

Geralmente, a toxicidade do Cd em plantas está relacionada à redução do crescimento, amarelecimento, murcha e enrolamento das folhas (Prasad 1999; Jiao et al. 2012; Kabir et al. 2016; Bari et al. 2019). Entretanto, tais evidências não foram possíveis de serem detectadas no período experimental realizado, em virtude do curto período de exposição. As reações bioquímicas e fisiológicas, por sua vez, ocorrem de forma imediata, quando as plantas são expostas aos agentes poluentes, resultando em alterações no metabolismo que, num período maior de tempo, resultarão em efeitos mensuráveis do crescimento. Ainda assim, é possível inferir que o Fe nanoparticulado, além de colaborar no processo de absorção de Cd, pode compensar os danos por aumentar a taxa fotossintética, resultando na manutenção desses parâmetros similares ao tratamento controle (Kataria et al. 2019).

O Cd, apesar de não causar diretamente a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS), como ocorre com o Fe na reação de Haber-Weiss (Mahmud et al. 2018), é capaz de alterar o metabolismo em diversos níveis e, em se tratando de ação oxidativa indireta, atua afetando a cadeia transportadora de elétrons, tanto da fotossíntese como da respiração, além de ter efeito inibitório na formação de açúcares e proteínas (Muneer et al. 2014; Roy et al. 2016; Bari et al. 2019). Essas alterações podem resultar na formação de ROS, os quais irão oxidar estruturas celulares, como os lipídeos presente nas membranas, proteínas e DNA (Rascio e Navarri-Izzo, 2011).

Um dos principais danos da ação tóxica do Cd é a peroxidação lipídica, detectada por meio da análise de MDA (Bari et al. 2019). Esses efeitos tóxicos podem ser reduzidos com o suprimento de Fe na forma nZVI, evidenciando o papel das nanopartículas de Fe na mitigação da toxicidade de Cd, conforme relatado por Guha et al. (2020). A ação protetora das nanopartículas pode estar associada à redução na geração de ROS ou pela ativação da ação do sistema antioxidante, por meio da ação enzimática ou pela síntese de compostos antioxidantes. A redução de apenas um dos componentes envolvidos na toxicidade por ROS, conforme relatado por Bari et al. (2019), já é capaz de promover um efeito mitigador de dano na planta.

O sistema antioxidante enzimático e não enzimático atuam diretamente sobre as ROS, mitigando as situações de estresse oxidativo (Kabir et al. 2016). Apesar desses componentes oxidantes atuarem, em diversas etapas metabólicas, como importantes moléculas sinalizadoras (Zhou et al. 2021), em situações de desequilíbrio em nível celular, como ocorre em condições de exposição a agentes poluentes, podem ser prejudiciais, provocando danos às membranas e outros componentes celulares. Com isso, além de analisar diretamente as concentrações das ROS, se faz importante uma análise dos componentes responsáveis por atenuar a concentração excessiva, tanto o sistema enzimático, quanto o não enzimático (Bari et al. 2019).

Os principais componentes protetores da ação oxidante dos produtos gerados durante a exposição ao Cd são as enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APX), e do sistema não enzimático são os compostos tiolados e o ascorbato (Dat et al. 2000).

A suplementação de Fe (nZVI) e de outros componentes minerais, na forma de nanopartículas, tem resultado em aumento a atividade da enzima SOD (Michálková et al. 2017; Ghua et al. 2020; Li et al. 2014; Rizwan et al. 2019; Lian et al. 2020). No presente trabalho, entretanto, a atividade dessa enzima não foi responsiva, de forma

significativa, à presença do Cd e de nanopartículas de Fe. A enzima CAT, por sua vez, apresentou aumento da atividade no tratamento com nZVI, em consonância com Ghua et al. (2018) e demais trabalhos supracitados.

A maior atividade da enzima POX nos tratamentos contendo nZVI, em presença ou não de Cd, possivelmente está relacionada ao maior acúmulo de Fe no meio celular, o qual pode ter ativado respostas de proteção celular à elevada concentração desse elemento. Embora em menor intensidade, houve também, incremento na atividade dessa enzima no tratamento contendo Fe iônico e Cd, conforme observado por Irshad et al. (2020). O tratamento apenas Cd não apresentou diferença estatística em relação ao controle, portanto, podemos sugerir que as fontes de ferro, e principalmente a nanopartícula, induziu o aumento da atividade desta enzima (Micháľková et al. 2017).

A enzima APX, que catalisa a degradação do H_2O_2 utilizando ascorbato e glutatona reduzida (Cuypers et al. 2011), não teve a atividade alterada nos diversos tratamentos com Fe e Cd, apresentando valores menores dos aqueles observados nas plantas do controle. Em várias situações de estresse por metais potencialmente tóxicos essa enzima tem sua atividade aumentada, conforme relatado por Ali et al. (2002). De certa forma, esse resultado está em consonância com as concentrações de H_2O_2 nos tratamentos com fontes de Fe. Adicionalmente, essa enzima é capaz de atuar diretamente na remoção de ROS, por meio dos seus agrupamentos sulfidrílica (Noctor et al. 2012), e, juntamente com a CAT, se constituem nos principais mecanismos enzimáticos de degradação de H_2O_2 (Cuypers et al. 2016). De outra forma, a manutenção inalterada da atividade da enzima APX nos diversos tratamentos indica que o ascorbato não se constituiu em componente antioxidante nesse processo, uma vez que as concentrações se mantiveram similares ao controle, diferente de situações de estresse por Cd, conforme relatado por Lu et al. (2019).

Os compostos tiolados tem participação efetiva na manutenção de elevadas concentrações celulares de Cd e outros metais, sem que isso resulte em danos celulares. Evidências dessa participação estão descritas em pesquisas que associam a maior retenção de Cd nas raízes das plantas com a maior concentração de compostos tiolados (Liang et al. 2014). Assim, o aumento na concentração destes compostos nos tratamentos com Fe, iônico e nanoparticulado, está relacionado à quelatção do Cd absorvido, evitando danos celulares. Adicionalmente, podemos inferir que o Fe, especialmente na forma de nanopartículas, pode ter aumentado a

expressão de genes envolvidos na assimilação de enxofre com a presença de Cd (Harada et al., 2002; Herbette et al. 2006; Ernst et al., 2007; Liang et al., 2014), potencializando a síntese de compostos tiolados, especialmente compostos de glutathiona e fitoquelatinas.

5. CONCLUSÕES

Plantas da espécie *Lemna valdiviana* cultivadas em presença de Cd e de Fe, na forma salina e de nanopartículas, acumularam maiores concentrações de Cd sem, contudo, aumentar os danos celulares em comparação ao tratamento com Cd de forma isolada. Há que se considerar, entretanto, que se faz necessário observar os efeitos em uma escala temporal maior, pois ocorreu aumento das concentrações de MDA e de ROS, em comparação com as plantas controle. Isso, num período de exposição maior, pode alterar mais severamente o metabolismo das plantas.

De modo geral, podemos concluir que o sistema antioxidante enzimático atuou para mitigar os danos oxidativos e que a suplementação com Fe, em ambas formas químicas, pode resultar em ações benéficas para a fitorremediação de áreas contaminadas por Cd.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. B.; CHUN, H. S.; KIM, B. K.; LEE, C. B. (2002). Cadmium-induced changes in antioxidant enzyme activities in rice (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin). **Journal of Plant Biology**, v. 45, p. 134-140. <https://doi.org/10.1007/bf03030305>
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. (1995). Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. **Plant physiology**, v. 109, n. 4, p. 1247-1257, 1995. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247>
- BARI, M. A.; AKTHER, M. S.; REZA, M. A.; KABIR, A. H. (2019). Cadmium tolerance is associated with the root-driven coordination of cadmium sequestration, iron regulation, and ROS scavenging in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 136, p. 22-33. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.007>
- BASHIR, K.; HANADA, K.; SHIMIZU, M.; SEKI, M.; NAKANISHI, H., & NISHIZAWA, N. K. (2014). Transcriptomic analysis of rice in response to iron deficiency and excess. **Rice**, v. 7, p. 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12284-014-0018-1>
- BEAUCHAMP, C. and FRIDOVICH, I. (1971) Superoxide Dismutase Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287. www.scrip.org. Retrieved March 13,2023
- BOVERIS, A.; ALVAREZ, S.; BUSTAMANTE, J.; VALDEZ, L. (2002). Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. In: **Methods in enzymology**. **Academic Press**, p. 280-287. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)49342-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)49342-1)
- BRADFORD, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- COELHO, D. G.; DA SILVA, V. M.; GOMES FILHO, A. A. P.; OLIVEIRA, L. A.; DE ARAÚJO, H. H.; FARNESE, F. D. S.; ARAÚJO, W. L.; DE OLIVEIRA, J. A. (2023). Bioaccumulation and physiological traits qualify *Pistia stratiotes* as a suitable species for phytoremediation and bioindication of iron-contaminated water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 446, p. 130701. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130701>
- COELHO, D. G.; DE ANDRADE, H. M.; MARINATO, C. S.; ARAUJO, S. C.; DE MATOS, L. P.; DA SILVA, V. M.; DE OLIVEIRA, J. A. (2020). Exogenous jasmonic acid enhances oxidative protection of *Lemna valdiviana* subjected to arsenic. **Acta physiologiae plantarum**, v. 42, p. 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03086-0>
- COELHO, D. G.; MARINATO, C. S.; DE MATOS, L. P.; DE ANDRADE, H. M.; DA SILVA, V. M.; SANTOS-NEVES, P. H.; ARAÚJO, S. C.; OLIVEIRA, J. A. (2020). Is arsenite more toxic than arsenate in plants? **Ecotoxicology**, v. 29, p. 196-202.

<https://doi.org/10.1007/s10646-019-02152-9>

CUI, Z. G.; AHMED, K.; ZAIDI, S. F.; MUHAMMAD, J. S. (2021). Ins and outs of cadmium-induced carcinogenesis: Mechanism and prevention. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 27, p. 100372. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100372>

CURTIUS, J. N., A. J. (1986). Determinação de Arsênio em Plantas por Geração de Hidreto e Absorção Atômica. **Química Nova**, v. 9, p. 194-197. https://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=5541

CUYPERS, A.; HENDRIX, S.; AMARAL DOS REIS, R.; DE SMET, S.; DECKERS, J.; GIELEN, H.; JOZEF CZAK, M.; LOIX, C.; VERCAMPT, H.; VANGRONSVELD, J.; KEUNEN, E. (2016). Hydrogen Peroxide, Signaling in Disguise during Metal Phytotoxicity. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00470>

CUYPERS, A.; KEUNEN, E.; BOHLER, S.; JOZEF CZAK, M.; OPDENAKKER, K.; GIELEN, H.; VERCAMPT, H.; BIELEN, A.; SCHELLINGEN, K.; VANGRONSVELD, J.; REMANS, T. (2011). Cadmium and copper stress induce a cellular oxidative challenge leading to damage versus signalling. In: **Metal toxicity in plants: perception, signaling and remediation**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 65-90. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22081-4_4

EMMANUEL, S. S.; ADESIBIKAN, A. A.; SALIU, O. D.; OPATOLA, E. A. (2023). Greenly biosynthesized bimetallic nanoparticles for ecofriendly degradation of notorious dye pollutants: A review. **Plant Nano Biology**, v. 3, p. 100024. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2023.100024>

ERNST, W. H. O.; KRAUSS, G.-J.; VERKLEIJ, J. A. C.; WESENBERG, D. (2007). Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. **Plant, Cell Environment**, v. 31, n. 1, p. 123-143 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01746.x>

GABRIELE, I.; RACE, M.; PAPIRIO, S.; ESPOSITO, G. (2021). Phytoremediation of pyrene-contaminated soils: A critical review of the key factors affecting the fate of pyrene. **Journal of Environmental Management**, v. 293, p. 112805. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112805>

GAY, C.; GEBICKI, J. M. (2000). A Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric–Xylenol Orange Hydroperoxide Assay. **Analytical biochemistry**, v. 284, n. 2, p. 217-220. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>

GUHA, T.; BARMAN, S.; MUKHERJEE, A.; KUNDU, R. (2020). Nano-scale zero valent iron modulates Fe/Cd transporters and immobilizes soil Cd for production of Cd free rice. **Chemosphere**, v. 260, p. 127533.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127533>

HARADA, E.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; HIROSHI, S. (2002). Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in Arabidopsis. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 4, p. 445-448. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00733>

HERBETTE, S.; TACONNAT, L.; HUGOUVIEUX, V.; PIETTE, L.; MAGNIETTE, M.-L. M.; CUINE, S.; AUROY, P.; RICHAUD, P.; FORESTIER, C.; BOURGUIGNON, J.; RENOU, J.-P.; VAVASSEUR, A.; LEONHARDT, N. (2006). Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1751-1765. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.04.018>

HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>

HU, J.; SEDKI, M.; SHEN, Y.; MULCHANDANI, A.; GAO, G. (2021). Chemiresistor sensor based on ion-imprinted polymer (IIP)-functionalized rGO for Cd (II) ions in water. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 346, p. 130474. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130474>

HUANG, R.-Z.; JIANG, Y.-B.; JIA, C.-H.; JIANG, S.-M.; YAN, X.-P. (2018). Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Morus alba* L. **International journal of phytoremediation**, v. 20, n. 5, p. 448-453. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1365344>

IRSHAD, M. K.; NOMAN, A.; ALHAITHLOUL, H. A.; ADEEL, M.; RUI, Y.; SHAH, T.; SHANG, J. (2020). Goethite-modified biochar ameliorates the growth of rice (*Oryza sativa* L.) plants by suppressing Cd and As-induced oxidative stress in Cd and As co-contaminated paddy soil. **Science of The Total Environment**, v. 717, p. 137086.

JIAO, Y.; WEI, G.; RONG, Q.; SUN, B.; JIANG, W.; LIU, D. (2012). Influence of cadmium stress on growth, ultrastructure and antioxidative enzymes in *Populus 2025*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 21, n. 6, p. 1375-1384. <https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=ae2f92814b2d04c443f3b1179faeeb78>

KABIR, A. H.; HOSSAIN, M. M.; KHATUN, M. A.; SARKAR, M. R.; HAIDER, S. A. (2017). Biochemical and molecular mechanisms associated with Zn deficiency tolerance and signaling in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 447-456. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900440516>

KAMPFENKEL, K.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**, v. 225, n. 1, p. 165-167. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1127>

KATARIA, S.; JAIN, M.; RASTOGI, A.; ŽIVČÁK, M.; BRESTIC, M.; LIU, S.; TRIPATHI,

D. K. (2019, January 1). Chapter 6 - Role of nanoparticles on photosynthesis: avenues and applications. In: **Nanomaterials in plants, algae and microorganisms**. Academic Press, 2019. p. 103-127. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128114889000068>

KIRAN, BHARTI R.; SHARMA R. **Effect of heavy metals: An overview**. **Materials Today: Proceedings**, v. 51, p. 880-885. doi.org/10.1016/j.matpr.2021.06.278

KOSHIBA, T. (1993). Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 713-721. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP9501695>

KUO, M. C.; & KAO, C. H. (2003). Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Rice Leaves. **Biologia plantarum**, v. 46, p. 149-152. <https://doi.org/10.1023/a:1022356322373>

LI, Z.; & HUANG, J. (2014). Effects of Nanoparticle Hydroxyapatite on Growth and Antioxidant System in Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) from Cadmium-Contaminated Soil. **Journal of Nanomaterials**, v. 2014. <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2014/470962/>

LIAN, J.; ZHAO, L.; WU, J.; XIONG, H.; BAO, Y.; ZEB, A.; TANG, J.; LIU, W. (2020). Foliar spray of TiO₂ nanoparticles prevails over root application in reducing Cd accumulation and mitigating Cd-induced phytotoxicity in maize (*Zea mays* L.). **Chemosphere**, v. 239, p. 124794. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124794>

LIANG, J.; SHOHAG, M. J. I.; YANG, X.; TIAN, S.; ZHANG, Y.; FENG, Y.; HE, Z. (2014). Role of sulfur assimilation pathway in cadmium hyperaccumulation by *Sedum alfredii* Hance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 100(100), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.026>

MAEHLY, A. C. (2006). The Assay of Catalases and Peroxidases. **Methods Biochem Anal**, v. 1, p. 357-424. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>

MARTINELLI, G. (2007). Mountain biodiversity in Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 4, p. 587. https://www.academia.edu/7545939/Mountain_biodiversity_in_Brazil

MICHÁLKOVÁ, Z.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, D.; KOMÁREK, M. (2017). Interactions of two novel stabilizing amendments with sunflower plants grown in a contaminated soil. **Chemosphere**, v. 186, p. 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.009>

MOHAMMADI, M.; & KARR, A. L. (2001). Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 8, p. 1023-1029. [https://doi.org/10.1078/s0176-1617\(04\)70126-1](https://doi.org/10.1078/s0176-1617(04)70126-1)

MOULIS, J.-M.; & THÉVENOD, F. (2010). New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. **Biometals**, v. 23, p. 763-768. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9365->

MUNEER, S.; HAKEEM, K. R.; MOHAMED, R.; LEE, J. H. (2014). Cadmium toxicity induced alterations in the root proteome of green gram in contrasting response towards iron supplement. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6343-6355. <https://doi.org/10.3390/ijms15046343>

NAKANISHI, H.; OGAWA, I.; ISHIMARU, Y.; MORI, S.; NISHIZAWA, N. K. (2006). Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 464-469. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2006.00055.x>

NAKANO, Y.; & ASADA, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP8205453>

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; CHAOUCH, S.; HAN, Y.; NEUKERMANS, J.; MARQUEZ-GARCIA, B.; QUEVAL, G.; FOYER, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 2, p. 454-484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANTÁNNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. (1999). 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. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR20000034125>

PERŠIĆ, V.; ĐERĐ, T.; VARGA, M.; HACKENBERGER, B. K. (2019). Real-time CO₂ uptake/emission measurements as a tool for early indication of toxicity in Lemna-tests. **Aquatic Toxicology**, v. 206, p. 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.013>

PRASAD, M. N. V.; & HAGEMEYER, J. (1999). Heavy Metal Stress in Plants. **Springer Berlin Heidelberg**. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0>

RASCIO, N.; & NAVARI-IZZO, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?. **Plant Science**, v. 180(2), p. 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>

RIZWAN, M.; ALI, S.; ALI, B.; ADREES, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, A.; ZIA UR REHMAN, M.; WARIS, A. A. (2019). Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. **Chemosphere**, v. 214, p. 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.120>

ROY, S. K.; CHO, S.-W.; KWON, S. J.; KAMAL, A. H. M.; KIM, S.-W.; OH, M.-W.; LEE, M.-S.; CHUNG, K.-Y.; XIN, Z.; WOO, S.-H. (2016). Morpho-Physiological and Proteome Level Responses to Cadmium Stress in Sorghum. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0150431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150431>

R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Recuperado de <https://www.R-project.org/>.

SEDLAK, J.; & LINDSAY, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

SUCIU, N. A.; DEVIVO, R.; RIZZATI, N.; CAPRI, E. (2022). Cd content in phosphate fertilizer: which potential risk for the environment and human health? **Current Opinion in Environmental Science & Health**, p. 100392. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2022.100392>

TAKAHASHI, R.; ISHIMARU, Y.; SENOURA, T.; SHIMO, H.; ISHIKAWA, S.; ARAO, T.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, N. K. (2011). The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 14, p. 4843-4850. <https://doi.org/10.1093/jxb/err136>

TANANONCHAI, A.; TANG, M. T.; PAO, C. W.; SAMPANPANISH, P.; TANTHANUCH, W.; TANCHARAKORN, S. (2023). The study of EDTA enhanced Cd accumulation and formation in Napier grass using synchrotron μ X-ray fluorescence imaging and X-ray absorption spectroscopy. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 207, p. 110851.

TÜRKER, O. C.; YAKAR, A.; GÜR, N. (2017). Bioaccumulation and toxicity assessment of irrigation water contaminated with boron (B) using duckweed (*Lemna gibba* L.) in a batch reactor system. **Journal of hazardous materials**, v. 324, p. 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.044>

WANG, T.; LIN, J.; CHEN, Z.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. (2014). Green synthesized iron nanoparticles by green tea and eucalyptus leaves extracts used for removal of nitrate in aqueous solution. **Journal of cleaner production**, v. 83, p. 413-419. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.07.006>

XUE, Y.; WANG, J.; HUANG, J.; LI, F.; WANG, M. (2018). The Response of Duckweed (*Lemna minor* L.) Roots to Cd and Its Chemical Forms. **Journal of Chemistry**, v. 2018, p. 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/7274020>

YOUNG, T. R.; & XIAO, Z. (2021). Principles and practice of determining metal–protein affinities. **Biochemical Journal**, v. 5, p. 1085–1116. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200838>

ZHOU, P.; ADEEL, M.; SHAKOOR, N.; GUO, M.; HAO, Y.; AZEEM, I.; LI, M.; LIU, M.; RUI, Y. (2020). Application of nanoparticles alleviates heavy metals stress and promotes plant growth: An overview. **Nanomaterials**, v. 11, n. 1, p. 26. <https://doi.org/10.3390/nano11010026>

ZOU, J.; WANG, Y.; WANG, S.; SHANG, X. (2023). Ca alleviated Cd-induced toxicity in *Salix matsudana* by affecting Cd absorption, translocation, subcellular distribution, and chemical forms. **Journal of Plant Physiology**, v. 281, p. 153926. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.153926>