



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA A AGROPECUÁRIA**

**BENEDITO MAIA NETO**

**24-EPIBRASSINOLÍDEO COMO MITIGADOR NO ESTRESSE OXIDATIVO NA EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum* Herb) SUBMETIDAS À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO.**

**BELÉM-PA**  
**2022**

**BENEDITO MAIA NETO**

**24-EPIBRASSINOLÍDEO COMO MITIGADOR NO ESTRESSE OXIDATIVO NA EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum Herb*) SUBMETIDAS À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO.**

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada a Agropecuária, para obtenção do título de Mestre.

**Área de concentração:** Fisiologia vegetal

**Orientador:** Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto

BELÉM-PA

2022

**BENEDITO MAIA NETO**

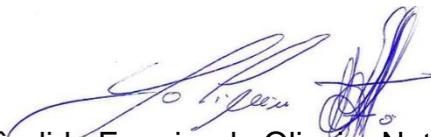
**24-EPIBRASSINOLÍDEO COMO MITIGADOR NO ESTRESSE OXIDATIVO NA EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum Herb*) SUBMETIDAS À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO.**

Dissertação apresentada à faculdade de Biotecnologia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada a Agropecuária, área de concentração de Fisiologia Vegetal, para obtenção de título de Mestre.

31/11/2022

**DATA DA APROVAÇÃO**

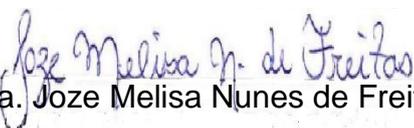
**BANCA EXAMINADORA**



Prof<sup>o</sup> Dr. Cándido Ferreira de Oliveira Neto (Presidente) – Orientador  
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



Dra. Ana Ecídia de Araújo Brito - Examinadora  
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



Prof<sup>o</sup> (a) Dra. Joze Melisa Nunes de Freitas - Examinadora  
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



Dra. Cristine Bastos Do Amarante - Examinadora  
Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG)

*A vida que me faz respirar*

*Ao amor que me faz continuar*

*A família que me acolhe*

*Aos amigos que fiz*

*E ao sonho que ainda vive*

*E a sorte que tive de ir para o  
EBPS.*

**DEDICO E OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao sol que movimenta a engrenagem da vida

Ao Zen budismo por me ajudar a lidar com as turbulências e inconstâncias da existência.

Agradeço a conexão forte que fiz com amigos pelo caminho.

Agradeço o acolhimento e o amor da minha família, em especial aos meus pais Leila da Silva Corrêa e Benedito Maia Filho.

A Dona Alzira e ao João pela hospedagem em Castanhal e todo carinho e afeto que recebi.

A minha tia Ieda pelo quarto em Belém e momentos de diversão conversando coisas sem sentido.

Ao meu orientador Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto por ter sido luz em um mar de escuridão.

Aos funcionários do programa pelas orientações e aprendizado, em especial a Lene.

Ao ambiente estimulante, acolhedor e produtivo que encontrei no Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS) que me ajudou a superar as crises de ansiedade e aqueceu a minha alma.

Aos meus colegas e amigos do EBPS que simbolicamente não cito os nomes, mas os levo no coração, onde o tempo não apaga e os braços sempre se abrem para receber abraços recheados de boas emoções.

Aos cientistas que lutaram e lutam para concessão de bolsas de mestrado e doutorado, e para valorização da mão-de-obra do pesquisador enquanto profissional que é.

A equipe de trabalho que ajudou arduamente na implantação e retirada do experimento.

E a cada sorriso e abraço recebidos que tornam a vida menos sofrida.

*“A sabedoria não vem do acerto,  
mas do seu aprendizado com os  
erros.”*

**Monja Coen**

*Durante toda a sua vida, estudara o universo,  
mas desprezara sua mais clara mensagem:  
para criaturas tão pequenas como nós, a  
vastidão só é suportável através do amor.”*

**Carl Sagan**

## RESUMO

O paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) é espécie nativa do bioma amazônico que apresenta características atrativas para produção de madeira. O arsênio é metal pesado tóxico, tendo como fonte atividades vulcânicas, sísmicas e antropogênicas, podendo entrar na cadeia alimentar e ser bioacumulado. O objetivo do estudo foi avaliar se o 24-epibrassinolídeo (EBL) atenua o estresse oxidativo na emergência, em plântulas de paricá submetidas à toxicidade por arsênio (As). O experimento foi desenvolvido na sala de crescimento vegetal do Laboratório de Estudos da Biodiversidade de Plantas Superiores (EBPS), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), localizada em Belém-Pará, no período de julho a agosto de 2022. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 4, com 12 tratamentos e 4 repetições, totalizando 48 unidades experimentais contendo 15 sementes por repetição. As sementes foram embebidas por 24 horas em 3 concentrações de 24-epibrassinolídeo (0, 10 nM e 20 nM) e colocadas em areia contendo diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{NaAsO}_2$  - 0, 2 mg. L<sup>-1</sup>, 4 mg.L<sup>-1</sup>, 6 mg.L<sup>-1</sup>). Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F ( $p < 0,05$ ) e as diferenças entre tratamentos analisadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O EBL influenciou positivamente na porcentagem de emergência e o crescimento da parte aérea e raiz, principalmente na dosagem de 20nM de EBL. O aumento da concentração de arsênio teve efeito negativo. Análise do sistema antioxidante mostrou que o nível de SOD permaneceu constante, a produção de APX e G-POD é modulada negativamente pelo EBL, nas folhas. Na raiz, APX apresentou níveis baixos e a concentração de G-POD aumentou com dosagens de 20nM de EBL. De uma perspectiva global, doses de 20nM de EBL apresentaram evidências de efeito atenuante.

**Palavras-chave:** Espécie florestal. Enzimas antioxidantes. Fitotoxicidade. Metal pesado

## ABSTRACT

Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) is a native species of the Amazon biome that has attractive characteristics for wood production. Arsenic is a toxic heavy metal, having as sources volcanic, seismic and anthropogenic activities, and it can enter the food chain and be bioaccumulated. The aim of the study was to evaluate whether brassinosteroid (BR) attenuates oxidative stress at emergence in paricá seedlings subjected to arsenic (As) toxicity. The experiment was carried out in the plant growth room of the Laboratory of Biodiversity Studies of Superior Plants (EBPS), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), located in Belém-Pará, from July to August 2022. A completely randomized design (DIC) was used in a 3 x 4 factorial design, with 12 treatments and 4 replications, totaling 48 experimental units containing 15 seeds per replication. The seeds were soaked for 24 hours in 3 concentrations of 24-epibrassinolide (0, 10 nM and 20 nM) and placed in sand containing different concentrations of sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$  - 0, 2  $\text{mg.L}^{-1}$ , 4  $\text{mg.L}^{-1}$ , 6  $\text{mg.L}^{-1}$ ). The data were submitted to analysis of variance using the F test ( $p < 0.05$ ). The EBL positively influenced the percentage of emergence and the growth of shoots and roots, mainly at the dosage of 20nM of EBL. The increase in arsenic concentration had a negative effect. Analysis of the antioxidant system showed that the level of SOD remained constant, the production of APX and G-POD is negatively modulated by EBL in leaves. In the root, APX showed low levels and the concentration of G-POD increased with dosages of 20nM of EBL. From a global perspective, 20nM doses of EBL showed evidence of an attenuating effect.

**Keywords:** Forest species. Antioxidant enzymes. Phytotoxicity. Heavy metal

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferentes aspectos da morfologia da inflorescência, flor, fruto e semente do Paricá (*Schizolobium amazonicum*). a) panícula; b) flor em vista lateral; c) flor em corte; d) estame, e) antera; f) gineceu; g) fruto; h) semente. Desenho de A.Elielson. Fonte: Ventueri (2000). ..... 14
- Figura 2.** Ciclo do arsênio, a esquerda as fontes naturais e a direita as fontes antropogênicas. Fonte: IARC et al. (2012). ..... 16
- Figura 3.** Influência do 24-epibrassinolídeo na emergência de sementes de paricá sob estresse por arsênio. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos EBL ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com arsênio ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey..... 31
- Figura 4.** Influência do 24-epibrassinolídeo no comprimento de plântulas de paricá sob estresse por arsênio. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos EBL ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com arsênio ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey..... 32
- Figura 5.** Influência do 24-epibrassinolídeo na atividade das enzimas APX (a) e G-POD (b) no sistema radicular e foliar de plântulas de paricá sob estresse por arsênio. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos EBL ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com arsênio ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey..... 36

## LISTA DE IMAGENS

**Imagem 1.** Fotografia de amostras de plântulas selecionadas aleatoriamente como representantes dos seus respectivos tratamentos. Elas foram organizadas em grupos com mesma dosagem de EBL e, da esquerda para direita dos três agrupamentos, observa-se o efeito da variação da dosagem de arsênio (0, 2,4 e 6 mg. L<sup>-1</sup>).....33

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Arsénio inorgânico (arsenito, arsenato, trióxido de arsénio e pentóxido de arsénio) e arsénio orgânico.....	15
--	----

## SUMÁRIO

1. ASPECTOS GERAIS DA PESQUISA.....	13
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS DA PESQUISA.....	23
3. BRASSINOSTEROIDE COMO MITIGADOR NO ESTRESSE OXIDATIVO NA EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE PARICÁ ( <i>Schizolobium amazonicum Herb</i> ) SUBMETIDAS À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO. ....	24
3.1 Introdução.....	26
<b>3.2</b> Material e Método.....	27
3.2.1 Material Vegetal.....	27
3.2.2 Delineamento experimental e condição de cultivo.....	27
3.2.3 Coleta e armazenamento do material.....	27
3.2.4 Emergência e análise biométricas.....	28
3.2.5 Análise de enzimas antioxidantes.....	29
3.2.6 Análise estatística.....	30
<b>3.3</b> Resultado .....	<b>30</b>
<b>3.3.1</b> Efeito do As e 24-epibrassinolídeo nos parâmetros biométricos e de emergência.....	30
<b>3.3.2</b> Efeito do As e 24- epibrassinolídeo na atividade de enzimas antioxidantes.....	33
<b>3.4</b> Discussão.....	<b>37</b>
<b>3.4.1</b> Efeito do As e 24-epibrassinolídeo nos parâmetros biométricos e de emergência.....	37
<b>3.4.2</b> Efeito do As e 24- epibrassinolídeo na atividade de enzimas antioxidantes.....	38
<b>3.5</b> Conclusão.....	<b>41</b>

## 1. ASPECTOS GERAIS DA PESQUISA

### 1.1 Contextualização

#### 1.1.1 Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke)

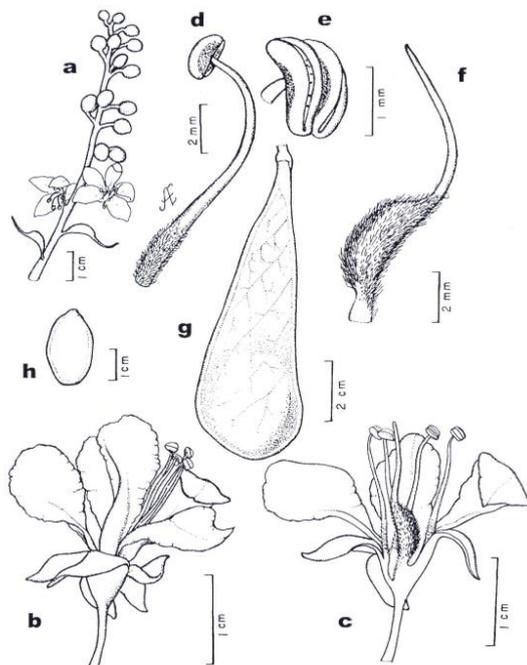
A espécie conhecida comumente como paricá pertence a divisão *magnoliophyta*, classe *magnoliopsida*, ordem *fabale*, família *Fabaceae*, sub-família *Caesalpinaceae*, Genêro *Schizolobium* e espécie *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) (BARNEBY, 1996). Ela apresenta duas variedades, uma de ocorrência no bioma amazônico (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*) e outra na mata atlântica (*Schizolobium parahyba* var. *parahyba*) (BARNEBY, 1996). Sua versatilidade de cultivo a permite ser implantada em sistemas agroflorestais, plantios consórcio e homogêneos destacando-se entre as espécies nativas mais frequentemente selecionadas em projetos de reflorestamento; somado a isso, destaca-se pelo rápido crescimento volumétrico, atingindo cerca de 40 m de altura e 100 cm de diâmetro na altura do peito e fácil germinação, tornando-se uma espécie de importância econômica para indústria madeireira (RIBEIRO, 2011).

A copa das árvores não é densa, apresenta galhos espaçados, não apresentando cobertura completa contra isolação, exercendo desse modo menor competição por luz com as espécies de sub-bosque (ALBINO; ZANETTI, 2006). As folhas são compostas por 20 a 30 pinas opostas, com pecíolo viscosos e longo medindo até 20 cm (ROSA, 2006). Na floração ocorre a perda parcial ou total das flores, que apresentam coloração amarela e pétalas oblongas, glabras e firmes medindo entre 2,5 a 3,0 cm, sendo hermafroditas e agrupadas em inflorescências panículas (VENTURIERI, 1999).

O fruto é formado por duas valvas em forma de espátula, medindo de 6 a 10 cm de comprimento e 1,5 a 3 cm de largura. Trata-se de legume deiscente, achatado, coriáceo, obovado, alado e quando maduro apresenta cor amarronzada. Recomenda-se a coleta dos frutos no início da deiscência reconhecida pela cor café-claro, obtendo-se as sementes após exposição ao sol. A partir de cada fruto consegue-se apenas uma semente, localizada na posição apical envolta pelo mesoendocarpo alado. (CARVALHO, 1994; ROSA, 2006).

As sementes apresentam alta taxa de germinação, ocorrendo de forma epígea fanerocotiledonar, e de propagação fácil (VENTURIERI, 2000). Caracterizam-se pela

superfície lisa, brilhante, achatadas, ovalada, cor de café, com bordas mais escuras e endocarpo papiroso, estando envolta por uma asa grande e papirácea (CARVALHO, 1994).



**Figura 1.** Diferentes aspectos da morfologia da inflorescência, flor, fruto e semente do Paricá (*Schizolobium amazonicum*). a) panícula; b) flor em vista lateral; c) flor em corte; d) estame, e) antera; f) gineceu; g) fruto; h) semente. Desenho de A.Elielson. Fonte: Ventueri (2000).

### 1.1.2 Arsênio

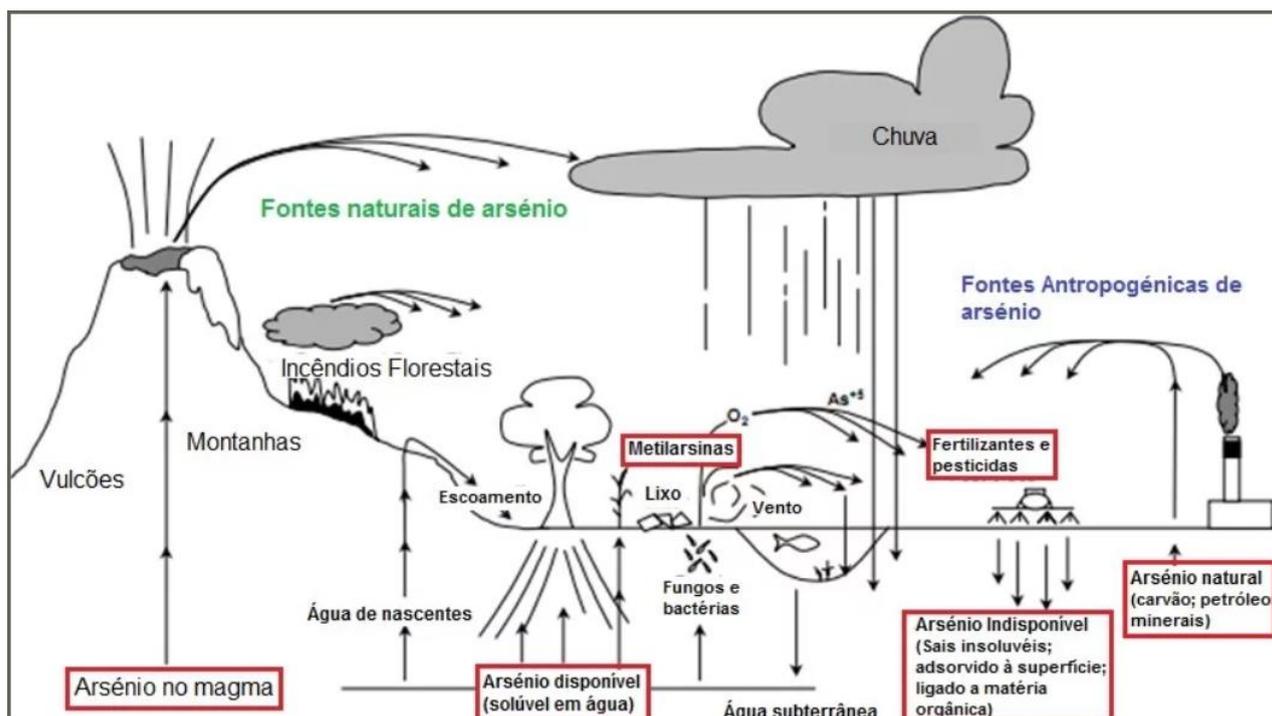
O arsênio (As) é um elemento químico de número atômico 33, com propriedades entre metais e não-metais sendo considerado metaloide ou semimetal (SOUZA, 2018). No meio ambiente ele é encontrado em dois grupos de compostos, o arsênio inorgânico e orgânico, ocorrendo em diferentes estados de oxidação (Tabela 1) e tendo distribuição ampla na crosta terrestre, água, ar, plantas e animais (IARC *et al.*, 2012). O primeiro é considerado mais tóxico e ocorre combinado com elementos como enxofre, cloro e oxigênio; o segundo com átomos de carbono e hidrogênio, podendo ao longo do tempo se converter nas formas mais tóxicas (arsênio inorgânico) (IARC *et al.*, 2012).

**Tabela 1.** Arsênio inorgânico (arsenito, arsenato, trióxido de arsênio e pentóxido de arsênio) e arsênio orgânico.

<b>ESPÉCIES QUÍMICAS DE ARSÊNIO INORGÂNICO E ORGÂNICO</b>	
<b>Estado de oxidação trivalente</b>	<b>Estado de oxidação pentavalente</b>
Arsenito (As III)	Arsenato (As V)
Trióxido de Arsênio (As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Pentóxido de Arsênio (As <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )
Ácido monometilarsenoso (MMA III)	Ácido monometilarsênico (MMA V)
Ácido dimetilarsenoso (DMA III)	Ácido dimetillarsínico (DMA V)
	Ácido trimetilarsínico
	Ácido arsanílico

Fonte: IARC *et al.* (2012)

As fontes podem ser atividades geológicas como erupções vulcânicas ou antropogênicas (Imagem 1) (JÚNIOR, 2022). Os compostos arsênicos vêm sendo produzidos pela indústria há muito tempo, seja como resíduo ou produto comercializado, em defensivos agrícolas, indústrias mineradoras, metalúrgicas e até certas aplicações medicinais antes de se conhecer os impactos ambientais e gravidade toxicológica deles. Atualmente, tem crescido o desestímulo ao uso de pesticidas contendo sais de arsênio, tais quais MSMA (metilarsonato monossódico, o DSMA (metilarsonato dissódico) e outros (JÚNIOR, 2022). Esses compostos no meio ambiente transformam-se, ao longo do tempo, em formas mais tóxicas (inorgânicas) contaminando o ambiente e causando danos ao ecossistema. A crescente atividade de mineração no Brasil tão importante para nossa economia ainda é e continuará a ser uma das principais atividades humanas a contribuir para elevação da concentração de arsênio no solo, água e ecossistema (Borda *et al.*, 2000).



**Figura 2.** Ciclo do arsênio, a esquerda as fontes naturais e a direita as fontes antropogênicas. Fonte: IARC *et al.* (2012).

Os compostos desse elemento apresentam propriedades carcinogênicas e uma vez no solo e na água entram na cadeia alimentar e acumulam-se principalmente nos organismos que estão nos maiores níveis tróficos. Devido a potencial ameaça a saúde humana a Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2019) classifica o arsênio entre as principais substâncias tóxicas, seguido pelo mercúrio e chumbo. A forma química determina o grau de toxicidade, biodisponibilidade e os efeitos fisiológico/toxicológicos; no caso das plantas o arsenito ( $As^{III}$ ) e o arsenato ( $As^V$ ) são as formas mais prejudiciais, devido serem mais tóxicas e prontamente absorvidas pelas raízes (TRIPATHI *et al.*, 2007).

### 1.1.3 O efeito do arsênio nas plantas

O arsênio entra no sistema vegetal pelas raízes e essa absorção pode ser intensificada de acordo com fatores como, por exemplo, PH, propriedades do solo, concentração do metal e a espécie que está sendo avaliada (SHI *et al.*, 2019). Embora diferentes espécies vegetais tenham sensibilidades diferentes, elas resistem até dada concentração limite a partir da qual o estresse se torna letal (SHI *et al.*, 2019).

As duas principais formas desse metalóide ( $As^{III}$  e  $As^V$ ) estão disponíveis para absorção dependendo do nível de oxigênio e condição redox do solo (LI *et al.*, 2016).

O  $\text{As}^{\text{III}}$  está mais biodisponível em ambientes anaeróbicos, como solos alagados, sendo os mecanismos de entrada no tecido vegetal ainda pouco elucidado, mas o transporte parece ocorrer através de proteínas aquaporinas, enquanto o  $\text{As}^{\text{V}}$  está mais disponível em condições aeróbicas e, por ser análogo dos íons fosfato, tem a captação facilitada pelo transportador de fosfato (LI *et al.*, 2016).

A toxicidade do  $\text{As}^{\text{III}}$  se deve principalmente por apresentar elevada afinidade pelos grupos sulfidrilas presentes em muitas enzimas, interferindo negativamente na função delas. Já o  $\text{As}^{\text{V}}$  devido exercer competição com o fosfato inorgânico gera problemas em cadeias de processos bioquímicos gerando graves danos ao metabolismo celular (LOMBI *et al.*, 2002). A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e prejuízo do sistema de defesa antioxidantes dos vegetais também explicam a toxicidade a esses íons (LOMBI *et al.*, 2002).

A elevação da produção de EROs inibe a maioria dos processos metabólicos das células, e atuam tanto danificando componentes celulares como também sinalizando e ativando mecanismos de defesa da planta (CHANDRAKAR *et al.*, 2016). As plantas conseguem contornar esse problema devido a presença de sistemas enzimáticos e não enzimáticos que neutralizam os danos, alguns deles sendo ativados por cascatas de sinalização celular em resposta ao estresse e outros atuando de forma constitutiva (CHANDRAKAR *et al.*, 2016). São exemplo enzimáticos a superóxido dismutase que converte superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , glutathione redutase, catalase e peroxidase, já os não enzimáticos pode-se citar glutathione a qual destrói o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o converte em água, os flavonoides, antocianinas, carotenoides, ácido ascórbico e ácidos orgânicos (FATIMA e AHMAD, 2004).

As plantas apresentam diferentes estratégias para se desenvolverem em solos contaminados por arsênio. Por exemplo, plantas não hiperacumuladoras de arsênio podem suprimir o sistema de absorção de fosfato de alta afinidade gerando redução na absorção do análogo dele ( $\text{As}^{\text{V}}$ ); outra via é a absorção do arsetato, conversão para arsenito, pela ação da arsenato redutase, e formação de complexos com fitoquelatinas e glutathione e o sequestro nas raízes (LI *et al.*, 2015). Já plantas hiperacumuladoras, ou seja, aquelas capazes de não somente tolerar como também acumular nos tecidos o metal pesado sem apresentar sintomas de toxicidade, apresentam mecanismos complexos tais como conversão de  $\text{As}^{\text{V}}$  para  $\text{As}^{\text{III}}$ , efluxo de  $\text{As}^{\text{III}}$  para o ambiente, significativa translocação do metal para parte

aérea e sequestro de arsenito nos vacúolos das folhas (PENG *et al.*, 2021). Essas hiperacumuladoras são de interesse para utilização em projeto de fitorremediação, pois diminuem a concentração do metal pesado no solo.

#### **1.1.4 Brassinosteróide como mitigador de estresse abiótico**

Os brassinosteroides (BRs) são hormônios vegetais endógenos envolvidos na regulação de diversos processos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta (ANWAR *et al.*, 2018). Extensas pesquisas têm mostrado seu efeito pleiotrópico e redes de interação com outros hormônios vegetais (ANWAR *et al.*, 2018). Somado a isso, tem-se avaliado e descoberto os efeitos positivos do uso desse hormônio como mitigador dos efeitos tóxicos dos metais pesados (AHAMMER, G.J. *et al.*, 2020). Sabe-se que as plantas apresentam mecanismos para desintoxicação de MPs a exemplo da quelatação do íon metálico por um ligante como fitoquelatinas (FQ), que desintoxica os metais intracelulares ligando-os através da coordenação do tiolato (AHAMMER, G.J. *et al.*, 2020). O BRs mostrou-se eficiente na estimulação de FQ mitigando o efeito nocivo do chumbo na espécie *Chlorella vulgariscélulas* (BAJGUZ, 2002). Esse estímulo é potencializado com o aumento da concentração do hormônio e diminui com a elevação da concentração do metal, observando-se os efeitos mitigadores do BRs na redução do impacto do estresse por metais no crescimento, na preservação do teor de clorofila, açúcar e proteínas (BAJGUZ, 2000; BAJGUZ, 2002).

Pesquisas sobre os efeitos do acúmulo de metais pesados somado ao uso de BRs tem mostrado em diferentes espécies agrícolas respostas positivas e redução dos danos. Os BRs induziram a redução do teor de cádmio e cobre em mudas de colza de inverno e mostarda indiana, respectivamente (JANECZKO *et al.*, 2005; SHARMA e BHARDWAJ, 2007). Nas culturas de beterraba observou-se redução de 50% no teor de chumbo das raízes em comparação ao grupo controle, com aplicação de EBL (SCHILLING; SCHILLER; OTTO, 1991). Mudas de *Cicer arietinum* (L.) submetidas a diferentes concentrações de cádmio resistiram melhor aos efeitos nocivos gerados pelo metal quando pulverizadas com 28-homobrassinolida (HASAN *et al.*, 2008). Houve melhora no crescimento e desenvolvimento como resposta a aplicação de BRs no grão de bico, feijão mungo e mostarda, sujeitos ao estresse por cádmio, alumínio e níquel, respectivamente (HASAN *et al.*, 2008; HAYAT *et al.*, 2007; ALI *et al.*, 2008).

Hasan et al. (2008) relataram aumento do conteúdo de prolina e atividade das enzimas antioxidantes superoxidase, catalase e peroxidase. Ali et al. (2008) relataram os efeitos positivos do 24-epiBL no estímulo do sistema antioxidante (superóxido dismutase, catalase, peroxidase glutaciona redutase), mostrando que as plantas que receberam doses do hormônio tiveram maior atividades das enzimas, principalmente quando expostas a maiores níveis de estresse salino e/ou níquel, algo que pode explicar o melhor desenvolvimento das plantas nessas condições quando comparadas as que não receberam a aplicação hormonal.

## REFERÊNCIA

Agência de Registro de Doenças e Substâncias Tóxicas -ATSDR. (2019). **ATSDR's Substance Priority List**. Atlanta, GA: Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, Serviço de Saúde Pública. Acesso em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>.

AHAMMED, G. J. et al. Brassinosteroids in plant tolerance to abiotic stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 4, p. 1451-1464, 2020.

ALAM, M. M. et al. Effect of 28-homobrassinolide on nickel induced changes in *Brassica juncea*. **Photosynthetica**, v. 45, n. 1, p. 139, 2007.

ALBINO, U. B.; ZANETTI, L. Z. *O cultivo do paricá*. Dom Eliseu: **Centro de Pesquisa do Paricá**, 2006. 24 p.

ALI, B. et al. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Environmental and Experimental Botany**, v. 62, n. 2, p. 153-159, 2008.

ANWAR, A. et al. The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: a review. **Biological Research**, v. 51, 2018.

BAJGUZ, A. Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 797-801, 2000.

BAJGUZ, A. Brassinosteroids and lead as stimulators of phytochelatin synthesis in *Chlorella vulgaris*. **Journal of plant physiology**, v. 159, n. 3, p. 321-324, 2002.

BARNEBY, Rupert NY: asides and oversights. **Brittonia**, v. 48, n. 2, p. 174-187, 1996.

BORBA, R. P. et al. Arsenic in water and sediment in the iron quadrangle, state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 30, n. 3, p. 554-557, 2000.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p. 470-475. 1994

CHANDRAKAR, V.; NAITHANI, S. C.; KESHAVKANT, S. Arsenic-induced metabolic disturbances and their mitigation mechanisms in crop plants: A review. **Biologia**, v. 71, n. 4, p. 367-377, 2016.

FATIMA, R. A.; AHMAD, Masood. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 346, n. 1-3, p. 256-273, 2005.

HASAN, S. A. et al. 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. **Environmental pollution**, v. 151, n. 1, p. 60-66, 2008.

HAYAT, S. et al. Effect of 28-homobrassinolide on salinity-induced changes in *Brassica juncea*. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, n. 3, p. 141-146, 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER et al. Arsenic and arsenic compounds monograph. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum**, v. 100, p. 41-93, 2012.

JANECZKO, A. et al. Protection of winter rape photosystem 2 by 24-epibrassinolide under cadmium stress. **Photosynthetica**, v. 43, n. 2, p. 293-298, 2005.

JÚNIOR, J. M. S. Caracterização do elemento químico arsênio e a biorremediação de solos contaminados. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 2, 2022.

LI, Nannan; WANG, Jingchao; SONG, Won-Yong. Arsenic uptake and translocation in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 1, p. 4-13, 2016.

LI, Yang; Y., Li-jie; JIN, X. Mechanism of heavy metal tolerance stress of plants. **China Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 94-104, 2015.

LOMBI, Enzo et al. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. **New Phytologist**, v. 156, n. 2, p. 195-203, 2002.

PENG, J. et al. Comparative understanding of metal hyperaccumulation in plants: a mini-review. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 43, n. 4, p. 1599-1607, 2021.

RIBEIRO, I. O. **Zoneamentos edafoclimáticos de *Hevea brasiliensis*, *Pinus elliottii* e *Schizolobium Amazonicum*, utilizando análise multicritério.** p 66. 2011. Monografia (Engenharia Florestal) apresentada a Universidade Federal do Espírito Santos.

ROSA, L. S. Características botânicas, anatômicas e tecnológicas do paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n.46, p.63-79, 2006.

Schilling,G; Schiller,C; Otto, S. Influence of brassinosteroids on organ relations and enzyme activities of sugar-beet plants, in: H.G. Cutler, T. Yokota, G. Adam (Eds.), *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, **American Chemical Society, Washington**, DC, 1991, pp. 208–219.

SHARMA, P.; BHARDWAJ, R. Effects of 24-epibrassinolide on growth and metal uptake in *Brassica juncea* L. under copper metal stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 29, n. 3, p. 259-263, 2007.

SHI, Gao Ling et al. Accumulation and distribution of arsenic and cadmium in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) at different developmental stages. **Science of the Total Environment**, v. 667, p. 532-539, 2019.

SOUZA, A.C.M. **Geoquímica de arsênio na bacia inferior do rio Paraíba do Sul**. 2018. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Rio de Janeiro, 2018.

TRIPATHI, R. D. et al. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. **Trends in biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 158-165, 2007.

VENTURIERI, G. C. **A ecologia reprodutiva do taxi-branco (*Sclerolobium paniculatum* var. *paniculatum* Vogel) e do paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) leg: *Caesalpinioidea* e a melitofilia nestas árvores amazônicas**. 2000. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. Acesso em: 23 out. 2022.

VENTURIERI, G.C. Reproductive ecology of *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke and *Sclerolobium paniculatum* Vogel (Leg. *Caesalpinioidea*) and its importance in forestry management projects. In: **SIMPOSIO SILVICULTURA NA AMAZONIA ORIENTAL**: contribuições do projeto EMBRAPA/DIFID, 1999, Belém: EMBRAPA CPATU/DFID, (Documentos,123). p.91 - 97. 1999

## **2. HIPÓTESES E OBJETIVOS DA PESQUISA**

### 2.1 Hipóteses

- O brassinosteróide irá atenuar o efeito tóxico do arsênio na emergência e no crescimento inicial de plântulas de paricá;
- O brassinosteróide irá atenuar o efeito tóxico do arsênio no crescimento inicial em plântulas de paricá com respostas positivas na atividade de enzimas antioxidantes atenuando o estresse oxidativo.

### 2.2 Objetivos

#### 2.2.1 Objetivo Geral

- Verificar se o brassinosteróides atenua o estresse oxidativo na emergência em plântulas de paricá submetidas à toxicidade por arsênio.

#### 2.2.2 Objetivos específicos

- Verificar a emergência em plântulas de paricá submetidas a doses de arsênio e brassinosteróide nos parâmetros de velocidade de emergência, tempo médio de emergência, coeficiente de velocidade de emergência, índice de velocidade de emergência, comprimento da raiz, comprimento da parte aérea, comprimento total.
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (G-POD), em plântulas de paricá submetidas a doses de arsênio e brassinosteróide.

### 3. BRASSINOSTEROIDE COMO MITIGADOR NO ESTRESSE OXIDATIVO NA EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum Herb*) SUBMETIDAS À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO.

#### RESUMO

O paricá (*Schizolobium amazonicum Huber ex Ducke*) é espécie nativa do bioma amazônico que apresenta características atrativas para produção de madeira. O arsênio é metal pesado tóxico, tendo como fonte atividades vulcânicas, sísmicas e antropogênicas, podendo entrar na cadeia alimentar e ser bioacumulado. O objetivo do estudo foi avaliar se o 24-epibrassinolídeo (EBL) atenua o estresse oxidativo na emergência, em plântulas de paricá submetidas à toxicidade por arsênio (As). O experimento foi desenvolvido na sala de crescimento vegetal do Laboratório de Estudos da Biodiversidade de Plantas Superiores (EBPS), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), localizada em Belém-Pará, no período de julho a agosto de 2022. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 4, com 12 tratamentos e 4 repetições, totalizando 48 unidades experimentais contendo 15 sementes por repetição. As sementes foram embebidas por 24 horas em 3 concentrações de 24-epibrassinolídeo (0, 10 nM e 20 nM) e colocadas em areia contendo diferentes concentrações de arsenito de sódio ( $\text{NaAsO}_2$  - 0, 2 mg. L<sup>-1</sup>, 4 mg.L<sup>-1</sup>, 6 mg.L<sup>-1</sup>). Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F ( $p < 0,05$ ) e as diferenças entre tratamentos analisadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O EBL influenciou positivamente na porcentagem de emergência e o crescimento da parte aérea e raiz, principalmente na dosagem de 20nM de EBL. O aumento da concentração de arsênio teve efeito negativo. Análise do sistema antioxidante mostrou que o nível de SOD permaneceu constante, a produção de APX e G-POD é modulada negativamente pelo EBL nas folhas. Na raiz, APX apresentou níveis baixos e a concentração de G-POD aumentou com dosagens de 20nM de EBL. De uma perspectiva global, doses de 20nM de EBL apresentaram evidências de efeito atenuante.

**Palavras-chave:** Espécie florestal. Enzimas antioxidantes. Fitotoxicidade. Metal pesado

## ABSTRACT

Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) is a native species of the Amazon biome that has attractive characteristics for wood production. Arsenic is a toxic heavy metal, having as sources volcanic, seismic and anthropogenic activities, and it can enter the food chain and be bioaccumulated. The aim of the study was to evaluate whether brassinosteroid (BR) attenuates oxidative stress at emergence in paricá seedlings subjected to arsenic (As) toxicity. The experiment was carried out in the plant growth room of the Laboratory of Biodiversity Studies of Superior Plants (EBPS), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), located in Belém-Pará, from July to August 2022. A completely randomized design (DIC) was used in a 3 x 4 factorial design, with 12 treatments and 4 replications, totaling 48 experimental units containing 15 seeds per replication. The seeds were soaked for 24 hours in 3 concentrations of 24-epibrassinolide (0, 10 nM and 20 nM) and placed in sand containing different concentrations of sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$  - 0, 2  $\text{mg.L}^{-1}$ , 4  $\text{mg.L}^{-1}$ , 6  $\text{mg.L}^{-1}$ ). The data were submitted to analysis of variance using the F test ( $p < 0.05$ ). The EBL positively influenced the percentage of emergence and the growth of shoots and roots, mainly at the dosage of 20nM of EBL. The increase in arsenic concentration had a negative effect. Analysis of the antioxidant system showed that the level of SOD remained constant, the production of APX and G-POD is negatively modulated by EBL in leaves. In the root, APX showed low levels and the concentration of G-POD increased with dosages of 20nM of EBL. From a global perspective, 20nM doses of EBL showed evidence of an attenuating effect.

**Keywords:** Forest species. Antioxidant enzymes. Phytotoxicity. Heavy metal

### 3.1 INTRODUÇÃO

Atividades econômicas importantes para sobrevivência e bem-estar das nossas civilizações causam em certos aspectos prejuízos a biosfera ao liberarem resíduos no ambiente como ocorre com os metais pesados (FRANÇA, 2011). Esses elementos desencadeiam no ecossistema diferentes graus de danos, a depender da concentração e do estado de oxidação que determina sua biodisponibilidade, toxicidade e mobilidade no meio ambiente (BIONDI, 2010). Processos naturais tais como erupção vulcânica e intemperismo das rochas também contribuem para contaminação do solo por metais pesados (MPs), entretanto os fatores antropogênicos somam-se, tornando o panorama crítico e a contaminação por eles uma ameaça à humanidade e preocupação global, afetando a agricultura, o ecossistema e a saúde humana (SHAH; DAVEREY, 2020).

O arsênio (As) é um desses contaminantes, trata-se de metaloide tóxico com potencial de contaminação da atmosfera, recursos hídricos e solo. Nas formas mais tóxicas que são arsenito ( $As^{III}$ ) e arsenato ( $As^V$ ) essa substância penetra o tecido vegetal rapidamente (TRIPATHI *et al.*, 2007). A fim de limitar os danos gerados por esses compostos faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias para tratar o ambiente afetado, como a fitorremediação.

Nas plantas, os metais tóxicos estão biodisponíveis através da absorção a partir do solo. Estudos vêm mostrando os efeitos fitotóxicos de altas concentrações deles nos processos fisiológicos, bioquímicos, moleculares, crescimento e potencial hídrico dos vegetais (SOUZA, 2011). Nos estágios iniciais de desenvolvimento as sementes são sensíveis às condições físicas e químicas da rizosfera, mesmo apresentando tegumento externo que confere inicialmente proteção a ação nociva dos MPs, observando-se declínio na germinação e vigor em resposta ao estresse desencadeado pelo metal pesado (ADREES *et al.*, 2015). Contudo, existem espécies ajustadas evolutivamente a solos contaminados por MPs conseguindo acumular ou hiperacumular MPs, excluí-los e/ou realizar outros tipos de estratégias (SYTAR, OKSANA, 2013).

O uso de hormônios envolvidos na modulação da resposta das plantas ao estresse, como os brassinosteróides (BR), pode ser explorado com a finalidade de elevar a tolerância das plantas aos efeitos negativos dos MPs, (VARDHIN *et al.*, 2012). Os metais pesados induzem estresse oxidativo na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas (SENEVIRATNE *et al.*, 2017). Pesquisas mostram que

a aplicação BRs melhora o desempenho de plantas como grão-de-bico, feijão-mungo e mostarda contra o estresse causado, respectivamente, por cádmio, alumínio e níquel (HASAN *et al.*, 2008; HAYAT *et al.*, 2007; ALAM *et al.*, 2007). Observando-se a elevação da atividade das enzimas antioxidantes (superoxidase, catalase e peroxidase) e do conteúdo de prolina (HASAN *et al.*, 2008).

Na amazônia existe grande biodiversidade vegetal que pode ser utilizada para selecionar espécies tolerantes aos MPs, com potencial fotorremediador e relevantes economicamente para serem utilizadas em projetos de reflorestamento de áreas contaminadas. Dentre essas pode-se citar o Paricá (*Schizolobium amazonicum* Herb) que vem ganhando destaque em programas de reflorestamento devido seu rápido crescimento em altura e diâmetro, tornando o corte para indústria madeireira viável em poucos anos (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Diante disso, objetiva-se com esse trabalho avaliar os efeitos de diferentes concentrações de arsênio e brassinosteroides na emergência e estresse oxidativo em plântulas de paricá.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Material Vegetal**

Foram utilizadas 720 sementes de paricá (*Schizolobium amazonicum* Herb) fornecidas pela empresa Amazonflora.

### **3.2.2 Delineamento experimental e condição de cultivo**

O experimento foi realizado na sala de crescimento de plântulas, localizada no laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS) no Instituto de Ciências Agrárias (ICA), UFRA/Campus-Belém. Foi aplicado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x3, totalizando 12 tratamentos, sendo quatro concentrações de arsenito (0,2,4 e 6 mg. L<sup>-1</sup>) e três concentrações de brassinoesteróides na forma de 24-epibrassinolídeo (0,10 e 20nM de EBL), com quatro repetições, totalizando 48 vasos (unidades experimentais).

### **3.2.3 Coleta e armazenamento do material**

As plântulas foram coletadas após o 9º dia para evitar estresses relacionados ao esgotamento das reservas de nutrientes da semente, e a parte aérea e a raiz foram medidas. As folhas e as raízes de cada unidade experimental foram armazenadas em sacolas apropriadas, identificadas e imersas em nitrogênio líquido por 2 min e então

levadas ao freezer para armazenamento e posterior análise da concentração de enzimas antioxidantes no Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS), na UFRA em Belém-PA.

### **3.2.4 Emergência e análise biométricas**

#### **3.2.4.1 Teste de emergência**

Em cada unidade experimental foram utilizadas 15 sementes tendo sido usadas 720 no total. Essas, devido à natureza dura e impermeável do tegumento, foram inicialmente escarificadas manualmente com lixa 80 mm, de acordo com as instruções para análise de sementes de espécies florestais (Brasil, 2013), atingindo o tegumento com uma lixa, na lateral do terço superior da semente, parte oposta a micrófila, sem atingir os cotilédones. Na sequência, elas foram divididas em três grupos correspondentes ao branco (água) e as duas soluções de EBL (10 e 20 nM) e imersas nelas por 24 horas para quebra de dormência e absorção do hormônio.

Foi utilizado como substrato areia lavada, autoclavada e seca em estufa a 65°C. Antes do semeio aplicou-se as soluções de arsenito e o branco (água) nas respectivas unidades experimentais, com volume equivalente a 80% da capacidade de campo de 4,5 Kg de areia. Todas as sementes foram plantadas a 4 cm da superfície e cobertas por areia.

Após a semeadura, foi avaliado diariamente, desde o início da emergência até a sua estabilização, o índice de velocidade de emergência (IVE) determinado pela fórmula de Maguire (1962):  $IVE = G1 / N1 + G2 / N2 + \dots + Gn / Nn$ , onde: G1, G2, Gn = número de mudas germinadas na primeira, segunda, última contagem e N1, N2, Nn = número de dias da primeira, segunda e última contagem. Avaliou-se também o tempo médio de emergência (TME) dado pela fórmula de Edmond e Drapala (1958):  $TME = G1T1 + G2T2 + \dots + GiTi / G1 + G2 + \dots + Gi$ , onde: TME = tempo médio necessário para atingir a emergência máxima (dias); G1, G2, ..., Gi = número de plântulas normais emergidas a cada dia; T1, T2, ..., Ti = número de dias decorridos da semeadura à primeira, segunda e última contagem. E, o coeficiente de velocidade de emergência (CVE) obtido pela fórmula de Kotowski (1926):  $CVE = G1 + G2 + \dots + Gi / G1T1 + G2T2 + \dots + GiTi \times 100$ .

Depois de 9 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de germinação, comprimento da parte aérea (cm), comprimento da maior raiz (cm), comprimento total (cm) e número de folhas.

### **3.2.5 Análise de enzimas antioxidantes**

As análises foram realizadas no laboratório do EBPS, na UFRA-Belém. As enzimas analisadas foram a dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) (Gianopolitis e Ries 1977); peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) (Nakano e Asada 1981) e peroxidase do guaiacol (GPOD, EC 1.11.1.9) (Kar e Mishra 1979).

#### **3.2.5.1 Extração**

O extrato para a determinação da atividade das enzimas SOD, APX, G-POD foi obtido a partir da homogeneização em almofariz, a 4°C, de 0,1g da massa congelada em nitrogênio líquido de folha e raiz com 5 mL de solução-tampão fosfato de potássio (a 4 °C) a 0,1 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM, seguido de homogeneização por 4 min. As adições do tampão fosfato foram feitas de forma fragmentada, sendo 50% do volume total desta solução (2,5 mL) utilizada na homogeneização durante 2 min, após isto, imediatamente adicionaram-se os outros 50%, sendo a mistura homogeneizada em tempo equivalente ao anterior. O homogeneizado foi filtrado em tecido de náilon e transferido para tubos de ensaio, sendo mantidos a 4°C por duas horas, realizando-se agitações ocasionais. O homogeneizado filtrado foi centrifugado à 12.000 x g, durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante (o extrato bruto) foi armazenado em freezer a -80°C até ser utilizado nos ensaios de atividade enzimática.

#### **3.2.5.2. Dismutase do superóxido (SOD EC 1.15.1.1)**

O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8, EDTA a 0,1 mM, metionina a 19,5 mM, nitrocloreto de tetrazólio azul (NBT) a 75 µM, riboflavina a 2 µM e 50 µL do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A reação foi conduzida em uma câmara e iluminada com duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, por 15 min. A atividade da SOD foi estimada através do aumento da absorvância a 560 nm, devido à produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, avaliando-se a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). Os resultados foram expressos em UA g<sup>-1</sup> MS, sendo UA (unidade de atividade enzimática) definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da fotorredução do NBT, no período de 15 min.

#### 3.2.5.3. Peroxidase do ascorbato (APX EC 1.11.1.11)

O meio reacional foi composto por uma mistura contendo tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,0, EDTA a 0,05 mM, ascorbato a 0,015 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03 M e 300µL do extrato enzimático convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A atividade da APX foi estimada pela oxidação do ascorbato, mensurada pelo decréscimo de absorvância a 290 nm. Os resultados foram calculados usando o coeficiente de extinção molar do ascorbato ( $\epsilon = 0,0028 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e expressos em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup>de MS.

#### 3.2.5.4. Peroxidase do guaiacol (G-POD EC 1.11.1.9)

A mistura de reação foi composta por 50µL do extrato convenientemente diluído, 950µL de tampão fosfato de potássio a 0,1M, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM, 500µL de guaiacol a 20 mM e 500µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 60 mM. A atividade da GPOD foi acompanhada pela formação do tetraguaiacol, monitorado pelo aumento da absorvância a 470 nm. Os resultados foram expressos em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup>de MS, usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ( $\epsilon = 0,266 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.2.6 Análise estatística.

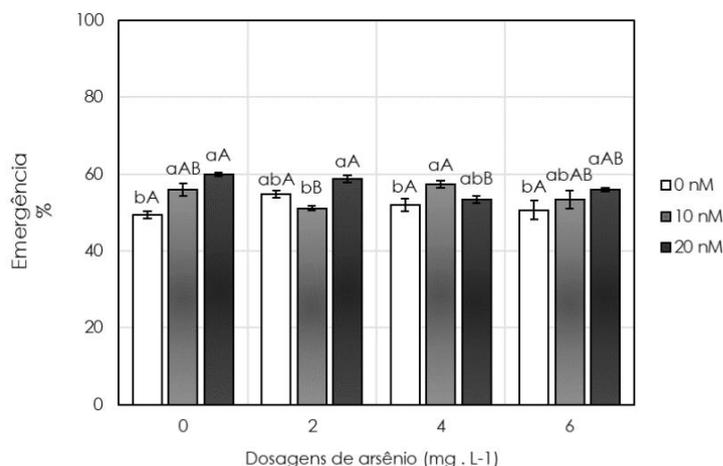
A análise estatística das variáveis e geração dos gráficos foi realizada através do software R Studio versão 1.3.1093 utilizando a biblioteca ExpDes.pt e a função “fat2.dic”, o qual já realiza análise de normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e foi realizado o teste de homoscedasticidade pelo teste de Bartlett, igualmente fazendo a ANOVA e posteriormente teste Post-Hoc de Tukey, para todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

## 3.3 RESULTADO

### 3.3.1. Efeito do As e 24-epibrassinolídeo nos parâmetros biométricos e de emergência.

Os dados de TME, IVE e CVE não mostraram significância estatística pelo teste de Tukey (tabela 1). Os efeitos observados na porcentagem de emergência não foram significativos entre os tratamentos com AS (2,4,6 mg.L<sup>-1</sup>) em relação ao controle (0 mg.L<sup>-1</sup> de AS), sem dosagens de ELB (0 nM) ou com 10 nM. Na concentração de 20 nM de EBL observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre a dosagem de 4mg.L<sup>-1</sup> de AS em relação ao controle, com diminuição de -8,33%. De modo global, a

variação da concentração do metal pouco interferiu na emergência. Em contrapartida, a variação das doses de EBL a afetam positivamente. Encontrou-se aumento de 3,33% no tratamento com 10nM e 13,33% no com 20nM de EBL em relação ao controle (0nM de EBL), nos tratamentos com 0 mg.L<sup>-1</sup> de AS. Nos tratamentos com 2 mg.L<sup>-1</sup> a variação de EBL não teve diferença significativa; entre os com 4 mg.L<sup>-1</sup> a dosagem de 10nM de EBL elevou a porcentagem em 1,67% em relação ao controle; e nos tratamentos com 6mg.L<sup>-1</sup> a única dosagem a ter efeito significativo foi a com 20nM de EBL, com crescimento de 10% comparado ao controle (Figura 3).



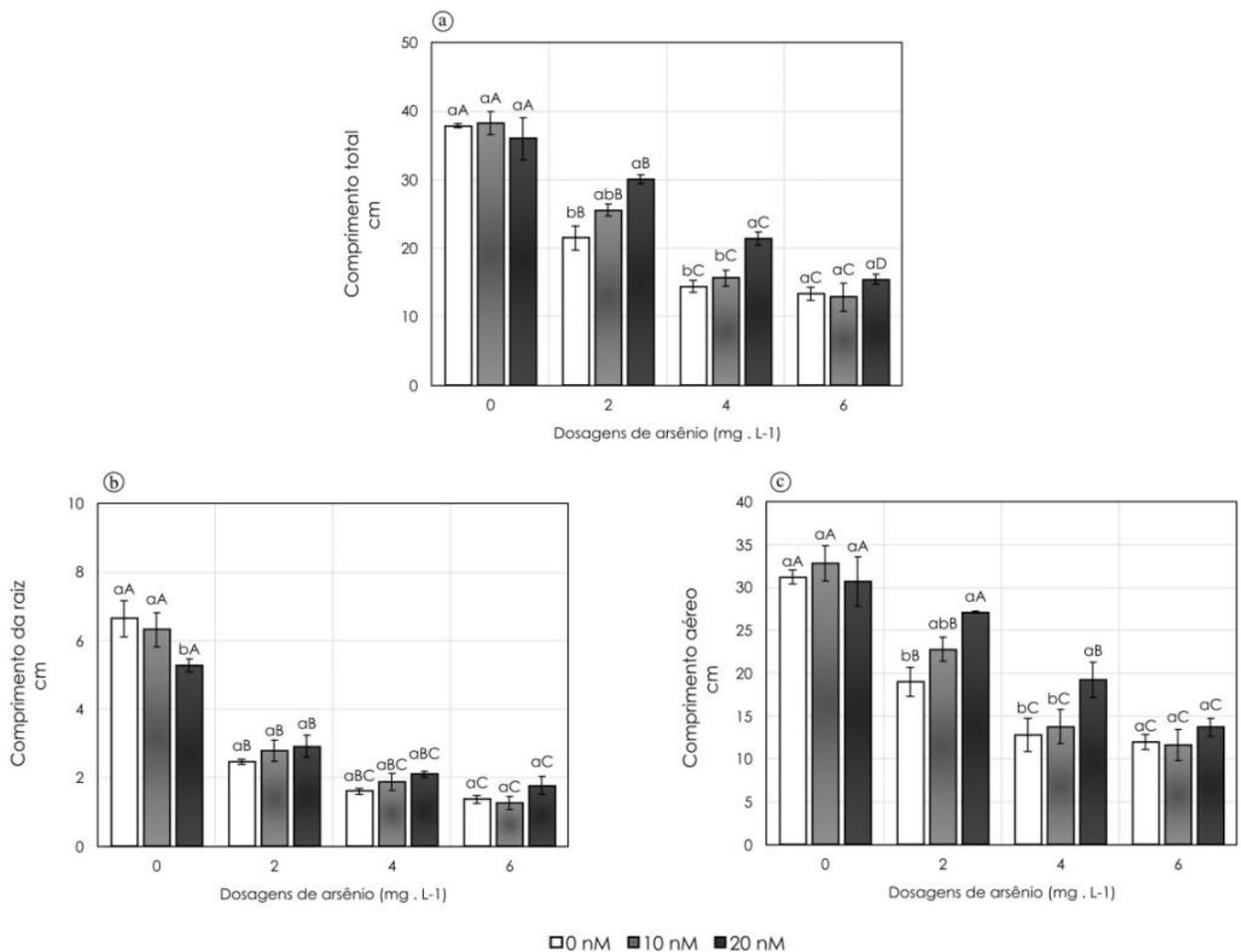
**Figura 3.** Influência do 24-epibrassinolídeo na emergência de sementes de paricá sob estresse por arsênio. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos EBL ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com arsênio ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey.

O efeito da variação de AS no comprimento da parte aérea (Figura 4.c) foi significativo ( $p < 0,05$ ) e negativo, sendo observado redução a medida que a dosagem do metal aumentava (0,2,4,6 mg.L<sup>-1</sup>). Entre os tratamentos com 0 mg.L<sup>-1</sup> de AS e entre os com 6 mg.L<sup>-1</sup> de AS a variação de EBL (0,10 e 20nM) não apresentou efeito significativamente diferente; na condição de 2 mg.L<sup>-1</sup> e na de 4mg.L<sup>-1</sup> houve maior crescimento ao se utilizar 20nM de EBL, em relação ao controle (0nM de EBL).

Nas raízes (Figura 4.b), o efeito negativo da variação do metal nos grupos de tratamentos com EBL (0,10 e 20 nM) gerou redução no comprimento da raiz principal das plântulas, com redução de cerca de 70% em relação ao controle (0mg.L<sup>-1</sup>) já na primeira dosagem de AS (2mg.L<sup>1</sup>), tornando-se ainda menores nas dosagens com

6mg.L<sup>-1</sup> de AS. Enquanto isso a variação da concentração do hormônio não gerou diferenças significativas entre os tratamentos com dosagens de metal.

Por fim, a variação da concentração de AS, em todos os três grupos de dosagens de EBL (0,10,20nM), afetou negativamente o comprimento total (Imagem 1), observando-se valores até 64% menores nas dosagens com 6mg.L<sup>-1</sup> de AS comparado ao controle (0 mg.L<sup>-1</sup>). Em contrapartida, ao se analisar o efeito da variação de EBL nos quatro grupos de tratamentos com metal, percebeu-se efeito positivo das dosagens de 20nM de EBL no comprimento total, nas condições de 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 4.a)



**Figura 4.** Influência do 24-epibrassinolídeo no comprimento de plântulas de paricá sob estresse por arsênio. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos EBL ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com arsênio ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey.



**Imagem 1.** Fotografia de amostras de plântulas selecionadas aleatoriamente como representantes dos seus respectivos tratamentos. Elas foram organizadas em grupos com mesma dosagem de EBL e, da esquerda para direita dos três agrupamentos, observa-se o efeito da variação da dosagem de arsênio (0, 2,4 e 6 mg. L<sup>-1</sup>).

### 3.3.2. Efeito do As e 24- epibrassinolídeo na atividade de enzimas antioxidantes

#### 3.3.2.1. Superóxido Dismutase (SOD)

As análises da enzima SOD (Figura 5. c) mostraram inexistência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entres todos os tratamentos ao se analisar o extrato das folhas, encontrando-se valores entorno de 2 UA. mg<sup>-1</sup> MS. No extrato das raízes, os valores foram maiores que 2 UA. mg<sup>-1</sup> MS, mas nunca superior que 3 UA.mg<sup>-1</sup> MS. Avaliando a variação de As entre tratamentos com mesma dosagem de EBL, na concentração de 0 EBL o aumento de As não alterou a biossíntese da enzima; na de 10EBL e 20 EBL observou-se aumento significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tratamento com 6 mg.L<sup>-1</sup> As e o controle (0 mg.L<sup>-1</sup> de As).

Ao analisar o efeito da variação de EBL entre tratamentos com mesma dosagem de As, observou-se diferença significativa apenas entre os tratamentos com 10 e 20 nM de EBL em relação ao controle na condição de estresse de 6mg.L<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2.2. Ascorbato peroxidase (APX)

As concentrações de Ascorbato peroxidase (Figura 5.a) nas folhas das plantas submetidas as doses de As aumentaram significativamente ( $p < 0.05$ ), tanto no grupo

sem dosagem de EBL quanto no tratamento com máxima dosagem (20 nM). Analisando o efeito do As, mantendo EBL constante, temos: no grupo com 0nM de EBL o incremento na concentração enzimática foi de 71,13% entre o tratamento com maior concentração de arsênio (6 mg.L<sup>-1</sup> de As) em relação ao controle (0 mg.L<sup>-1</sup> de As); com 10nM de EBL não se observou diferença significativa; e com 20nM observou-se incremento 29,33%.

Nas raízes, observou-se diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre o controle e a maior dosagem de As (6mg.L<sup>-1</sup>) somente no grupo sem aplicação de EBL (0nM de EBL). A elevação da atividade entre esses tratamentos (0 e 6mg.L<sup>-1</sup> de AS) no grupo com 0nM de EBL foi de 60,85%.

Mantendo-se a concentração de As constante e avaliando-se o efeito do EBL, encontrou-se nas folhas: nos tratamentos com 2mg. L<sup>-1</sup> de As, ocorreu incremento positivo da enzima na dosagem de 10nM de EBL e com 20nM a concentração dela não se alterou em relação ao controle (sem hormônio); nos com 4mg.L<sup>-1</sup> de As, 10nM não gerou diferença significativa e o uso de 20nM de EBL resultou em redução da concentração de APX; por fim, nos tratamentos com 6mg.L<sup>-1</sup> a dosagem de 10 nM de hormônio desencadeou redução nos valores de enzima, menor que o observado no controle e na dosagem de 20nM que também afetou negativamente a quantidade da enzima. Nas raízes, não se observou deferentes significativas para as dosagens de 20nM, em todos os tratamentos com metal.

E, comparando os dois órgãos, a concentração foi maior nas folhas, nelas os valores de concentração variaram nas folhas de 5,29 a 12,7 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> prot e na raiz de 1,83 a 5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> prot.

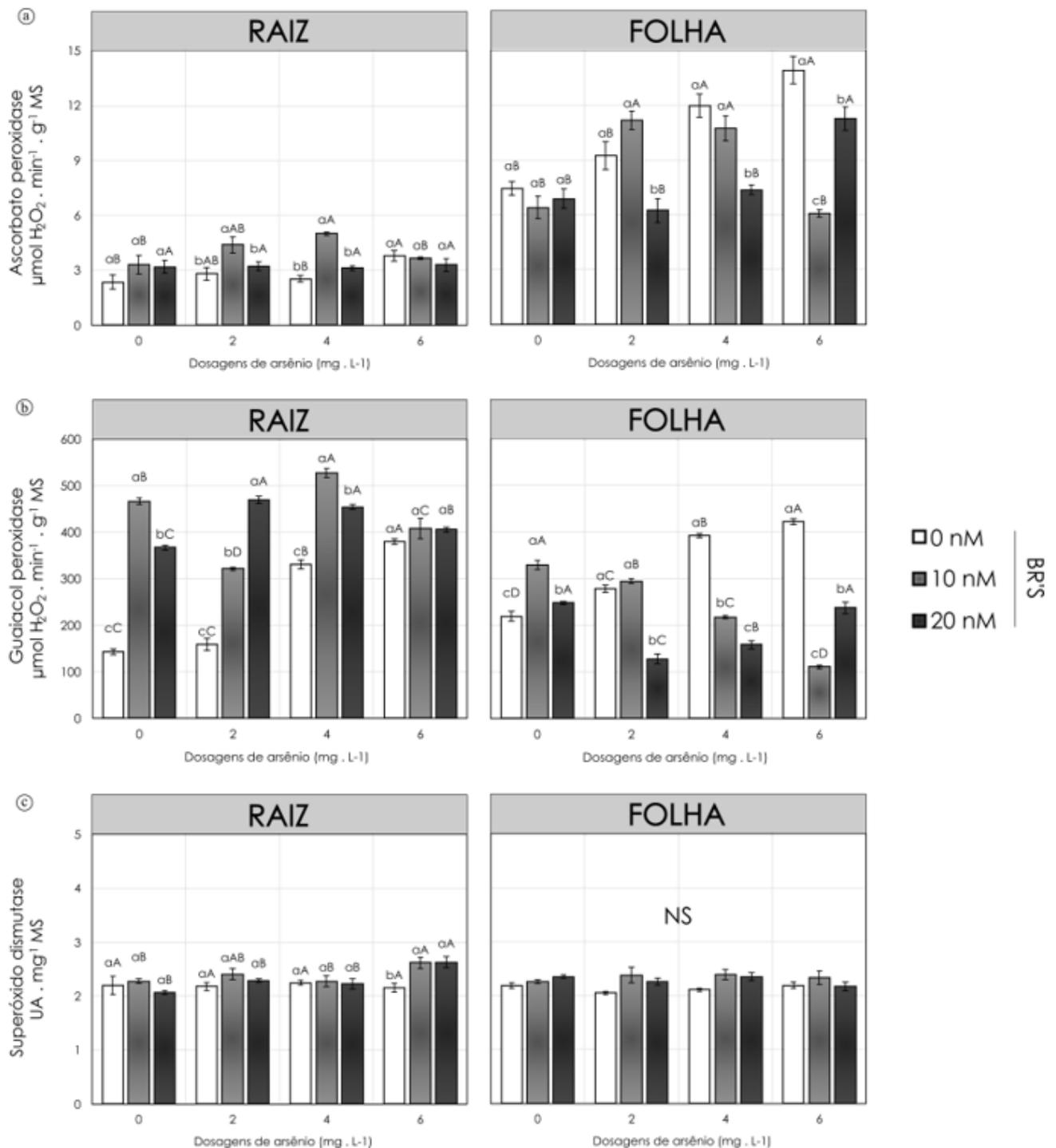
#### 3.3.2.3. Guaiacol peroxidase (G-POD)

Nas análises da enzima G-POD (figura 5.b) pode-se observar nas folhas a concentração enzimática crescendo gradativamente em relação ao controle (26,77% > 50,53% > 92,62%) à medida que as dosagens de arsênio aumentam (2, 4, 6 mg.L<sup>-1</sup>), nos tratamentos com 0nM de EBL. O comportamento muda ao se utilizar 10 nM de EBL, observando-se diminuição gradativa em relação ao controle (-32,66% < -58,99% < -74,55%). No tratamentos com 20nM de EBL há um decaimento inicial seguido de um crescimento gradativo da atividade enzimática (-55,42% > -30% > -16,39%) ao

passo que se eleva as dosagens de metal (2, 4, 6 mg.L<sup>-1</sup>) , mas nunca chegando a ser significativamente maior que o grupo controle (0 mg.L<sup>-1</sup> de As).

Enquanto nas raízes, a concentração enzimática cresce significativamente ( $p < 0.05$ ) nos tratamentos com 0 nM de EBL, observando-se aumento de 176,49% no tratamento com maior dosagem de As (6 mg.L<sup>-1</sup>) em relação ao controle (0 mg.L<sup>-1</sup>). Nos tratamentos com 10 nM, ocorreu decréscimo significativo da atividade equivalente a -56,23%, quando comparado com maior dosagem de As em relação ao controle. E, ao comparar a variação da concentração de As nos tratamentos com 20 nM de EBL obteve-se crescimento equivalente a 12,05%, entre o tratamento com 6 mg.L<sup>-1</sup> de As em relação ao sem As.

Assim, temos que, entre os tratamentos com 6 mg.L<sup>-1</sup>, o tratamento sem EBL teve maior concentração enzimática, tanto nas raízes quanto nas folhas. Entretanto, ao se utilizar o hormônio observou-se estímulo positivo na concentração da enzima na raiz e negativo nas folhas. Foram encontrados valores entre 137,22 a 527,8 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> prot nas raízes e de 110,6 a 421,87 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> prot notando-se, no geral, maior atividade das enzimas nas raízes.



**Figura 5.** Influência do 24-epibrassinolídeo na atividade das enzimas APX (a) e G-POD (b) no sistema radicular e foliar de plântulas de paricá sob estresse por arsênio. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos EBL ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com arsênio ( $p < 0,05$ ) com base no teste de Tukey.

NS: Não significativo a 5% de probabilidade.

### 3.4 DISCUSSÃO

3.4.1. Efeito do As e 24-epibrassinolídeo nos parâmetros biométricos e de emergência.

3.4.1.1. Efeito do As

Os metais pesados afetam negativamente a germinação de sementes em diversas espécies da família *Fabaceae*, reduzindo a porcentagem de germinação e resultando em plantas com crescimento e desenvolvimento menos eficiente (STAMBULSKA et al. 2018). E, esse efeito é mais nocivo quanto maior a concentração do metal, gerando maior redução de sementes germinadas e menor taxa de emergência de plântulas (NATH et al. 2008; STAMBULSKA et al. 2018). As espécie dessa família apresentam diversos representantes tolerantes e fitorremediadores de metais pesados no solo (MAHMUD et al. 2020). Investigação sobre o efeito do arsênio (As, 5, 10, 50  $\mu\text{M}$ ) na emergência e desenvolvimento inicial da espécie *Phaseolus aureus* (*Fabaceae*) concluiu que o As apresenta efeito tóxico na emergência e alongamento da radícula das plântulas (KAUR et al., 2012).

Entretanto, nesse trabalho a variação da concentração de arsênio (0,2,4,6  $\text{mg.L}^{-1}$ ) não gerou diferenças significativas nos parâmetros de emergência avaliados para a espécie utilizada (*Schizolobium amazonicum*). Sabe-se que a tolerância varia de acordo com a espécie estudada, a faixa de concentração e tipo de metal utilizado (MAHMUD et al. 2020).

Conforme observado para outras espécies, o parâmetro que mais é afetado pela dosagem crescente de As é o crescimento radicular (ABEDIN et al. 2002; LIU et al. 2005). Sendo observado o mesmo efeito nos dados apresentados nesse trabalho, nas plântulas de *S. amazonicum*. Já na primeira dosagem de As (2 $\text{mg.L}^{-1}$ ) a redução no tamanho da raiz chegou a mais de 70% em relação ao controle (As - 0  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Estudo com *Cajanus cajan* (*Fabaceae*) utilizando concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de As gerou danos severos na zona de ramificação, observando-se planos de divisão anormais das células do felogênio e do câmbio e desintegração das células do parênquima adjacentes às raízes laterais (PITA-BARBOSA et al., 2015).

3.4.1.2. Efeito do EBL

Os brassinosteróides são hormônio que afetam diversas características morfológicas e fisiológicas das plantas, podendo desempenhar diversos papéis no crescimento da raiz (PLANAS - RIVEROLA et al., 2019; HACHAM et al., 2011), crescimento da parte aérea (BAJGUZ et al., 2020) e proporcionam aumento no percentual de germinação de sementes (RAO et al., 2002). Somado a isso, podem atenuar os efeitos tóxicos de metais pesados por atuarem em processos fisiológicos de resposta ao estresse, interagindo com reguladores de crescimento vegetal ou outros hormônios, ajustando o crescimento e desempenho da planta (TREVISAN et al., 2020; AHAMMED et al., 2015).

No presente estudo, ocorreu efeito mitigador da toxicidade na porcentagem de emergência, evidenciado pelo aumento do número de plântulas que emergiram ao se usar 20nM de EBL no tratamento com 6mg.L<sup>-1</sup> quando comparado ao tratamento com mesma condição de estresse, mas sem dosagem de EBL. Em *Lepidium sativum* L. a aplicação de 24-epibrassinolídeo teve efeito positivos na germinação (RAO et al., 2002). Entretanto, não está bem fundamentado como esse hormônio atua na germinação de sementes (JORGE et al., 2019).

No comprimento da raiz, não se observou efeito atenuante do hormônio, mas a variação da dosagem de EBL gerou incremento no tamanho da raiz nos tratamentos com 0 mg.L<sup>-1</sup> de As. Na parte aérea, a concentração de 20nM de EBL permitiu as plântulas atingirem maior comprimento comparado ao controle (0 nM de EBL), nos tratamentos com 2 mg.L<sup>-1</sup> e 4 mg.L<sup>-1</sup> de As, portanto atenuando o efeito tóxico do metal. Esse efeito positivo dele está de acordo com a literatura, uma vez que os brassinosteroides estão envolvidos no alongamento e divisão celular (LARRÉ et al., 2014). E, a dosagem usada, o tempo e o modo de aplicação são importantes, pois estão diretamente relacionados a resposta da planta (GOMES, 2011).

#### 3.4.2. Efeito do As e 24-epibrassinolídeo no sistema antioxidante.

##### 3.4.2.1. SOD

As superóxidos dismutases (SODs) são enzimas que catalisam a dismutação de O<sub>2</sub> •- para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (BOWLER et al., 1994). Atuando na primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio geradas como resíduos de muitas oxidações biológicas, que são intensificadas quando a planta está sobre estresse abiótico ou/e biótico, por exemplo, o estresse causado por metais pesados (KERCHEV; VAN

BREUSEGEM, 2022; SAIBI; BRINI, 2018). Consequentemente, o nível de atividade dela é importante para tolerância da planta ao estresse por metais.

Nesse trabalho, observou-se que o incremento da dosagem de As não resultou em alterações significativas na quantidade de SOD em folha e raiz em plantas de Paricá,. Provavelmente, devido as dosagens do metal utilizado não terem gerado alterações nos níveis de superóxido ao ponto de desencadear cascatas de transdução de sinal para biossíntese da SOD (MISHRA; SHARMA, 2019). Entretanto, pesquisas com espécies como *Zea mays*, *Trifolium pratense*, *Pteris vittata* e *Pteris ensiformis*, *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* mostram que após exposição ao As há aumento na atividade da SOD (MYLONA *et al.*, 1998; MASCHER *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2006; SANTOS, 2006). Em Pesquisas com *Glycine max L.* (Fabaceae) a exposição ao As diminuiu significativamente a atividade da SOD (CHANDRAKAR *et al.*, 2017). E, pesquisas com Paricá mostram padrões diferentes de resposta ao se utilizar níquel ou cádmio como condição de estresse, havendo aumento e diminuição da quantidade de SOD com elevação da dosagem do metal, respectivamente (ROSÁRIO, 2022; NASCIMENTO, 2019). Esses trabalhos mostram variação do padrão da atividade da enzima SOD de acordo com a espécie estudada e metal utilizado para gerar estresse.

Sobre os efeitos do EBL, não se observou efeito positivo ou negativo das dosagens de EBL nos tecidos analisados nesse estudo. Contudo, pesquisas com *Arabidopsis thaliana* mostram aumento da tolerância ao As com utilização do hormônio, relacionado a elevação da atividade da SOD e outras enzimas (SURGUNACAR; ZEMHERI-NAVRUZ, 2019). O mesmo efeito positivo foi encontrado em *Glycine max L* (CHANDRAKAR *et al.*, 2017).

Diante disso, não foi possível, usando-se essa enzima como indicadora, observar efeito atenuante para as dosagens de EBL utilizadas, tão pouco variações na atividade da enzima diante das condições de estresse.

#### 3.4.2.2. APX

Ascorbato peroxidase (APX) é uma enzima que atua nas plantas para manter os níveis de EROs sobre controle, reestabelecendo a homeostase das células sobre estresse (PANDEY *et al.*, 2017). Ela utiliza ascorbato como doador de elétrons para catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água.

Os achados desse estudo mostram aumento de APX como reação a elevação da concentração do arsênio, principalmente nas folhas. A expressão induzida de APX também foi observada sob estresse de arsênio em *Brassica juncea* (L.), *Glycine max*, *Camellia sinensis* L. como resposta do sistema de defesa da planta contra os radicais livres produzidos durante a condição de estresse (KHAN; AHMAD, 2009; AHMAD et al., 2020; LI et al., 2021). E, resposta diferencial entre os órgãos folha e raiz foram relatados na literatura em estudo com alho cultivado em regime de alto teor de As, com maior atividade no primeiro (Ruíz-Torres et al., 2017). Esse diferente padrão de resposta pode está relacionado a disponibilidade de substrato ( $H_2O_2$ ) e/ou atividade de outras enzimas que também convertem  $H_2O_2$ , havendo modulação diferente da expressão de APX nos órgãos (ZULFIQAR; ASHRAF, 2021). Isso está de acordo com os achados desse trabalho que mostram alta atividade de G-POD nas raízes, enzima que também atua eliminando peróxido de hidrogênio. Nascimento (2019) trabalhando com plantas jovens de Paricá e cádmio como condição de estresse também encontrou padrão de resposta diferencial entre tecidos para as enzimas APX e G-POD.

Quanto ao efeito do EBL, as dosagens mais altas resultaram em menor quantidade de enzima, quando os tratamentos estavam sobre estresse. CHANDRAKAR et al. (2017) ao avaliar o efeito do EBL como atenuante constatou aumento da atividade de APX nas radículas de *Glycine max* L. concluindo que isso afetou positivamente o desenvolvimento da planta. Outros trabalhos sobre os efeitos do EBL na mitigação da toxidez dos metais relacionam o aumento da expressão das enzimas antioxidantes a maior tolerância, por lógica, devido acelerar o processo conversão de EROs em produtos não reativos (SARAIVA, 2021). Isso induz a pensar que nesse trabalho não ocorreu efeito atenuante, entretanto os dados biométricos coletados da parte aérea, dos tratamentos com doses de 20nM de EBL, apresentaram melhor crescimento, evidenciando ação atenuante do hormônio. Logo, esse decréscimo de APX pode, por exemplo, ser evidência da menor produção de EROS ou maior ação de outras enzimas ou melhor desempenho do sistema não enzimático de combate ao estresse, como resultado da ação do EBL (BAJGUZ; HAYAT, 2009).

Assim, percebe-se a atuação do arsênio como agente promotor de estresse oxidativo que leva a maior produção de APX. Essa biossíntese da enzima é menor nos grupos com doses de 20nM de hormônio, o que poderia indicar menor produção de EROs.

#### 3.4.2.3.

#### G-POD

A Guaiacol Peroxidase atua sobre o mesmo substrato da APX, eliminando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do organismo da planta para evitar danos oxidativos (GARCIA-CAPARROS et al., 2021).

As plântulas de Paricá avaliadas apresentaram, sem dosagem de EBL, incremento na quantidade de G-POD como reação ao estresse por As, com respostas semelhantes nas folhas e raízes. Sendo o oposto ao encontrado nas análises de Nascimento (2019), as quais mostram decréscimo da quantidade da enzima ao se elevar as dosagens de Cádmio, em estudo com plantas jovens de *S. amazonicum*. Porém, estando de acordo ao observado no trabalho de Rosário (2022) que ao trabalhar com essa mesma espécie observou elevação da concentração de G-POD como resposta ao incremento das dosagens de Níquel. Isso evidencia que o sistema de defesa antioxidante é modulado de diferentes formas a depender do tipo de estresse metálico.

Quando aplicado dosagens de EBL nos tratamentos com diferentes concentrações de metal, observou-se padrões de respostas opostos. Nas raízes o hormônio modulou positivamente a biossíntese de G-POD e nas folhas negativamente. Isso pode está relacionado ao equilíbrio entre essa enzima e outros mecanismos fisiológicos que atuam sobre o mesmo substrato, como a APX que teve maior atividade nas folhas (GARCIA-CAPARROS et al., 2021). Sabe-se que o efeito atuante dos Brassinosteróides sobre a toxicidade dos metais pode ocorrer por aumento da peroxidação lipídica, conteúdo de prolina, nível de antioxidantes, conteúdo total de osmólitos e concentração de íons sódio e potássico, embora pouco ainda se saiba sobre como esse hormônio induz mecanismos moleculares de tolerância (RAJEWSKA; TALAREK; BAJGUZ, 2016).

Dessa maneira, a indução de maior biossíntese dessa enzima nas raízes pelo EBL, o órgão mais afetado pelo As, evidencia o papel importante dela nessa região na eliminação do peróxido de hidrogênio e, portanto, do efeito atenuante do hormônio.

### **3.5 Conclusão**

O arsênio pouco afetou os parâmetros de emergência analisados. As raízes foram os órgãos mais afetados em todos os tratamentos e nenhuma dose de EBL conseguiu mitigar o efeito tóxico do As nessa parte da planta. De uma perspectiva

global, pode-se afirmar que dosagens de 24- epibrassinolídeo na concentração de 20nM apresentaram efeito atenuante contra a toxicidade causada por arsênio, evidenciado pelo acréscimo na porcentagem de emergência, melhor crescimento da parte aérea e aumento da atividade da G-POD na raiz. Entretanto, não foi o suficiente para evitar os danos causados pela condição de estresse gerada pelo metal.

## REFERÊNCIAS

ABEDIN, M. J.; FELDMANN, J.; MEHARG, A. A. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. **Plant physiology**, v. 128, n. 3, p. 1120-1128, 2002.

AHAMMED, G. J. et al. Enhanced photosynthetic capacity and antioxidant potential mediate brassinosteroid-induced phenanthrene stress tolerance in tomato. **Environmental Pollution**, v. 201, p. 58-66, 2015.

AHMAD, P. et al. Zinc oxide nanoparticles application alleviates arsenic (As) toxicity in soybean plants by restricting the uptake of as and modulating key biochemical attributes, antioxidant enzymes, ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 825, 2020.

ALAM, M. M. et al. Effect of 28-homobrassinolide on nickel induced changes in Brassica juncea. **Photosynthetica**, v. 45, n. 1, p. 139, 2007.

ALLOWAY, B.J. Heavy metals in soils. Ed. Blackie Academic & Professional. New York, John Wiley & Sons, 1990. 1-39 p (APUD: BIONDI, Caroline Miranda. Teores naturais de metais pesados nos solos de referência do estado de Pernambuco. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.)

ALMEIDA, D. H. de et al. Caracterização completa da madeira da espécie amazônica Paricá (*Schizolobium amazonicum* HERB) em peças de dimensões estruturais. **Revista Árvore**, v. 37, p. 1175-1181, 2013.

BAJGUZ, A.; CHMUR, M.; GRUSZKA, D. Comprehensive overview of the brassinosteroid biosynthesis pathways: substrates, products, inhibitors, and connections. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1034, 2020.

BAJGUZ, A.; HAYAT, S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. **Plant physiology and biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 1-8, 2009.

BOWLER, C. et al. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, n. 3, p. 199-218, 1994.

CHANDRAKAR, V. et al. Respostas genotóxicas induzidas por arsênico e sua melhoria por difenileno iodônio, 24-epibrassinólido e prolina em *Glycine max* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 112, p. 74-86, 2017.

CHEN, J. et al. Arabidopsis WRKY46, WRKY54, and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses. **The Plant Cell**, v. 29, n. 6, p. 1425-1439, 2017.

FRANÇA, A. C. M. D. Levantamento florístico e características anatômicas de espécies nativas do cerrado em solos contaminados por metais pesados. Dissertação (Mestrado em ecologia aplicada). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2011.

GARCIA-CAPARROS, P. et al. Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. **The Botanical Review**, v. 87, n. 4, p. 421-466, 2021.

GOUVEIA, L. Resíduos Sólidos Urbanos-impactos socioambientais e perspectiva de manejo sustentável com inclusão social. **Ciência & Saúde Coletiva**. São Paulo, 2012.

HACHAM, Y. et al. Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. **Development**, v. 138, n. 5, p. 839-848, 2011.

HASAN, S. A. et al. 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. **Environmental pollution**, v. 151, n. 1, p. 60-66, 2008.

HAYAT, S. et al. Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 1, p. 33-41, 2007.

KAUR, S. et al. Arsenic (As) inhibits radicle emergence and elongation in *Phaseolus aureus* by altering starch-metabolizing enzymes vis-à-vis disruption of oxidative metabolism. **Biological Trace Element Research**, v. 146, n. 3, p. 360-368, 2012.

KERCHEV, P. I.; VAN BREUSEGEM, F. Improving oxidative stress resilience in plants. **The Plant Journal**, v. 109, n. 2, p. 359-372, 2022.

KHAN, I.; AHMAD, A.; IQBAL, M. Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 626-634, 2009.

- LI, X. et al. Melatonin-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis and antioxidant defense confer tolerance to arsenic stress in *Camellia sinensis* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123922, 2021.
- MAHMUD, J. A. et al. Response and tolerance of Fabaceae plants to metal/metalloid toxicity. In: **The Plant Family Fabaceae**. Springer, Singapore, 2020. p. 435-482.
- MASCHER, R. et al. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. **Plant Science**, v.163, n.5, p.961-969, 2002.
- MISHRA, P. S., P. Superoxide dismutases (SODs) and their role in regulating abiotic stress induced oxidative stress in plants. Reactive oxygen, Nitrogen and Sulfur species in plants, pp.53-88, 2019.
- MYLONA, P. V.; POLIDOROS, A. N.; SCANDALIOS, J. G. Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. **Free Radical Biology & Medicine**, v.25, n.4, p.576-585, 1998.
- NASCIMENTO, V. R. **Avaliação nutricional e sistema antioxidante em plantas jovens de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) submetidas à diferentes doses de Cádmio**. 2019. Dissertação de mestrado. UFRA – Campus Belém.
- PANDEY, S. et al. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 581, 2017.
- PITA-BARBOSA, A.; GONÇALVES, E. C.; AZEVEDO, A. A. Morpho-anatomical and growth alterations induced by arsenic in *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae). **Environmental science and pollution research**, v. 22, n. 15, p. 11265-11274, 2015.
- PLANAS-RIVEROLA, A. et al. Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. **Development**, v. 146, n. 5, p. dev151894, 2019.
- RAJEWSKA, I.; TALAREK, M.; BAJGUZ, A. Brassinosteroids and response of plants to heavy metals action. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 629, 2016.
- RAJEWSKA, Iwona; TALAREK, Marta; BAJGUZ, Andrzej. Brassinosteroids and response of plants to heavy metals action. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 629, 2016.

ROSÁRIO, F. S. **Eficiência do sistema antioxidante em plantas jovens de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) submetidas à diferentes doses de níquel.** 2022. Dissertação de mestrado. UFRA-Campus Belém.

RUIZ-TORRES, C. et al. Arsenic-induced stress activates sulfur metabolism in different organs of garlic (*Allium sativum* L.) plants accompanied by a general decline of the NADPH-generating systems in roots. **Journal of plant physiology**, v. 211, p. 27-35, 2017.

SAIBI, W.; BRINI, F. Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: An overview. **Superoxide Dismutase: Structure, Synthesis and Applications; Magliozzi, S., Ed**, p. 101-142, 2018.

SANTOS, G. A. Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao arsênio. 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

SARAIVA, M. P. et al. **24-Epibrassinolide induz proteção contra o excesso de níquel em plantas de soja.** 2021. Tese de doutorado. UFRA – Campus Belém.

SENEVIRATNE, M. et al. Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 41, n. 4, p. 1813-1831, 2019.

SHAH, V.; DAVEREY, A. Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. **Environmental Technology & Innovation**, v. 18, p. 100774, 2020.

SHAW, B. P. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. **Biologia Plantarum**, v. 37, n. 4, p. 587-596, 1995.

SINGH, N. et al. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. **Plant Science**, v.170, n.2, p.274-282, 2006.

SOARES, Cristiano et al. Effect of 24-epibrassinolide on ROS content, antioxidant system, lipid peroxidation and Ni uptake in *Solanum nigrum* L. under Ni stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 122, p. 115-125, 2016.

SOUZA, E. P.; SILVA, I. F.; FERREIRA, L. E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. *Current Agricultural Science and Technology*, 2011.

SYTAR, Oksana et al. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. ***Acta physiologiae plantarum***, v. 35, n. 4, p. 985-999, 2013.

TREVISAN, S. et al. Brassinosteroid application affects the growth and gravitropic response of maize by regulating gene expression in the roots, shoots and leaves. ***Plant Growth Regulation***, v. 92, n. 1, p. 117-130, 2020.

TRIPATHI, Rudra D. et al. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. ***Trends in biotechnology***, v. 25, n. 4, p. 158-165, 2007.

VARDHINI, B. Vidya et al. Application of brassinolide mitigates saline stress of certain metabolites of sorghum grown in Karaikal. ***Journal of Phytology***, v. 4, n. 4, p. 1-3, 2012.

ZULFIQAR, Faisal; ASHRAF, Muhammad. Antioxidants as modulators of arsenic-induced oxidative stress tolerance in plants: An overview. ***Journal of Hazardous Materials***, p. 127891, 2021.



