

Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde

Bacharelado em Ciências Biológicas

***Lactuca sativa* L.: BIOINDICADOR VEGETAL PARA AVALIAÇÃO
DE TOXICIDADE DE Zn e Cu**

Beatriz Fermino

Abril/2022

Rio Verde – GO

Beatriz Fermino

***Lactuca sativa* L.: BIOINDICADOR VEGETAL PARA DE
TOXICIDADE DE Zn e Cu**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia Goiano -
Campus Rio Verde, como parte das
exigências para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça

Coorientador: Dr. Lucas Anjos de Souza

Abril/2022

Rio Verde – GO

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

F3591 FERMINIO, BEATRIZ
Lactuca sativa L.: BIOINDICADOR VEGETAL PARA
AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE Zn e Cu / BEATRIZ
FERMINIO; orientadora MARIA ANDRÉIA CORRÊA MENDONÇA;
co-orientador LUCAS ANJOS DE SOUZA. -- Rio Verde,
2022.
33 p.

TCC (Graduação em Bacharelado em Ciências
Biológicas) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2022.

1. : Fitotoxicidade . 2. Elementos-traço,. 3.
Estresse oxidativo. 4. Guaiacol peroxidase. 5.
Ascorbato peroxidase. I. MENDONÇA, MARIA ANDRÉIA
CORRÊA, orient. II. SOUZA, LUCAS ANJOS DE, co-
orient. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 23/2022 - DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Ao sétimo dia do mês de abril de 2022, às 9 horas, reuniu-se a banca examinadora composta pelos docentes Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça (orientadora), Dr. Lucas Anjos de Souza (membro) e pela Ma. Samylla Tássia Ferreira de Freitas (membro), para examinar o Trabalho de Curso intitulado: “ ***Lactuca sativa L.*: BIOINDICADOR VEGETAL PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE Zn e Cu** ” apresentado pela estudante Beatriz Fermino, Matrícula nº 2018102230540500, do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do IF Goiano – Campus Rio Verde. A palavra foi concedida a estudante para a apresentação oral do Trabalho de Curso, e em seguida, houve arguição da candidata pelos membros da banca examinadora. Após tal etapa, a banca examinadora decidiu pela APROVAÇÃO da estudante. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata que segue assinada pelos membros docentes da banca.

(Assinado Eletronicamente)

Profa. Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça

Orientadora

(Assinado Eletronicamente)

Prof. Dr. Lucas Anjos de Souza

Membro

(Assinado Eletronicamente)

Ma. Samylla Tássia Ferreira de Freitas

Membro

Observação:

() O(a) estudante não compareceu à defesa do projeto.

Documento assinado eletronicamente por:

- Samylla Tassia Ferreira de Freitas, 2020102320140196 - Discente, em 07/04/2022 19:42:37.
- Lucas Anjos de Souza, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 07/04/2022 15:39:31.
- Maria Andreia Correa Mendonca, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 07/04/2022 15:15:51.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 07/04/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 376257

Código de Autenticação: 42767c9e52



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

AGRADECIMENTOS

“Agradeço a minha família pelo apoio e incentivo, aos meus milhares de irmãos (que são 4) e, principalmente, à minha mãe e ao meu pai, que sempre me apoiaram em minhas decisões”

“Agradeço ao meu companheiro, Matheus André, por nunca ter me deixado desistir e por sempre me apoiar e acreditar em mim.”

“Agradeço à minha orientadora, professora Maria Andréia, pelo aprendizado, confiança, dedicação, presentinhos e principalmente pela oportunidade que me deu.”

“Agradeço ao meu coorientador, professor Lucas, pelos ensinamentos do incrível e fantástico mundo das enzimas. “Deus abençoe a catalase!”

“Agradeço aos amigos que criei ao longo desta caminhada, principalmente a Samara, o Valdeir e o Gustavo, que fizeram os meus dias melhores e por me ajudarem a não desistir.”

“Agradeço ao monitor de Laboratório de Bioquímica e Genética, João Lucas, por ter me ajudado nesses meses que foram uma loucura. Sou imensamente grata por você ter me ajudado.”

“Agradeço ao professor Jânio e ao Marco Antônio, pelos ensinamentos e oportunidades que me deram ao longo da minha graduação.”

“Agradeço aqueles que, de alguma forma, me ajudaram na conclusão deste trabalho e que me ajudaram a crescer profissionalmente. Sou imensamente grata a todos vocês.”

RESUMO

Os elementos-traço têm despertado preocupação por sua capacidade de acumulação, migração e transporte no solo, podendo ser tóxico, até em baixas concentrações, para plantas, animais e humanos. Estudos ecotoxicológicos propõem testes de toxicidade com organismos, chamados de bioensaios. Entre os bioensaios destaca-se a utilização de vegetais, que são considerados mais sensíveis e simples em relação aos estudos com animais e que por apresentarem características desejáveis como rapidez no crescimento, baixo custo, alta sensibilidade e boa correlação com modelos animais, estão sendo amplamente utilizados em estudos de prospecção de efeitos de poluentes ambientais. Neste sentido, a presente proposta utilizou análises do crescimento radicular e análises enzimáticas (resposta ao estresse oxidativo) em *Lactuca sativa* L. (alface) como estratégia para a avaliação da fitotoxicidade de sulfato de cobre (CuSO_4) e sulfato de zinco (ZnSO_4). Para isso, foram testadas cinco concentrações de CuSO_4 , que variam de 1,0 mg/L a 15mg/L, e cinco concentrações de ZnSO_4 , que variam de 5mg/L a 25mg/L. Foi utilizada Trifuralina (0,84 ppm) como controle positivo e água destilada como controle negativo. A partir dos dados obtidos de crescimento, foi possível demonstrar que houve danos fitotóxicos tanto nos tratamentos Zn C3 (15 mg/L), Zn C4 (20mg/L), Zn C5 (25mg/L), Cu C4 (10mg/L) e Cu C5 (15mg/L). No entanto, por meio das avaliações das atividades específicas das enzimas guaiacol peroxidase (GPOX) e ascorbato peroxidase (APX), não foi possível verificar se houve danos causados pelos tratamentos utilizados.

Palavra-chave: Fitotoxicidade; elementos-traço, estresse oxidativo; guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase.

ABSTRACT

There is a growing concern about the presence of trace elements because of their characteristics of accumulation, migration, and transport in the soil. Even in low concentrations, trace elements can be toxic to plants, animals, and humans. Ecotoxicological studies includes toxicity tests called bioassays. Among the bioassays, the use of plants has been increasing, as these models are considered more sensitive and relatively simple when compared to studies with animals, since plants presents desirable characteristics such as rapid growth, low cost, high sensitivity, and good correlation with animal models. Because of this, they have been widely used in studies aiming at to prospect the effects of environmental pollutants. In this study we performed root growth measurements and enzymatic analyzes (response to oxidative stress) in *Lactuca sativa* L. (lettuce) as a strategy for the evaluation of phytotoxicity of copper sulfate (CuSO₄) and zinc sulfate (ZnSO₄). Five concentrations of CuSO₄, ranging from 1.0 mg/L to 15mg/L, and five concentrations of ZnSO₄, ranging from 5mg/L to 25mg/L were tested. Trifluraline (0.84 ppm) was used as a positive control and distilled water as a negative control. From the growth data obtained, it was possible to demonstrate that there were phytotoxic damages both in the treatments Zn C3 (15 mg/L), Zn C4 (20mg/L), Zn C5 (25mg/L), Cu C4 (10mg/L) and Cu C5 (15mg/L). However, through the evaluation of the specific activities of the enzymes guaiacol peroxidase (GPOX) and ascorbate peroxidase (APX), it was not possible to verify if there were damages caused by the treatments used.

Keywords: Phytotoxicity; trace elements, oxidative stress; guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	3
	2.1. Elementos-traço.....	3
	2.2. Danos causados por Zn e Cu em plantas.....	4
	2.3. Estresse oxidativo.....	4
	2.4. Bioensaios em modelos vegetais.....	5
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	7
	3.1. Material vegetal.....	7
	3.2. Soluções	7
	3.3. Análise macroscópica do material vegetal	8
	3.4. Extração proteica e atividades das enzimas APX e GPOX.....	10
	3.5. Análises estatísticas.....	11
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
	4.1. Análise do Crescimento Radicular	12
	4.1. Extração proteica e atividades das enzimas APX e GPOX.....	15
5	CONCLUSÕES	18
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Modelo de exposição das sementes às concentrações crescentes de zinco e cobre em placas de Petri. -----**8**
- Figura 2** – Exemplo de fotografia utilizada para aferição dos tamanhos das raízes no software ImageJ. -----**9**
- Figura 3** – Índice de Crescimento Radicular (ICR) das raízes de *Lactuca sativa* (alface) após 24, 48 e 72 horas de exposição às concentrações crescentes de zinco e cobre, controle positivo (Trifluralina 0,84 ppm) e controle negativo (H₂O). -----**13**
- Figura 4** – **Figura 4** – Média de crescimento radicular (MCR) das raízes de *Lactuca sativa* (alface) em 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C), durante o período de exposição às concentrações crescentes de zinco e cobre, controle positivo (Trifluralina 0,84 ppm) e controle negativo (H₂O). As médias indicadas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste deTukey a 5% de probabilidade. -----**14**
- Figura 5** – **Figura 5** – Proteína solúvel total e atividades de enzimas antioxidantes em raízes de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes de zinco e cobre. Proteína Total (A); Atividade específica de Ascorbato Peroxidase (APX) (B); Atividade específica de Guaiacol Peroxidase (GPOX) (C). As médias indicadas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste deTukey a 5% de probabilidade. -----**26**

LISTA DE TABELA

- Tabela 1** - Equivalência entre concentrações comum e molar de zinco (Zn) e cobre (Cu).**8**

1 INTRODUÇÃO

O ambiente está constantemente exposto a diversos produtos químicos de fontes naturais e antropogênicas (XU et al., 2016), que podem atuar como poluentes. Os poluentes do solo são persistentes e a capacidade de acumulação, migração e transporte destas substâncias têm despertado preocupação (CHEN et al., 2020), uma vez que mesmo em baixas concentrações, como no caso de alguns elementos-traço, como o cádmio, elas podem ser tóxicas para as plantas, animais e humanos (SHAHID et al., 2014).

Os micronutrientes são elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas, no entanto, são necessários em concentrações menores que as dos macronutrientes (ALMEIDA; GUIMARÃES, 2017). Assim, estes elementos, em altas concentrações (ou em concentrações superiores às requeridas e toleradas pelos seres vivos), são prejudiciais às plantas e outros organismos vivos, afetando seus órgãos, alterando processos bioquímicos, organelas e membranas celulares, além de causar danos à saúde pública, são reativos e bioacumuláveis (OLIVEIRA; OLIVEIRA 2011), ficando retidos no ecossistema (CARNEIRO et al., 2011). No entanto, essa toxicidade está associada às concentrações (maiores que diferentes organismos necessitam), o tempo de exposição, dispersão, e à presença ou ausência de outros elementos que podem agravar a sua toxicidade (ELEKES et al., 2010).

Alguns desses elementos são essenciais para várias funções fisiológicas nos organismos vivos, enquanto outros não possuem funções biológicas conhecidas (CARNEIRO et al., 2001, LASAT, 2002, OLIVEIRA; OLIVEIRA 2011). Neste sentido, os efeitos químicos, biológicos e fisiológicos da exposição das plantas a elementos-traço são motivo de crescente preocupação, já que possuem potencial de se acumular e entrar na cadeia alimentar afetando assim o homem e o meio ambiente (SARMA et al., 2012; SHAHID et al., 2014).

A formação de radicais derivado do oxigênio são em dose dependente, quando em baixa concentrações atua no transporte de elétrons na cadeia respiratória, funcionando como moléculas sinalizadoras (DOWNLING; SIMMONS, 2009). De modo geral, a presença dos elementos-traço pode desencadear uma série de danos, podendo levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). A fim de proteger as células do estresse oxidativo causado pela produção de ERO, é possível avaliar a

atividade de enzimas antioxidantes que são responsáveis pela eliminação de ERO (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011).

Para isso, os bioensaios são metodologias disponíveis para determinar a ação de compostos tóxicos nos seres vivos, tornando-se uma alternativa na avaliação da toxicidade ambiental, em organismos teste, por meio de monitoramento de efeitos letais e subletais (NEUHAUSER et al., 1985). Em modelos de plantas superiores, os bioensaios são amplamente utilizados por desenvolver características desejáveis como rapidez no crescimento, baixo custo e alta sensibilidade (GRANT, 1994; TIGRE et al., 2012) e vem sendo amplamente usados para avaliar os efeitos biológicos de substâncias ou de compostos complexos de diversas origens, contaminadas com hidrocarbonetos, corantes e agrotóxicos (revisado por ARAGÃO et al., 2020).

Em trabalhos anteriores, realizados no Laboratório de Bioquímica e Genética, nós tivemos a oportunidade de verificar que a água residuária de suinocultura processada em biodigestor (ARS) causou efeitos genotóxica e citotóxica em células do meristema radicular de *Allium cepa* L. (cebola) (SILVA, 2019). No referido trabalho, o efeito observado foi atribuído à alta presença cobre e zinco. No entanto, não foram encontrados trabalhos que descreveram o efeito desses metais, em concentrações semelhantes aos presentes na ARS, isoladamente, ou em conjunto, em organismos-não-alvos. Portanto, este estudo foi realizado com intuito de demonstrar que a presença dos metais pesados pode ser a causa dos efeitos ecotoxicológicos observados por Silva (2019). Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a germinação e o crescimento radicular de sementes do bioindicador *Lactuca sativa* L. (alface) expostas a diferentes concentrações de sulfato cobre (CuSO_4) e sulfato de zinco (ZnSO_4). Também foi realizada uma abordagem bioquímica, por meio da realização de ensaios enzimáticos, visando verificar se doses crescentes de cobre e zinco induzem algum tipo de resposta ao estresse oxidativo nas plântulas germinadas na presença destes elementos-traço.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Elementos-traço

Os elementos-traço são aqueles de alta densidade que possuem uma massa específica maior que 5 g cm^{-3} (EPSTEIN; BLOOM, 2006). A sua origem se dá por dois métodos: litogênicos (provenientes de fontes geológicas, como rochas) e antropogênicos (proveniente de ações humanas, como mineração, agrotóxicos e dejetos) (ALLOWAY, 1995). Dentre os principais elementos encontrados no solo, cita-se o Cádmio (Cd), Cobre (Cu), Chumbo (Pb), Zinco (Zn), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Bário (Ba), Argônio (Ag), Cobalto (Co), Mercúrio (Hg) e Antimônio (Sb) (MARSOLA et al., 2004, OLIVEIRA; OLIVEIRA 2011).

O zinco (Zn) é um micronutriente, que pode ser encontrado como componente estrutural de várias proteínas, o que o torna essencial para os organismos, sendo considerado indispensável para o crescimento de plantas (LI et al., 2002). A deficiência de Zn em plantas pode acarretar a redução da produtividade, diminuição na qualidade nutricional de grãos, redução drástica da síntese de proteínas, retardo no crescimento, clorose internerval, além de necrose no meristema apical (BROADLEY et al., 2007). A toxicidade do Zn, em altas concentrações, acarreta a diminuição de matéria seca tanto na parte aérea quanto a biomassa radicular, necrose de radículas, morte de plântulas e inibição do crescimento (LI et al., 2002).

O cobre (Cu) é reconhecido como elemento-traço essencial para os organismos vivos desde a metade da década de 1930 (LINDER, 2001). É um micronutriente essencial para as plantas e, em altas concentrações, pode ser tóxico para microrganismos, plantas animais e humanos (ANDREAZZA et al., 2013). No entanto, o sulfato de cobre vem sendo utilizado para a preparação da mistura de Bordeaux (MIRLEAN et al., 2005), um fungicida conhecido como calda bordalesa (CB) que vem sendo utilizado mundialmente (MENEGAES, 2015), tanto na agricultura orgânica, como em agroecológicas (SEDIYAMA et al., 2014). A utilização de CB por períodos prolongados pode causar o acúmulo de Cu disponível no solo (CASALI et al., 2008). O excesso de Cu no solo pode inibir a absorção, pela raiz, de outros nutrientes e da água, diminuindo o crescimento da planta e afetando a morfologia e anatomia do sistema radicular (AMBROSINI et al., 2015; MIOTTO et al., 2014)

2.2. Danos causados por Zn e Cu em plantas

A raiz é o primeiro órgão a sofrer estresse, devido ser o primeiro local a estar em contato com os elementos. Há relatos de diminuição do comprimento de raízes quando crescidas em presença de Cu, eventualmente ocasionado pela diminuição da taxa de divisão celular no ápice radicular (JIANG et al., 2001). Estas alterações nos ápices proporcionam diversas alterações, como redução da coifa e a maturação precoce dos tecidos, relatados em aveia preta (GUIMARÃES et al., 2016) e em videira (AMBROSINI et al., 2015). A redução da coifa afeta o desenvolvimento da planta, já que a sua função é proteger as células radiculares que estão em divisão (MARSCHNER, 2012).

No caso de Zn, há relatos de redução de atividade mitótica e diminuição do número de raízes laterais, causada pela toxicidade deste elemento (SAGARDOY et al., 2009). Em algumas espécies, a toxicidade de Zn nas raízes pode causar sinais de necrose, como uma coloração mais escura (GOMES et al., 2011).

O excesso de Cu e Zn também pode causar sintomas mais comuns (e, por isso, serem facilmente confundidos), como no caso da clorose, que ocorre quando há uma redução da quantidade de clorofilas em folhas jovens (YANG et al., 2011). Em estudos com diferentes espécies, como feijão-de-porco, milho e aveia, cultivadas em solos com alto teores de Zn e Cu, os autores relataram decréscimo nos teores de clorofila A, clorofila B e carotenoides (SANTANA et al., 2015; TIECHER et al., 2016a; TIECHER et al., 2016b), o que impactou o processo fotossintético das plantas. Neste sentido, Zn e Cu podem ocasionar estresse oxidativo devido à excessiva absorção, causando um desequilíbrio entre as respostas antioxidantes e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GIROTTI et al., 2013).

2.3. Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são formas reduzidas do oxigênio e energeticamente mais reativas que oxigênio molecular, sendo denominadas: radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e oxigênio singleto (1O_2) (GRECCO, 2020). São considerados compostos químicos tóxicos por causarem danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios de membranas (TAIZ et al., 2017).

Em organismos fotossintéticos, a produção de ERO ocorre nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (FOYER; NOCTOR, 2000). Assim, a formação excessiva de ERO pode ocasionar o estresse oxidativo (SCANDALIOS, 2005), uma vez que são

extremamente reativos e citotóxicos. Seus radicais livres possuem alvos específicos, as proteínas, cuja oxidação leva à perda de função ou à degradação precoce nos proteossomos. No DNA, a oxidação pode gerar mutações gênicas, levando a alterações nos produtos gênicos, podendo causar alteração na expressão gênica e até a morte celular (SORG, 2004).

As atividades de enzimas antioxidantes desencadeiam uma cascata de reações que protegem as células do estresse abiótico (CAREGNATO, 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ESPOSITO, 2012) e biótico (NEILL et al., 2002). Tais enzimas, que estão em diferentes estruturas celulares, podem contribuir para o controle de ERO (BARBOSA et al., 2014). Com isso, a concentração ou a atividade de enzimas envolvidas na eliminação de ERO, como as peroxidases do guaiacol (GPOX, EC 1.11.1.7) e peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), podem ser alteradas como consequência da exposição.

A peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) é uma enzima chave que está presente no principal sistema de desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (ASADA, 1992), utilizando o ascorbato como doador de elétrons para a redução de H₂O₂ em H₂O (CAVERZAN et al., 2012). Portanto, a APX catalisa a redução do H₂O₂, utilizando o ascorbato como redutor na reação de $2 \text{ L-asorbato} + \text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{ H}^+ \rightarrow 2 \text{ monodesidroasorbato} + 2 \text{ H}_2\text{O}$ (TAIZ et al., 2017).

A peroxidase do guaiacol (GPOX, EC 1.11.1.7) é uma enzima que ocasiona a redução de H₂O₂ e de hidroperoxilípídeo gerado durante a peroxidação lipídica, que utiliza o guaiacol como substrato e tem como produto final H₂O (APEL; HIRT, 2004; DIETZ, 2011; FOYER; SHIGEOKA, 2011).

Portanto, dados obtidos em ensaios enzimáticos podem ser usados para complementar os dados das análises de fitotoxidez em bioensaios realizados com bioindicadores específicos de poluição e toxicidade.

2.4. Bioensaios em modelos vegetais

Os bioensaios são procedimentos que avaliam a resposta de organismos expostos a determinados contaminantes com intuito de verificar sua toxicidade ou efeitos de um determinado controle (ARCY et al., 2014). As plantas têm sido consideradas bioindicadores eficientes, tornando-se um importante instrumento para o monitoramento de diversos poluentes (FRANCO et al., 2017). Neste sentido, os bioensaios realizados com plantas superiores, por apresentarem alta sensibilidade a diversos agentes mutagênicos, são indicados para avaliar danos potenciais no material genético, bem como

outras alterações bioquímicas e fisiológicas. Estes ensaios têm sido amplamente utilizados para avaliar os efeitos biológicos de substâncias ou de compostos complexos de diversas origens, como amostras diversas coletadas em ambientes aquáticos, contaminadas com hidrocarbonetos, corantes, agrotóxicos e metais (ARAGÃO et al., 2019; BERNARDES et al., 2019; ARAGÃO et al. 2020).

Dentre as espécies vegetais mais utilizadas em bioensaios, cita-se *Lactuca sativa* L., *Allium cepa* L., *Tradescantia* sp., *Vicia faba* L. e *Zea mays* L. (revisado por ARAGÃO et al. 2020). Dentre estas, Silva (2021) observou, em revisão bibliográfica utilizando a base de dados da SCOPUS, que entre os anos de 1999 e 2019 foram depositados aproximadamente 96.472 documentos científicos referentes a bioensaios com *L. sativa*.

A *L. sativa* é uma eudicotiledônea da família Asteraceae. Originária do Oriente Médio, é consumida mundialmente (ABAURRE, 2004), sendo utilizada como bioindicador de toxicidade por possuir características vantajosas para as análises, tais como baixo custo; fácil manuseio; grande quantidade de sementes (SOUSA et al., 2009; SOUZA FILHO et al., 2010; GOMES et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012; SILVEIRA et al., 2017). Além disso, é um modelo reconhecido e recomendado por agências de proteção ambiental e por órgãos que regulamentam bioensaios para a determinação dos efeitos de substâncias tóxicas (OECD, 2006; US EPA, 2012).

Diferentes estudos utilizando o modelo de *L. sativa* apresentaram resultados positivos para fitotoxicidade. Mot et al. (2019) avaliaram efeitos de Cd, Cu, Ni, Pb, Co e Zn sobre germinação e crescimento em *L. sativa*, sendo observado que o índice de germinação diminuiu conforme a concentração do elementos aumentava. No entanto, a maioria dos trabalhos encontrados utilizando este bioindicador envolveram estudos sobre resíduos industriais, resíduos químicos potencialmente tóxicos, agrotóxicos e águas de rios contaminados (CAMPOS et al., 2008; HAGHIGHI et al., 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014; PALMIERI et al., 2014; SILVEIRA, 2016; ARAGÃO, 2017; DUARTE, 2017). Em todos os casos citados anteriormente, *L. sativa* apresentou sensibilidade, sendo considerada adequada para estudos de toxicologia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para a realização dos bioensaios e análises acerca do potencial citotóxico e genotóxico do sulfato de cobre (CuSO_4) e sulfato de zinco (ZnSO_4) foram utilizadas sementes de *L. sativa* como bioindicador. Estas sementes foram adquiridas em revendas de insumos agrícolas. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Genética do Instituto Federal Goiano campus Rio Verde, GO, entre os meses de agosto/2021 e março/2022.

3.2. Soluções

As concentrações de cobre e zinco utilizadas neste trabalho foram calculadas a partir dos valores encontrados por Silva (2019), após análise de resíduo de suinocultura processado pelo biodigestor, em que foram observadas concentrações de cobre igual a 2,16 mg/L e de zinco igual a 5,10 mg/L. Nos dois casos, os valores observados estão acima do permitido pelo CONAMA 397/2008, que são, respectivamente, 1,0 mg/L e 5,0 mg/L. Assim, optamos por trabalhar com concentrações destes metais superiores às observadas por Silva (2019) e às permitidas pelo CONAMA, para que pudéssemos verificar se altas concentrações destes metais poderiam explicar a fitotoxicidade causada pela ARS observada no trabalho de Silva (2019). Portanto foram preparadas soluções de diferentes concentrações diluindo o CuSO_4 e o ZnSO_4 em água destilada. Ao todo foram testadas cinco concentrações de CuSO_4 , sendo elas respectivamente 15mg/L (Cu C5); 10mg/L (Cu C4); 5mg/L (Cu C3); 2,5mg/L (Cu C2) e 1,0mg/L (Cu C1) e cinco concentrações de ZnSO_4 , sendo elas respectivamente 25mg/L (Zn C5); 20mg/L (Zn C4); 15 mg/L (Zn C3); 10mg/L (Zn C2) e 5mg/l (Zn C1) (Tabela 1). Foi utilizada Trifluralina 0,84 ppm (TF) como controle positivo e água destilada como controle negativo identificado como H_2O .

Tabela 1 – Equivalência entre concentrações comum e molar de zinco (Zn) e cobre (Cu).

Tratamento	mg/L	μM
Cu C1	15	236,22
Cu C2	10	157,48
Cu C3	5	78,74
Cu C4	2,5	39,37
Cu C5	1,0	15,75
Zn C1	25	382,26
Zn C2	20	305,81
Zn C3	15	229,35
Zn C4	10	155,04
Zn C5	5	77,52

3.3. Análise macroscópica do material vegetal

Foram germinadas 25 sementes de alface em Placas de Petri, contendo papel Germitest® umedecido com as soluções em diferentes concentrações (Figura 1), bem como dos controles positivo (Trifluralina 0,84ppm) e negativo (água destilada). Para cada tratamento foram realizadas 5 repetições, que foram acondicionadas em BOD a 25°C. Para a determinação do comprimento das raízes, foram tiradas fotografias das raízes de cada semente, a cada 24 horas, durante 3 dias (Figura 2), totalizando 3 fotografias (respectivamente 24, 48,72 horas) para cada repetição em cada tratamento.



Figura 1 – Modelo de exposição das sementes às concentrações crescentes de zinco e cobre em placas de Petri.

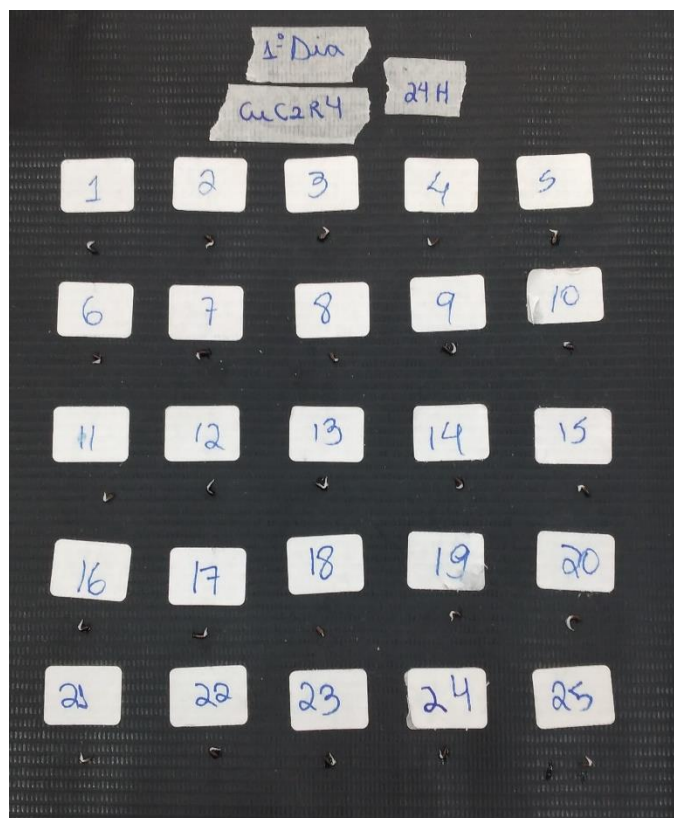


Figura 2 – Exemplo de fotografia utilizada para aferição dos tamanhos das raízes no software ImageJ.

Posteriormente, as fotografias foram analisadas no programa ImageJ para a determinação do tamanho e desenvolvimento das raízes de cada semente nas concentrações as quais foram expostas, gerando assim dados para análises estatísticas. A partir dos dados obtidos foi calculado o Índice de Crescimento Radicular (ICR) conforme a equação abaixo (ALBUQUERQUE, 2022):

$$ICR = \frac{CRA}{CRCN}$$

Onde:

ICR: Índice de Crescimento Radicular

CRA: Comprimento da Radícula na Amostra

CRCN: Comprimento da Radícula no Controle Negativo

Também foi calculada a Média de Crescimento Radicular (MCR) das 25 raízes de cada repetição por tratamento.

3.4. Extração proteica e atividades das enzimas APX e GPOX

Para a realização das análises enzimáticas, as sementes de *L. sativa* foram germinadas em papel Germitest® (em média 50 sementes/placa de germinação), contendo as concentrações de CuSO₄, ZnSO₄, controle positivo e negativo citadas anteriormente. Cada Placa de Petri foi identificada e colocada em estufa BOD com a temperatura de 25 °C entre 48 e 72 horas. Após esse período, as raízes foram colocadas em tubos tipo Eppendorf, montagem de “bulks” e submetidas ao congelamento por nitrogênio líquido e armazenadas no ultrafreezer (-80 °C). Para a obtenção do extrato proteico, as amostras das raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em solução tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescido de 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 3 mM de ditioneitol (DTT) nas proporções de 1:5 e 1:1,5 (m/v). Será adicionado 5% de polivinilpirrolidona (PVP) (m/m) no momento da homogeneização. O extrato resultante foi centrifugado a 10.000 RPM a 4 °C durante 30 minutos, após esse período o sobrenadante foi aliquoteado e novamente armazenado em freezer -80 °C até o momento das análises das atividades enzimáticas específicas.

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), com pequenas modificações, no qual em 20 µL de amostra foi adicionado 1 mL de reagente de Bradford. A solução foi acondicionada sob temperatura ambiente por 2 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro a λ 595 nm.

Para as análise de atividade enzimática da guaiacol peroxidase (GPOX), foi utilizado o método descrito por Matsuno e Uritani (1972), em 1 mL de meio de reação contendo 905 µL (raízes) de tampão fosfato-citrato a 200 mM (pH 5,0); 50 µL de solução 0,5% de guaiacol (v/v); 5 µL (raízes) ou 20 µL (folhas) de extrato proteico; os tubos foram agitados e então acrescentados 50 µL de solução 3% de peróxido de hidrogênio (v/v), a reação permaneceu em banho maria a 30 °C por 15 minutos e, ao final desse período, foram adicionados 50 µL de solução 2% de metabissulfito de sódio (m/v) para encerrar a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm. A atividade enzimática foi determinada utilizando $\varepsilon = 25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (tetraidroguaiacol) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade de ascorbato peroxidase (APX) foi determinada de acordo com o método descrito por Nakano e Asada (1981), em 1 mL do meio de reação contendo 50 µL de amostra e 650 µL de solução tampão fosfato de potássio a 80 mM (pH 7,0); 100 µL de solução 5 mM de ascorbato, 100 µL de solução 1 mM de EDTA e 100 µL de

solução 1,45 mM de peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada durante 5 minutos em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade enzimática foi determinada utilizando $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ascorbato) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.5. Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Para o experimento de fitotoxidez, cada repetição consistiu em uma placa de Petri com vinte e cinco sementes colocadas sobre papel de germinação contendo solução-teste ou um dos controles. Já para as determinações das atividades específicas das enzimas, as raízes foram germinadas em placas de Petri contendo 50 sementes colocadas sobre papel de germinação contendo solução-teste ou um dos controles. Estas raízes foram coletadas e foram montados 5 “bulks” para cada concentração testada, bem como para os controles. Estes “bulks” foram utilizados para a extração das proteínas e demais procedimentos. Por fim, foi feita análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os resultados obtidos foram comparados entre as diferentes concentrações dos metais, controle positivo ou controle negativo. Foi considerado alfa = 5% como referência para se atribuir significância estatística. As análises foram realizadas com software SISVAR[®] (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do Crescimento Radicular

A análise do crescimento radicular é um parâmetro recomendado para ser usado em teste de toxicidade de compostos, pois as raízes são as primeiras estruturas a estarem expostas às substâncias tóxicas (FISKESJO, 1988). A absorção pela raiz, seguida pelo transporte de todas as substâncias pela planta, desencadeia uma variedade de efeitos que vão desde alterações macroscópicas, como as alterações no comprimento da raiz, até alterações microscópicas (SHARMA; DUBEY, 2005).

Foi calculada a média de crescimento radicular (MCR) e Índice de Crescimento Radicular (ICR). No ICR foi possível analisar decréscimo no crescimento após as 24 horas para os tratamentos contendo zinco, a partir de C3 e para os que continham cobre, a partir da C4 (Figura 3). De acordo com a MCR, Cu C4 e Cu C5 demonstraram crescimento menor que as demais concentrações, sendo possível observar que tanto para 24 horas e 48 horas, o Cu C5 apresentou um valor significativo diferente dos demais tratamentos (Figura 4A e 4B). Para 72 horas, as concentrações Zn C3, Zn C4, Zn C5, Cu C4 e Cu C5 demonstraram valores significativos, diferentes em relação às concentrações menores (Figura 4).

A redução do número de células em divisão é um efeito comum da toxidez por elementos-traço (MORAES 2015), o que, por consequência, afeta o desenvolvimento das plantas. Estudos realizados com *Allium cepa* L. (cebola), mostram que o cobre induz a inibição do crescimento radicular indicando um retardo no crescimento utilizando a concentração 1,5 mg/L, e uma redução do índice mitótico cerca de 64% comparado ao controle positivo (YILDIZ et al., 2009). Moraes (2015) analisou o efeito da exposição ao sulfato de cobre em *L. sativa* sobre a germinação em concentrações 250 e 500 μ M, o crescimento inicial e ciclo celular, observando que o cobre alterou a divisão celular e influenciou diretamente a redução do comprimento de raiz. Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2013), que avaliou fitotoxicidade do chumbo (Pb) na germinação, anatomia radicular e ciclo celular de *L. sativa* sob as concentrações 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mM. O referido autor observou que efeitos fitotóxicos de Pb são evidentes tanto no crescimento inicial da raiz quanto na germinação, ocorrendo a diminuição radicular ocasionado pela redução da divisão celular na zona do meristema.

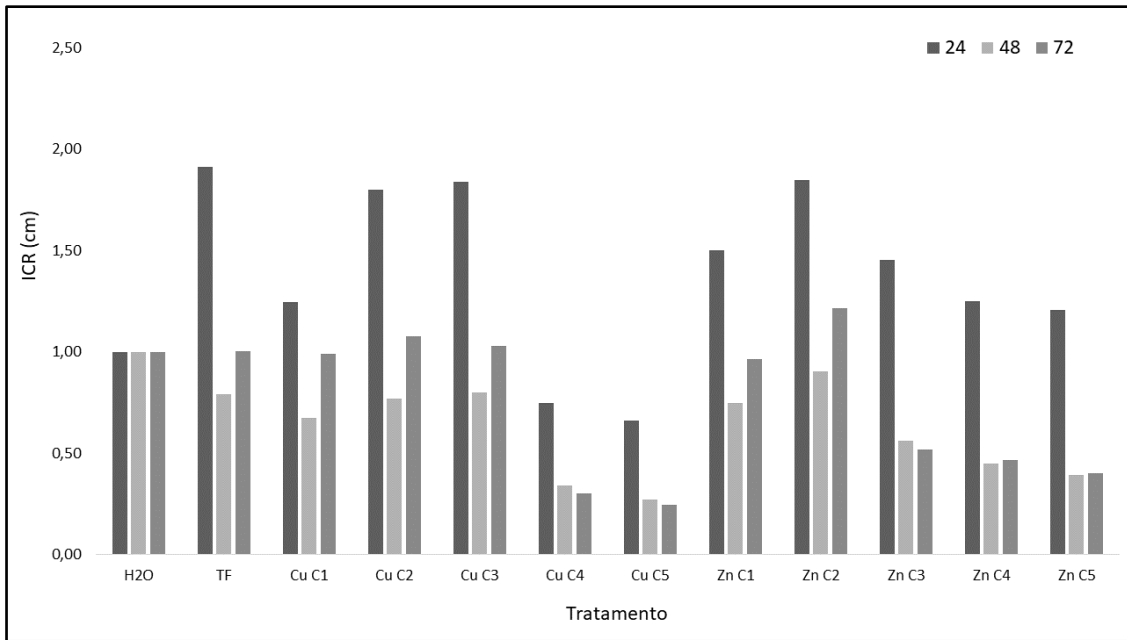


Figura 3 – Índice de Crescimento Radicular (ICR) das raízes de *Lactuca sativa* (alface) após 24, 48 e 72 horas de exposição às concentrações crescentes de zinco e cobre, controle positivo (Trifluralina 0,84 ppm) e controle negativo (H₂O).

Assim, pode-se inferir que diminuição do crescimento das raízes, observadas no presente estudo, na exposição às concentrações 10 mg/L e 15 mg/L (C4 e C5) de cobre (Figuras 3 e 4) pode ter sido causada pela redução do índice mitótico, ocasionando um bloqueio no ciclo celular ou impedindo a progressão das células que entram em divisão (RIJSTENBIL; POORTVLIET, 1992).

Ainda, no presente estudo, foi possível verificar a diminuição do crescimento das raízes expostas às concentrações 15 mg/L, 10 mg/L e 5 mg/L (C3, C4 e C5) de zinco (Figuras 3 e 4). Tem sido relatado que o excesso de zinco no solo pode ocasionar a redução do comprimento radicular (HOODA, 2010), devido aos danos aos processos fisiológicos, afetando a mitose e causando morte celular (EL-GHAMERY et al., 2003). Soares et al. (2001) verificaram que concentrações 0, 400, 800, 1.200 e 1.600 mM de Zn fornecido como ZnSO₄ causaram mortes de *Eucalyptus maculata* cultivada em soluções nutritivas, e em concentrações mais baixas as raízes ficaram escuras e poucos desenvolvidas. Há relatos da diminuição de matéria seca de raízes ocasionado por aumento das concentrações de Zn. Em *Phyllostachys pubescens*, nos tratamentos 10 a 100 µM de Zn a massa seca de raízes não foram afetadas, mas quando houve aumento nas concentrações (200 e 400 µM), a massa seca das raízes foi inteiramente afetada (Liu et al., 2014).

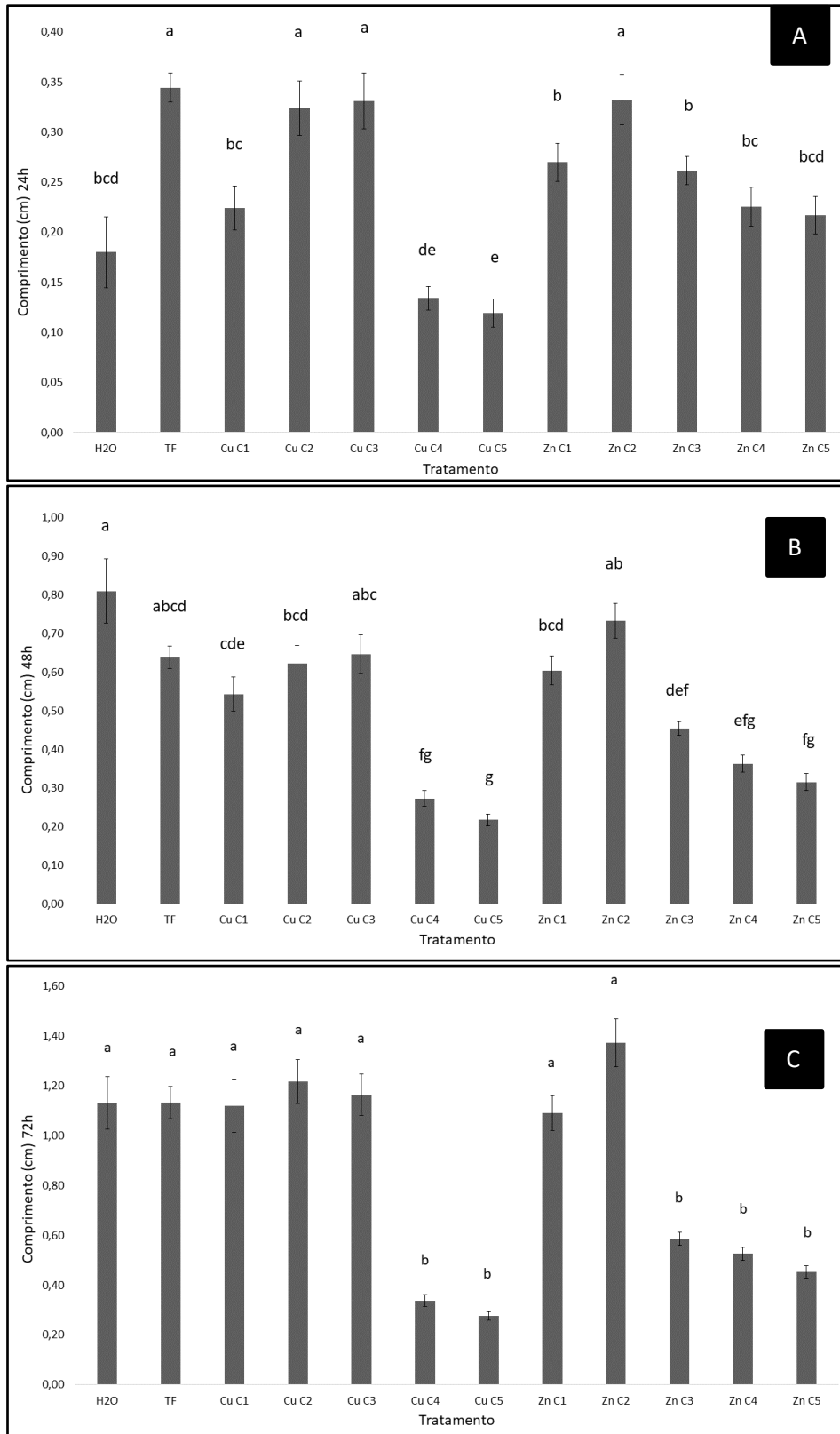


Figura 4 – Média de crescimento radicular (MCR) das raízes de *Lactuca sativa* (alface) em 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C), durante o período de exposição às concentrações crescentes de zinco e cobre, controle positivo (Trifluralina 0,84 ppm) e controle negativo (H₂O). As médias indicadas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste deTukey a 5% de probabilidade.

4.1. Extração proteica e atividades das enzimas APX e GPOX

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas naturalmente durante o metabolismo aeróbico e o sistema enzimático atua na manutenção da homeostase oxidativa para proteger as células. Essa proteção se dá por atividades de enzimas antioxidantes que desencadeiam uma cascata de reações (CAREGNATO, 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ESPOSITO, 2012). Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutathiona (GSH), o α -tocoferol (vit. E), o ácido ascórbico (vit. C), o ácido lipóico, os carotenóides, os flavonóides, entre outros (VOLKO et al., 2007). Dentre as defesas de caráter enzimático, citamos as enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxidase (POX), Guaiacol peroxidase (GPOX) e Ascorbato peroxidase (APX) (JOHANSEN et al., 2005).

As SOD é a primeira linha de defesa contra os ERO, participando da modulação do nível de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (MITTLER, 2002; BHATTACHARJEE, 2010). A CAT é uma das principais enzimas envolvidas na eliminação do H_2O_2 durante a fotorrespiração, atua nos peroxissomos e glioxissomos e pode ser encontrada nas mitocôndrias (BARBOSA et al., 2014). A APX é uma heme-proteína da superfamília das peroxidases e possui diversas formas isoenzimáticas que podem ser encontradas o citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos e parede celular (DABROWSKA et al., 2007; De GARA, 2004). As POX existem em muitas isoformas e estão envolvidas em uma série de processos celulares localizam-se na parede celular e no vacúolo (BARBOSA et al., 2014). A GPOX são heme-proteínas que participam dos processos metabólicos essenciais, incluindo lignificação (GRISEBACH, 1981), regulação do crescimento celular (GOLDBERG et al., 1986), oxidação fenólica, defesa contra patógenos e proteção contra estresses (FIELDES; GERHARDT, 1998).

Apesar da eficiência dos mecanismos de defesa da planta, é possível ocorrer desequilíbrio, o que acaba ocasionando estresses oxidativos causando danos nas macromoléculas, como no DNA, RNA, lipídeos e proteínas (HALLIWELL, 2009), além de mutações e falhas no reparo do DNA, o que poderá levar divisão celular descontrolada e morte celular (SOSA et al., 2013). Assim, os dados obtidos em ensaios de estresse oxidativo podem ser usados para complementar os dados das análises de fitotoxicidade. Na figura 5A são mostrados os resultados de quantificação de proteína total extraída, bem como a atividade específica das enzimas APX e GPOX, relacionadas ao metabolismo antioxidante, realizado em raízes de *L. sativa* expostas às diferentes concentrações de $CuSO_4$ e $ZnSO_4$.

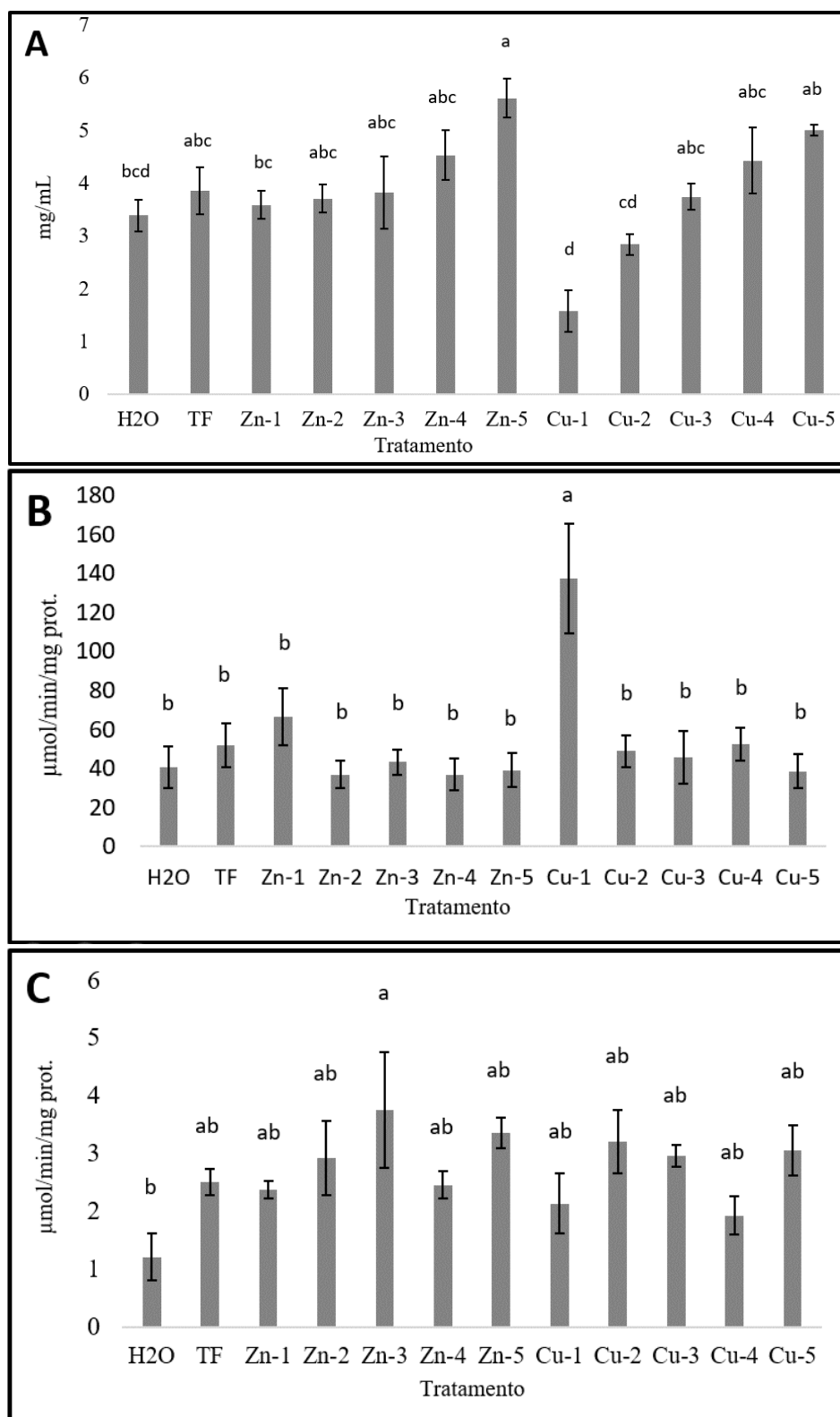


Figura 5 – Proteína solúvel total e atividades de enzimas antioxidantes em raízes de *Lactuca sativa* submetidas a doses crescentes dezinc e cobre. Proteína Total (A); Atividade específica de Ascorbato Peroxidase (APX) (B); Atividade específica de Guaiacol Peroxidase (GPOX) (C). As médias indicadas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste deTukey a 5% de probabilidade.

Embora a concentração de proteína total de Zn C5 tenha sido a maior entre os tratamentos, nas atividades específicas de GPOX e APX não foi observado o mesmo comportamento (Figura 5B e 5C). Para APX houve baixa atividade enzimática, mas entre os tratamentos foram observados um aumento significativo em Cu C1 (Figura 5A e 5B). Para GPOX apenas Zn C3, Zn C5, Cu C2 e Cu C5 apresentou aumento significativo da atividade enzimática (Figura 5C).

As peroxidases possuem atividades enzimáticas relacionadas a eventos que envolvem indução de adaptação ou resistência frente às condições adversas que geram estresses (PAULA et al., 2015). A APX atua degradando o H_2O_2 , utilizando o ascorbato como substrato, a sua defesa é importante nos tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação (ASADA, 1992). Segundo Cavalcanti et al. (2005) não é observado um comportamento padrão para esta enzima, uma vez que sua atividade depende do tipo de indutor, concentração, tempo após a sua aplicação na planta e sistema em estudo. Podendo ser explicado o motivo de Cu C1 ter sido diferente dos demais.

Carneiro et al. (2011) avaliaram germinação e crescimento em plântulas de girassol submetidas a estresse hídrico e salino, por meio dos agentes indutores osmóticos polietilenoglicol (PEG 6000) e cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações zero; -0,2; -0,4 e -0,8 MPa. Os autores observaram que a atividade de APX nas raízes apresentou aumento somente para o PEG 6000 em relação a testemunha, uma vez que o NaCl não induziu diferença significativa entre os diferentes potenciais osmóticos avaliados. Panda e Khan (2009) observaram que, em raízes de *Vigna radiata*, houve a diminuição na atividade de APX sob estresse salino. Em estudo com avaliação de resposta antioxidante ao estresse oxidativo por meio de H_2O_2 com as concentrações 0, 10, 20, 30 mM em plantas de cana-de-açúcar, por meio do monitoramento na taxa de oxidação de ascorbato em folhas, Barreto (2013) observou que não houve diferença significativa entre as amostras quando submetidas ao estresse oxidativo.

Pereira et al. (2012) avaliaram estresse hídricos em cinco genótipos de amendoim, e relataram que a atividade de GPOX foi mais expressiva que a APX nas plantas que estão sobre estresse. Chai et al. (2010) constataram aumentos na atividade de GPOX em raízes de plantas de sorgo submetidas a estresse salinos. Bottcher et al. (2012) analisaram os efeitos de baixas concentrações de alumínio em espécies de café (Mundo novo IAC388-1 e Icatu IAC 404-5), sendo que não foi observado aumento da atividade da GPOX nas células da variante Mundo Novo, no entanto, uma diminuição foi observada em Icatu.

5 CONCLUSÕES

A presença de CuSO_4 e ZnSO_4 demonstrou ser fitotóxica, por ter causado a inibição do crescimento de *L. sativa* nas concentrações Zn C3 (15 mg/L), Zn C4 (20mg/L), Zn C5 (25mg/L), Cu C4 (10mg/L) e Cu C5 (15mg/L). Ainda, de acordo com os resultados obtidos, não foi possível inferir sobre resposta ao estresse oxidativo por meio das atividades específicas de APX e GPOX nas plântulas germinadas na presença dos metais. Serão realizadas análises de citogenotoxicidade para verificar o índice mitótico e a presença/ausência de alterações cromossômicas. Por fim, pretende-se analisar a atividade específica da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), a fim de se verificar possíveis impactos das concentrações de Cu e Zn nas atividades dessas enzimas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, J. S. Avaliação da toxicidade de extratos fúngicos bioativos na germinação e alongamento de radiculares de plantas. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2022.

ALLOWAY, B. J. Heavy metals in soils. **Blackie Academic Professional**, 1995. 368p.

ALMEIDA, G. M.; RODRIGUES, J. G. L. Desenvolvimento de plantas através da interferência de auxinas, citocininas, etileno e giberilinas. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v.9, n.3, p.111-117, 2016.

AMBROSINI, V. G.; ROSA, D. J.; PRADO, J. P. C.; BORGHEZAN, M.; DE MELO, G. W. B.; DE SOUSA SOARES; C. R. F.; BRUNETTO, G. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 270-280, 2015

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; GEDRAITE, L. S.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Spent Pot Liners (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 882-888, 2011.

ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; ANTONIOLLO, Z. I.; QUADRO, M.; BARCELOS, A. A. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARAGÃO, F. B. Prospecção da toxicidade e atividade enzimática de fungicidas por meio de bioensaios com *Lactuca sativa*. **Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2017. 93p.

ARAGÃO, F. B.; BERNARDES, P. M.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Cyto(genotoxicity of Commercial Fungicides Based on the

Active Compounds Tebuconazole, Difenconazole, Procymidone, and Iprodione in *Lactuca sativa* L. Meristematic Cells. **Water Air and Soil Pollution**, v. 230, p. 1-9, 2019.

ARAGÃO, F. B.; GALTER, I. N.; DUARTE, I. D.; MARIN MORALES, M. A.; ANDRADE-VIEIRA; L. F.; MATSUMOTO, S. T. *Lactuca sativa* L.: bioindicador vegetal para prospecção de toxicidade e atividade enzimática de fungicidas. IN: **Tópicos especiais em genética e melhoramento III**. [livro eletrônico] / organizadores Milene Miranda Praça Fontes ... [et al.]. -- Alegre: CAUFES, 2020.

ARCY, A. R.; SILVA, M. D.; CUNHA, T. L. Testes ecotoxicológicos de diferentes formulações do bioinseticida produzido na UNIVILLE submetidas ao teste de prateleira. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 19, p. 435-440, 2014.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. D. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, p. 453-460, 2014.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. D. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, p. 453-460, 2014.

BARRETO, K. F. M. Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em plantas de cana-de-açúcar tratadas com peróxido de hidrogênio. 2013. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 7, p. 1-11, 2015

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.1-30.

BOTTCHER, A.; NOBILE, P. M. MARTINS, P. F.; CONTE, F. F. AZEVEDO, R. A.; MAZZAFERA, P. Antioxidative responses of cell suspension cultures of two *Coffea arabica* varieties to low aluminum levels at pH 5.8. **Hoehnea**, v. 39, n. 1, p. 01-10, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, J. M. S.; VICCINI L. F.; ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; RODRIGUES G. S. Genetic toxicology and environmental mutagenesis in allelopathic interactions. **Plantbioassays**. 344 p, 2008.

CAREGNATO, F. F. Análise dos parâmetros de estresse oxidativo em espécies vegetais expostas a poluentes ambientais. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica)**, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2009.

CARNEIRO M. A. C.; SIQUEIRA J. O.; MOREIRA F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1629-1638, 2002.

CARNEIRO, M. M. L. C., DEUNER, S., OLIVEIRA, P. V. D., TEIXEIRA, S. B., SOUSA, C. P., BACARIN, M. A., MORAES, D. M. D. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 752-761, 2011.

CASALI, C. A.; MOTERLE, D. F.; RHEINHEIMER, D. dos S.; BRUNETTO, G.; CORCINI, A. L. M.; KAMINSKI, J.; MELO, G. W. B. de. Formas e dessorção de cobre em solos cultivados com videira na serra gaúcha do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1479-1487, 2008.

- CAVERZAN, A., PASSAIA, G., ROSA, S. B., RIBEIRO, C. W., LAZZAROTTO, F., MARGIS-PINHEIRO, M. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 1011-1019, 2012.
- CHAI, Y. Y.; JIANG, C. D.; SHI, L.; SHI, T. S.; GU, W. B. Effects of exogenous spermine on sweet sorghum during germination under salinity. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 145-148, 2010.
- CHEN, L.; YUAN, S.; LIU, X.; ZHOU, X.; ZHOU, Y.; SONG, Y. Genotoxicity response of *Vicia faba* seedlings to cadmium in soils as characterized by direct soil exposure and micronucleus test. **Ecotoxicology**, v. 29, n.1, p. 65-74, 2020.
- DABROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v.49, n.1, p.7-17, 2007.
- De GARA, L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Reviews*, v.3, n.1-2, p.195-205, 2004.
- DIETZ, K. J. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, p. 1129-1159, 2011.
- DOWLING, D. K.; SIMMONS, L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proc R Soc Lond B**, v.276, p.1737-1745, 2009.
- DUARTE, I. D. Rio Santa Maria da Vitória (ES, Brasil): Avaliações ecofisiológicas e toxicogenéticas em amostras de água, sedimento e elutriato do sedimento. **Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2017
- ELEKES, C. C.; DUMITRIU, I.; BUSUIOC, G.; ILIESCU, N. S. The appreciation of mineral element accumulation level in some herbaceous plants species by ICP–AES method. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, n. 6, p. 1230–1236, 2010.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A.; ABOU EL-YOUSER, M. A. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research, Massachusetts**, v. 537, p. 29-41, 2003.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Nutrição Mineral de Plantas: princípios e perspectivas. **Planta**, 2006.

ESPOSITO, J. B. N. Influência do MnDFB na tolerância ao estresse oxidativo em plantas de *Glycine max* expostas ao ozônio e chuva ácida. **Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal E Meio Ambiente)** Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011

FIELDES, M. A.; GERHARDT, K.E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. **Plant Science**, Clare, v. 132, p. 89-99, 1998.

FISKESJÖ, G. The Allium test — an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 243–260, fev. 1988.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, v. 146, p. 359-388, 2000.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, p. 93-100, 2011.

FRANCO, H. A., De OLIVEIRA MARTINS, G. M., MUSSEL, Y. L., MORENO, S. C., THODE FILHO, S., DA COSTA MARQUES, M. R. Ecotoxicidade de lixiviado de aterro sanitário na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.). **Revista de Estudos Ambientais**, v. 19, n. 1, p. 36-43, 2017.

GIROTTO, E.; CERETTA, C. A.; ROSSATO, L. V.; FARIAS, J. G.; TIECHER, T. L.; DE CONTI, L.; SCHMATZ, R.; BRUNETTO, G.; SCHETINGER, M. R. C.; NICOLOSO, F. T. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with

accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 145-155, July 2013.

GOLDBERG, R.; IMBEERTY, A.; LIBERMAN, M.; PRAT, R. Relationship between peroxidase activities and cell wall plasticity. **Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases**. p. 208-220, 1986.

GOMES, L. S.; SILVA, F. A. Ecotoxicity of Sludges Generated by Textile Industries: A review. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.7, p.89-96, 2012.

GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. de S. e M.; NOGUEIRA, M. de O. G.; SILVA, G. H.; CASTRO, E. M. de; SOARES, A. M. Efeitos dos rejeitos da indústria de zinco na anatomia e crescimento de plantas jovens de *Salix humboldtiana* Willd. (salgueiro). **Hoehnea**, v. 38, n. 1, p. 135-142, 2011.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175–185, 1994.

GRECCO, K. D. Efeitos toxicogénicos, bioquímicos e fisiológicos dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim em *Lactuca sativa* L. e *Phaseolus vulgaris* L. **Dissertação (Biologia Vegetal)** Universidade Espírito Santo, 2020.

GRISEBACH, H. Lignins. In: COON, E.E.(Ed). The biochemistry of plants. New York: Academic Press, v. 7. p. 457-478, 1981.

GUIMARÃES, P. R.; AMBROSINI, V. G.; MIOTTO, A.; CERETTA, C. A.; SIMÃO, D. G.; BRUNETTO, G. Black oat (*Avena strigosa* Schreb.) growth and root anatomical changes in sandy soil with different copper and phosphorus concentrations. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 192, p. 1-10, 2016.

HAGHIGHI, M.; KAFI, M.; FANG, P.; GUI-XIAO, L. Humic acid decreased hazardous of cadmium toxicity on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Vegetable Crops Research Bulletin**, v. 72, p. 49-61, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HOODA, P. S. (Ed.). Trace elements in soils. **Wiley**, 2010.

JIANG, W.; LIU, D.; LIU, X. Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 1, p. 105-109, Mar. 2001.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v.4, p.5, 2005.

KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D. FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995.

LI, X.; CHEN, B.; FENG, G.; CHRISTIE P. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of Zn phytotoxicity and mineral nutrition of host plants. **17th WCSS, Thailand**, 2002.

LINDER M. C. Copper and genomic stability in mammals. **Mutation Research**. 475, p. 141-152, 2001.

LIU, D.; CHEN, J.; MAHMOOD, Q.; LI, S.; WU, J.; YE, Z.; PENG, D.; YAN, W.; LU, K. Effect of Zn toxicity on root morphology, ultrastructure, and the ability to accumulate Zn in Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 23, p. 13615-13624, 2014.

MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3th ed.. London: Academic Press, 2012. 651 p.

MARSOLA, T.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A. Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro em relação com o extraído do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 1, p. 92-98, 2005.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.

MENEGAES, J. F. Avaliação do potencial fitorremediador de plantas floríferas em solo contaminado com cobre. 2015. 122 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

MIOTTO, A.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; NICOLOSO, F. T.; GIROTTI, E.; FARIAS, J. G.; TRENTIN, G. Copper uptake, accumulation, and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. **Plant and Soil**, v. 374, n. 1, p. 593-610, 2014.

MIRLEAN, N.; ROISENBERG, A.; CHIES, J. O. Copper-based fungicide contamination and metal distribution in Brazilian grape products. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 75, n. 5, p. 968-974, 2005.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v.9, p.405-410, 2002

MORAES, R. M. Aspectos fisiológicos, metabólicos e alterações no ciclo celular de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) em resposta ao cobre, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. **Dissertação (Ecologia e Tecnologia Ambiental)**. Universidade Federal de Alfenas 2015.

MOT, A.; MADJAR, R.; BĂDULESCU, L.; MIHALACHE, M. The effects of heavy metals on seed germination and seedling growth of *Lactuca sativa* L. and *Spinacia oleracea* L. **Research Journal of Agricultural Science**, v. 51, 2019.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. **Journal Experimental Botany**, v. 53, n.372, p.1237-1247, 2002.

NEUHAUSER, E.F.; LOEHR, R.C.; MILLIGAN, D.L.; MALECKI, M. R. Toxicity of metals to the earthworms *Eisenia foetida*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 1, p. 149-152, 1985.

OECD - Organization for Economic Cooperation And Development **Guidelines For The Testing Of Chemicals**. Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. 2006.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C. Metais pesados. **Revista Eletrônica Faculdade de Iporá**, v. 1, n. 1, p. 59-86, 2011.

PALMIERI, M. J.; LUBER, J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVIDE, L. C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 763, p. 30–35, 2014.

PANDA, S.K.; KHAN, M.H. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.195, p.442-454, 2009

PEREIRA, J. W.; ALBUQUERQUEMELO FILHO, P.; ALBUQUERQUE, M. B.; NOGUEIRA, R. M.; SANTOS, R. C. Biochemical changes in peanut genotypes submitted to moderate water stress. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 766, 2012.

PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; DE ALMEIDA RODRIGUES, L. C.; BARBOSA, S.; DE CASTRO, E. M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2013.

RIBEIRO, L. O.; BARBOSA, S.; BALIEIRO, F. P.; BEIJO, L. A.; SANTOS, B. R.; GOUVEA, C. M. C. P.; PAIVA, L. V. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. **Revista Brasileira de Biociências**, v.10, p.220-225, 2012.

RUSTENBIL, J. W.; POORTVLIET, T. C. W. Copper and zinc in estuarine water: chemical speciation in relation to bioavailability to the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 11, n. 11, p. 1615-1625, 1992.

SAGARDOY, R.; MORALES, F.; LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 339-350, May 2009.

SANTANA, N. A.; FERREIRA, P. A. A.; SORIANI, H. H.; BRUNETTO, G.; NICOLOSO, F. T.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost on copper phytoremediation in a sandy soil. **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 172-182, Nov. 2015.

SARMA, H.; DEKA, S.; DEKA, H.; SAIKIA, R. R. Accumulation of heavy metals in selected medicinal plants. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, p. 63-86, 2012.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.7, p. 995- 1014, 2005.

SEDIYAMA, M. A. N.; SANTOS, I. C. dos; LIMA, P. C. de. Cultivo de hortaliças no sistema orgânico. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, supl. p. 829-837, 2014

SHAHID, M.; POURRUT, B.; DUMAT, C.; NADEEM, M.; ASLAM, M.; PINELLI, E. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 232, p. 1-44, 2014.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 35–52, 2005.

SILVA, A. L. Efeitos genotóxicos da água residuária de suinocultura processada por biodigestor em modelos animais e vegetais. **Dissertação (Pós-Graduação Em Biodiversidade E Conservação)**, Instituto Federal De Educação, Ciência E Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde. 2020.

SILVA, R. A. S. Padronização de bioensaios com *Lactuca sativa* L. e sua aplicação na avaliação toxicológica de efluentes contendo azocorantes tratados por fotofenton. 2022. 106 f. **Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia)** – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2021

SILVEIRA, G. L. Modelos vegetais aplicados a estudos de toxicologia ambiental: uma abordagem comparativa entre *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. **Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2016.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADEVIERIA, L. F. Toxic effect so fenvironmental pollutants: comparative

investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, 2017.

SOARES, C. R. F. S.; GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; CARVALHO, J. G. D.; MOREIRA, F. M. S. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 339-348, 2001.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**, v. 62, n. 4, p.

SOUZA-FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – Revisão Crítica. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

TAIZ, L., et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TIECHER, T. L.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; LOURENZI, C. R.; TIECHER, T.; GIROTTO, E.; NICOLOSO, F. T.; SORIANI, H. H.; DE CONTI, L.; MIMMO, T.; CESCO, S.; BRUNETTO, G. The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, v. 262, p. 52-61, 2016a.

TIECHER, T. L.; TIECHER, T.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; NICOLOSO, F. T.; SORIANI, H. H.; TASSINARI, A.; PARANHOS, J. T.; DE CONTI, L.; BRUNETTO, G. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigosa* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 253-263, Sep. 2016b.

TIGRE, R. C.; SILVA, N. H.; SANTOS, M. G.; HONDA, N. K.; FALCAO, E. P. S.; PEREIRA, E. C. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 125-132, 2012.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. **Ecological Effects Test Guidelines**. OPPTS 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test, EPA 712-C-96-154, 2012.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

WU, X.; COBBINA, S. J.; MAO, G.; XU, H.; ZHANG, Z.; YANG, L. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8244-8259, 2016.

YANG, Y.; SUN, C.; YAO, Y.; ZHANG, Y.; ACHAL, V. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* "Combier") to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1483-1491, July 2011.

YILDIZ, M.; CIĞERCI, İ. H.; KONUK, M.; FIDAN, A. F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934-938, 2009.