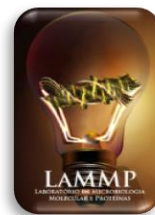




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza –
CCMN
Instituto de Química – IQ
Departamento de Bioquímica



Wilber de Sousa Alves

FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR
Medicago sativa L. E SIMBIONTE *Ensifer meliloti*

RIO DE JANEIRO

2019

Wilber de Sousa Alves

FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR
Medicago sativa L. E SIMBIONTE *Ensifer meliloti*

Tese de Doutorado submetida aos Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Química de Petróleo e Biocombustíveis do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Márcia Regina Soares da Silva – DBQ – IQ/UFRJ

RIO DE JANEIRO

2019



CIP - Catalogação na Publicação

A474f Alves, Wilber de Sousa
Fitorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por *Medicago sativa* L. e simbiote *Ensifer meliloti* / Wilber de Sousa Alves. -- Rio de Janeiro, 2019.
340 f.

Orientadora: Márcia Regina Soares da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2019.

1. Fitorremediação. 2. HPA. 3. *Medicago sativa* L.. 4. Proteômica. 5. BR 7411. I. Silva, Márcia Regina Soares da, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Wilber de Sousa Alves

FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR
Medicago sativa L. E SIMBIONTE *Ensifer meliloti*

Tese de Doutorado submetida aos Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica e Química
de Petróleo e Biocombustíveis do Instituto de
Química da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos a obtenção
do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Aprovada em 29/05/2019



Márcia Regina Soares da Silva
Departamento de Bioquímica - IQ – UFRJ



Eliana Flávia Camporese Sérvulo
Escola de Química – EQ – UFRJ



Celeste Yara dos Santos Siqueira
Departamento de Química Analítica – IQ – UFRJ



Anderson de Sá Pinheiro
Departamento de Bioquímica – IQ – UFRJ



Rodrigo Volcan Almeida
Departamento de Bioquímica – IQ – UFRJ

Aos meus queridos pais Eurivaldo e Oleni, e ao meu irmão Cristovão, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado sabedoria e força necessárias para trilhar este caminho. Muito obrigado.

A minha família, meus pais, Eurivaldo e Oleni, por me incentivarem a buscar meus objetivos, e por terem me ensinado tão bem o valor da honestidade e da perseverança. Vocês me deram tudo e espero retribuir tudo isso um dia. Ao meu Irmão, Cristóvão, e minha cunhada, Giselle, pela amizade, por estarem sempre dispostos a me ajudar desde sempre, e pelos inúmeros incentivos dizendo que tudo ia dar certo. E pela paciência eterna de me ouvirem falar e falar e falar sobre a Tese. Obrigado por tudo!

A minha orientadora, Márcia Regina Soares da Silva, por ter me dado como projeto este grande presente, que pode ser tema tanto da minha dissertação como desta tese. Muito obrigado por estar sempre presente quando precisei e por ser paciente perante as dificuldades. Sem sua ajuda não teria chegado aonde cheguei, como seu primeiro aluno, passamos por momentos complicados, comecei, sai, depois voltei, e fiquei até o fim do doutorado, pois aprendemos juntos como trabalhar um com o outro, sempre insitindo perante as complicações, pois “no final, tudo da certo”. Espero continuar essa parceria por muito mais tempo. Obrigado por ter permitido dar a minha cara para esse projeto, por deixar-me pensar e trilhar meus próprios caminhos, incentivando-me a tomar decisões e buscar soluções para os problemas e desafios.

Aos colegas Gabi, Marcelo, Letícia, Saulo, Candida, Luiz, Luiz Fernando, Bernardo, Juliana, Giulia A., Giulia P., Michelle, Mariana, Bruna, Graciela, Araceli, Duda, Bianca R., Dani, Rafael Andrade, Rafael Araújo, Francisco, Camilla, Igor, Herval, Hadassa, Jaqueline, Vitor, como também meus alunos de IC, Bruna A., André e Felipe, do Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica – LaMMP, minha segunda casa (literalmente, pois dormi neste laboratório inúmeras vezes) e seus professores, Rodrigo Volcan e Bianca Cruz Neves, pelo apoio e por tudo que eu aprendi com vocês. Quantas histórias e lembranças, quantas festas, correrias, “águas destiladas que pegaram fogo”, tretas, alegrias, encontros, despedidas, experimentos que deram certo, errado, botões desligados do shaker, quedas de luz e etc. Vou guardar os aprendizados e histórias que tive com cada um de vocês pra sempre! É tanta história que dá pra escrever outra Tese.

A Rosane, Giselli e Isabele, por todo o apoio e ajuda nos experimentos e na convivência de laboratório. Muito do que sei eu devo a vocês. Obrigado por estarem sempre presentes nos momentos bons e ruins. Fazer ciência ao lado de pessoas tão competentes foi um prazer. Desde a iniciação científica até o doutorado, pude aprender com vocês a capacidade de nunca desistir perante um problema, e foram muitos! Falta de materiais, verba, água, luz... sempre estávamos correndo de um lado para o outro, para tentar salvar nossos experimentos quando acontecia os mais

diversos imprevistos. Mas de uma coisa tenho certeza, teria sido infinitamente pior se não tivesse vocês para me ajudar! Muito obrigado por tudo, amo vocês.

A Evelin Manoel, agradeço toda a ajuda com os ensinamentos sobre HPLC e nas análises das amostras. Aprendi muito com você, obrigado por sempre estar disposta a ajudar e torcer pelo meu sucesso a cada novo resultado, por estar sempre disposta a conversar sobre ciência. Pessoas apaixonadas pelo que fazem são raras de se ver, agradeço a Deus a oportunidade de ter te conhecido, e poder ver o quão dedicada e apaixonada é pelo seu trabalho, mesmo com uma vida corrida, sempre esteve disposta a me ajudar e participar do meu trabalho, sou grato por isso também. Obrigado por tudo!

As professoras Ana Cláudia e Mônica Cardoso pela amizade e apoio. E aos amigos do LABBMOVE, Thiago Franco, Thiago Sales, Dani, Evelyn, Sheila e Natália pela amizade, e pelos momentos de trabalho e risadas, vocês são demais!

A toda equipe do LaBIM, LaBEP, LIFE e LQP/UP por sempre estarem de portas abertas para me ajudar quando precisei.

A toda a equipe da Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica - UEMP, especial à Ana Carvalho (Aninha), Marjolly, Augusto, Vanessa, pela ajuda, presença e conhecimentos transmitidos, como também aos professores Russolina Benedeta Zingali, Dário Kalume e Silas Pessini Rodrigues. Agradeço a todos vocês por estarem sempre dispostos a ajudar, meu início na proteômica se deu na UEMP e hoje ao defender o doutorado, sei o quanto a presença de profissionais tão competentes como vocês, foi decisiva para a minha permanência nesta área, ainda tenho muito a aprender, mas da base que tenho, muito dela eu devo a vocês.

A toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia Estrutural do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) em Xerém-RJ. Onde pude fazer parte dos experimentos de microscopia de fluorescência.

Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq) e Programa Químico de Petróleo e Biocombustíveis (PQPetro/PRH01), do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo de profissionalismo.

A Prof^a Cristina Labuto, a secretária Cláudia Caruzo e a Prof^a Jussara L. de Miranda, coordenadora do Programa de Formação de Recursos Humanos na área de Química do Petróleo e Biocombustíveis do Instituto de Química da UFRJ (PRH 01), pelo exemplo, carinho e pelos ensinamentos adquiridos durante minha permanência como aluno bolsista no Programa Químico de Petróleo e Biocombustíveis. Aprendi muito com o PRH 01, ser um biólogo no meio de disciplinas tão específicas da área da química foi um desafio e tanto, mas aprendi muito ao sair da minha zona de conforto, sou um profissional melhor graças ao PRH01. Além disso, também pude

aprender enfrentando crises complicadas, cortes de verba, de bolsas, mas nesse “furacão de eventos” pude ver o empenho incansável do PRH01 (em especial da profª Jussara) em manter as rédeas do programa, e mantê-lo vivo em sua exelência. Agradeço por essa luta, pois sei que não foi fácil.

Aos professores, servidores, alunos e demais funcionários do C.E. Hilário Ribeiro, escola onde pude atuar como professor de biologia por 4 anos enquanto fazia o meu doutorado. Aprendi muito com todos vocês, e agradeço a oportunidade de conhecer profissionais tão competentes, em especial: Alba, Alex, Alessandra, Andreia, Aninha, Arthur, Bira, Edna, Elisângela, EneDir, Georgina, Fátima, Isabel, Jaciara, Maria Ana, Maria Helena, Márcia, Marise, Mônica, Neide, Norma, Patrícia Calmon, Patrícia Cotelo e Polyanna. Obrigado por tudo!

Ao CEFET/RJ, Campus Maracanã, (minha nova casa) e seus alunos, em especial as turmas em que pude lecionar (1BINFO, 1BADM, 2BINFO, 2BMEC, 2BADM, 3AMET, 4BTEL e 4BELT), pelo acolhimento nessa nova jornada como professor dessa instituição e pelo incentivo em defender a tese, em meio a tantas tarefas diárias como provas, trabalhos, projetos, aulas e etc. Em especial também a equipe da COBIO, a qual pertenço, e pude conhecer nesse início da minha jornada no CEFET/RJ, aos professores(as): Amanda, Cristiana, Geane, Guilherme, Jorge, Lúrio, Leandro, Leonardo, Maicon, Mônica e Rosângela. Sou muito grato em fazer parte dessa equipe, e muito feliz em poder aprender com pessoas tão competentes, obrigado pelo apoio durante esses momentos finais da escrita da tese.

A professora Maria Teresa Menezes de Széchy e ao professor Ricardo Vieira, por todo o conhecimento que me foi passado e por serem exemplos para mim na área da Botânica, obrigado por estarem presentes em etapas tão importantes da minha vida, espero um dia ser um professor e pesquisador tão competente quanto vocês. E agradeço também a todo o departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, ao qual tenho muitas saudades.

Ao professor Joab Trajano, *in memoriam*, pelos ensinamentos de bioquímica na época da graduação. Sem dúvida um dos melhores professores que já tive em toda a minha vida. Guardarei suas aulas e seu sotaque com muito carinho na minha memória.

A ANP e a Queiroz Galvão pelas bolsas de doutorado, ao CNPQ, FAPERJ e Petrobras pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta Tese.

有志者事竟成

RESUMO

ALVES, Wilber de Sousa. **Fitorremediação de Solos Contaminados com Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos por *Medicago sativa L.* e Simbionte *Ensifer meliloti***. Rio de Janeiro, 2019. Tese (Doutor em Ciências - Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) são poluentes prioritários mutagênicos e carcinogênicos. *Medicago sativa L.* (alfafa) e simbionte *Ensifer meliloti* (cepa BR 7411) são estudados como potenciais biorremediadores destes compostos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de fitorremediação da alfafa em consórcio com BR 7411 em solos contaminados, identificar proteínas envolvidas no processo, como também, monitorar o tráfego desses HPA em tecidos vegetais. Amostras de solo foram alteradas com antraceno, pireno e fenantreno, semeadas com alfafa na presença e ausência de BR 7411, e cultivados por 40 dias após semeadura (DAS). A cada 10 dias, amostras de solo e tecido vegetal foram coletados, para os ensaios biométricos e biomassa seca, análise do potencial de biorremediação e fitorremediação (extração, adsorção em sílica e análise CLAE-FR), identificação de proteínas por análise proteômica quantitativa (*Label-free*), e detecção dos HPA em tecidos vegetais por técnicas de microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram diminuição na biomassa e comprimento médio dos vegetais, conforme aumento das concentrações de HPA total (150, 300 e 450 ppm), cultivos na presença de BR 7411 diminuíram sintomas de estresse, promovendo melhora na saúde das plantas. Tratamentos com alfafas e BR 7411, (em consórcio ou isolados), promoveram quedas de 85 % em média nos primeiros 10 DAS, na concentração de HPA total em solos contaminados nas diferentes concentrações (Tukey $p < 0.0001$). 709 proteínas foram identificadas em tecidos aéreos de alfafas cultivadas na presença e na ausência de 300 ppm de HPA durante 20 DAS, dentre estas, 54 foram mais expressas na presença dos HPA, pertencendo as funções biológicas de transporte e catabolismo, resposta ao estresse, metabolismo e degradação de xenobióticos (biodegradação de HPA), e metabolismo de drogas, sendo candidatas a proteínas relacionadas à fitorremediação (PRF). Dentre elas, destacaram-se proteínas com *fold change* > 2 , como a RuBisCO, Citocromo P450 e álcool desidrogenases, dentre outras proteínas com potencial na remediação desses compostos, sendo até agora, o primeiro estudo a analisar o proteoma de *Medicago sativa L.* (quantitativo e qualitativo) na presença de HPA, em busca de PRF. Além disso, obteve-se a detecção de fluorescência do HPA em tecidos de vegetais, destacando a contribuição da cepa BR 7411 no aumento da absorção dos HPA para todas as concentrações, vide intensidade da fluorescência dos HPA nos órgãos analisados, comparados com as plantas não tratadas com a cepa BR 7411. Como também, a presença de fluorescência dos HPA documentada pela primeira vez em nódulos de alfafa, indicando que esses órgãos podem exercer, não só a função de fixação biológica de nitrogênio (FBN), como também a função de sítios de acúmulo ou degradação desses HPA, tendo em vista a cepa BR 7411 ser capaz de degradá-los e utilizá-los como fonte de carbono, evidenciado nos ensaios de Hanson, contendo HPA como única fonte de carbono, e meio complementado com 50 % de sacarose (co-metabolismo).

Palavras Chaves: Fitorremediação, HPA, *Medicago sativa L.*, Proteômica, BR 7411

ABSTRACT

ALVES, Wilber de Sousa. **Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contaminated Soils by *Medicago sativa* L. and Symbiote *Ensifer meliloti***. Rio de Janeiro, 2019. Thesis (Doctor of Science - Biochemistry) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are mutagenic and carcinogenic priority pollutants. *Medicago sativa* L. (alfalfa) and symbiote *Ensifer meliloti* (BR 7411 strain) are studied as potential bioremediators of these compounds. The objective of this study was to evaluate the ability of alfalfa phytoremediation, in consortium with BR 7411, in contaminated soils, to identify proteins involved in the process, as well as to monitor the traffic of these PAH in plant tissues. Soil samples were amended with anthracene, pyrene and phenanthrene, sown with alfalfa in the presence and absence of BR 7411, and cultivated for 40 days after sowing (DAS). Every 10 days, soil and plant tissue samples were collected for biometric and dry biomass assays, bioremediation and phytoremediation potential analysis (extraction, silica adsorption and HPLC-RP analysis), protein identification by quantitative proteomic analysis (label-free), and detection of PAH in plant tissues by fluorescence microscopy techniques. The results showed a decrease in the biomass and average length of the plants, as the increase of total PAH concentrations (150, 300 and 450 ppm). Crops in the presence of BR 7411 decreased symptoms of stress, promoting improvement in plant health. Alfalfa and BR 7411 treatments (either in consortium or in isolation) promoted 85% drops in average in the first 10 DAS in total PAH concentration in contaminated soils at different concentrations (Tukey $p < 0.0001$). 709 proteins were identified in alfalfa aerial tissues, grown in the presence and absence of 300 ppm PAH, during 20 DAS, among which 54 were more expressed in the presence of PAH, belonging to the biological functions of transport and catabolism, stress response, metabolism and xenobiotic degradation (PAH biodegradation), and drug metabolism, being candidates for phytoremediation-related proteins (PRF). These include proteins with *fold change* > 2 , such as RuBisCO, Cytochrome P450 and alcohol dehydrogenases, among other proteins with potential for the remediation of these compounds, being so far the first study to analyze the *Medicago sativa* L. proteome (quantitative and qualitative) in the presence of PAH in search of PRF. In addition, PAH fluorescence detection was obtained in plant tissues, highlighting the contribution of the BR 7411 strain in increasing PAH uptake at all concentrations, see PAH fluorescence intensity in the analyzed organs, compared with non-PAH plants. As well as the presence of PAH fluorescence documented for the first time in alfalfa nodules, indicating that these organs can exert not only the biological nitrogen fixation (BNF) function, but also of sites of accumulation or degradation of these PAH, in view of the fact that the BR 7411 strain is able to degrade them and use them as a carbon source, as evidenced in Hanson's tests, containing PAH as the sole carbon source, and medium supplemented with 50% of sucrose (co-metabolism).

Key Words: Phytoremediation, PAH, *Medicago sativa* L., Proteomics, BR 7411.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), considerados poluentes prioritários pela USEPA. (ALVES, 2014).....	20
Figura 2. Ativação de benzo(α)pireno.....	23
Figura 3. Estrutura molecular do benzo(α)pireno.....	24
Figura 4. Mapa com os níveis de exposição à poluição (µg/m ³ de material particulado) em áreas urbanas.....	28
Figura 5. Tipos de ambientes que podem ser tratados pela fitorremediação.....	32
Figura 6. Conceito de biodisponibilidade e bioacessibilidade.....	34
Figura 7. Resumo das reações de fase I, II e III.....	37
Figura 8. Mecanismos de fitorremediação.....	38
Figura 9. Características vegetais necessárias para cada técnica de fitorremediação (ALVES, 2014).	42
Figura 10. Etapas do desenvolvimento de <i>Medicago sativa</i> L.....	45
Figura 11. Adaptação das alfafas em diferentes climas.....	45
Figura 12. A complexidade do proteoma.....	49
Figura 13. Estratégias proteômicas e suas etapas para a identificação de proteínas apartir de misturas complexas.....	51
Figura 14. Etapas experimentais para um experimento genérico de proteômica baseado em espectrometria de massas.....	52
Figura 15. Coloração dos marcadores do controle de contaminação em diferentes valores de pH....	66
Figura 16. Etapas do ensaio de determinação do potencial de degradação de HPA pela cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i>	68
Figura 17. Esquema gráfico mostrando as etapas do cultivo da cepa BR 7411.....	70
Figura 18. Etapas de esterilização e aceleração da germinação das sementes de alfafa.....	71
Figura 19. Etapas da autenticação do inóculo da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> em plantas de <i>Medicago sativa</i> L.....	73
Figura 20. Ensaio de contaminação de solos com Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	74
Figura 21. Etapas de cultivo de <i>Medicago sativa</i> L. e geração dos grupos experimentais contendo plantas inoculadas com BR 7411 (250 plantas) e plantas controle, sem o inóculo de BR 7411.....	76
Figura 22. Plantas cultivadas em tubos de ensaio após 20 dias.....	77
Figura 23. Desenho experimental.....	78
Figura 24. Estrutura da casa de vegetação.....	79
Figura 25. Cromatografia de adsorção em sílica.....	84
Figura 26. Resumo das etapas de extração e análise quantitativa dos HPA em amostras de solo....	86
Figura 27. Interface do programa Progenesis QI for proteomics, mostrando a aba de revisão dos alinhamentos.....	94
Figura 28. Diferentes tipos de graus de qualidade de alinhamento separados por cores.....	95
Figura 29. Esquema gráfico ilustrando a técnica de quantificação relativa usando peptídeos não conflitantes para uma proteína hipotética x.....	97
Figura 30. Extração de HPA de tecidos de <i>Medicago sativa</i> L. para análise espectrofluorométrica.....	101
Figura 31. Culturas em placa da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> em diferentes meios de cultivo.....	103
Figura 32. Capacidade de oxidação dos HPA pela cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> em ensaio de Hanson (1993).....	104
Figura 33) crescimento de <i>Ensifer meliloti</i> na presença do HPA fenantreno, antraceno e pireno.....	106
Figura 34) Unidades formadoras de colônias (UFC.mL ⁻¹) de <i>Ensifer meliloti</i> (BR 7411) na presença de HPA.....	107
Figura 35. UFC.mL ⁻¹ de BR 7411 em meio 79 (50 % de sacarose) complementado com 150, 300 e 450 ppm de HPA.....	109
Figura 36. Aspecto das culturas de BR 7411 na presença de HPA em meios líquido e sólido.....	110
Figura 37. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL ⁻¹) para determinação do crescimento e resposta de <i>Ensifer meliloti</i> (BR 7411) aos HPA.....	111
Figura 38. Ensaio de autenticação da cepa BR 7411 em plantas de <i>Medicago sativa</i> L.....	112
Fig 39. Ensaio de autenticação da cepa BR 7411 em plantas de <i>Medicago sativa</i> L. após 90 Dias.....	113
Figura 40. Plantas cultivadas em diferentes concentrações de HPA na ausência do inóculo da cepa BR 7411.....	115

Figura 41. plantas cultivadas em diferentes concentrações de HPA na presença do inóculo da cepa BR 7411.....	115
Figura 42. Comprimento das partes aéreas (dados biométricos) de <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas na presença de HPA durante 40 DAS.....	117
Figura 43. Influência do inóculo de BR 7411 no comprimento das partes aéreas (Biometria) de <i>Medicago sativa L.</i>	118
Figura 44. Comprimento (cm) das partes raízes (dados biométricos) de <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas na presença de HPA durante 40 DAS.	121
Figura 45. Influência do inóculo de BR 7411 no comprimento (cm) das partes radiculares (dados biométricos) de <i>Medicago sativa L.</i>	122
Figura 46. Biomassa (mg) das partes aéreas (dados biométricos) de <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas na presença de HPA durante 40 DAS.....	125
Figura 47. Influência do inóculo de BR 7411 na biomassa seca (mg) das partes aéreas (daos biométricos) de <i>Medicago sativa L.</i>	126
Figura 48. Desenvolvimento de <i>Medicago sativa L.</i> nas diferentes concentrações de HPA durante 40 DAS, na presença (A) e ausência (B) da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti.</i>	127
Figura 49. Biomassa (mg) das raízes de <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas na presença de HPA durante 40 DAS.	130
Figura 50. Influência do inóculo de BR 7411 na biomassa seca (mg) das partes radiculares de <i>Medicago sativa L.</i>	131
Figura 51. Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g-1 de Solo) durante 40 DAS em resposta a presença de HPA, em cultivos de <i>Medicago sativa L.</i> na presença da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti.</i>	134
Figura 52. Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g-1 de Solo) durante 40 DAS em resposta a presença de HPA, em cultivos de <i>Medicago sativa L.</i> na ausência da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti.</i>	134
Figura 53. Concentração Fenantreno (A) Antraceno (B) e Pireno (C) em solos contaminados com 150 ppm de HPA total (50 ppm de cada HPA) por 40 DAS.....	138
Figura 54. Percentual de remoção de Fenantreno (A) Antraceno (B) e Pireno (C) em solos contaminados com 150 ppm de HPA total (50 ppm de cada HPA) por 40 DAS.	139
Figura 55. Concentração Fenantreno (A) Antraceno (B) e Pireno (C) em solos contaminados com 300 ppm de HPA total (100 ppm de cada HPA) por 40 DAS.....	144
Figura 56. Percentual de remoção de Fenantreno (A) Antraceno (B) e Pireno (C) em solos contaminados com 300 ppm de HPA total (100 ppm de cada HPA) por 40 DAS.	145
Figura 57. Concentração Fenantreno (A) Antraceno (B) e Pireno (C) em solos contaminados com 450 ppm de HPA total (150 ppm de cada HPA) por 40 DAS.....	149
Figura 58. Percentual de remoção de Fenantreno (A) Antraceno (B) e Pireno (C) em solos contaminados com 450 ppm de HPA total (150 ppm de cada HPA) por 40 DAS.	149
Figura 59. SDS-PAGE – 15 % das proteínas obtidas nas etapas do método de extração de proteínas com Tris-Mg/NP-40 e depleção de RuBisCO com sulfato de protamina para a identificação de proteínas pouco abundantes (Low Abundant Proteins – LAPs).	152
Figura 60. Eficácia do método de depleção de RuBisCO com sulfato de protamina - Interface de busca de amostras de proteínas depletadas (LAPs), obtidas no <i>Matrix Science – Mascot Search – MS/MS ion Search.</i>	153
Figura 61. SDS-PAGE15 % de proteínas pouco abundantes (<i>Low Abundant Proteins – LAPs</i>) influência de BR 7411 no perfil protéico de plantas cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA total.	155
Figura 62. SDS-PAGE15 % de RuBisCo com Sulfato de Protamina. influência de BR 7411 no perfil protéico de plantas cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA total.	156
Figura 63. SDS-PAGE 15 % das partes aéreas de plantas de <i>Medicago sativa L.</i> Cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA.....	157
Figura 64. Gráficos da abundância relativa das proteínas mais expressas no controle (<i>Fold change > 2</i>).	161
Figura 65. Gráficos da abundância relativa das proteínas mais expressas em 300 ppm de HPA Total (<i>Fold change > 2</i>).	162
Figura 66. Classificação funcional, baseada no KEGG, para as proteínas identificadas em amostras de tecido aéreo de <i>Medicago sativa L</i> cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA total. ..	164
Figura 67. Gráficos com distribuição do percentual de proteínas por função biológica baseada no KEGG.	165

Figura 68. Rede de interações das candidatas a proteínas relacionadas a fitorremediação (PRFs) e sua participação em processos biológicos.	170
Figura 69. Rede de interações das candidatas a proteínas relacionadas a fitorremediação (PRFs) e sua participação em funções moleculares.	171
Figura 70. Rede de interações das candidatas a proteínas relacionadas a fitorremediação (PRFs) e sua localização nos compartimentos celulares.	172
Figura 71. Detecção de HPA em <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas por 10 dias na presença e ausência da cepa BR 7411 em diferentes concentrações de HPA.	176
Figura 72. Tráfego de HPA em cotilédones de <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas por 10 dias na presença e ausência da cepa BR 7411.	177
Figura 73. Detecção de HPA em <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas por 20 dias na presença e ausência da cepa BR 7411 em diferentes concentrações de HPA.	178
Figura 74. Microscopia de fluorescência de tecidos frescos recém destacados das plantas cultivadas na presença de 450 ppm de HPA por 20 DAS.	179
Figura 75. Detecção de HPA em <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas por 10 DAS na presença e ausência da cepa BR 7411 em diferentes concentrações de HPA.	183
Figura 76. Detecção de HPA em <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas por 20 DAS na presença e ausência da cepa BR 7411 em diferentes concentrações de HPA.	184
Figura 77. Detecção de HPA em nódulos de <i>Medicago sativa L.</i> de 20 DAS em diferentes concentrações de HPA.	185
Figura 78. Detalhe do interior do nódulo de <i>Medicago sativa L.</i> de 20 DAS na presença de 300 ppm de HPA total.	186
Figura 79. Possíveis estruturas vesiculares, contendo HPA em <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas por 10 e 20 DAS em diferentes concentrações de HPA.	187
Figura 80) Modelo proposto da localização celular e atuação das LAPs relacionadas a fitorremediação nas reações de fase I, II e III.	236
Figura 81) Destino dos HPA nos tecidos de <i>Medicago sativa L.</i> observados por microscopia de fluorescências.	247
Figura C1. Perfil de crescimento da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> em 3 meios de cultivo diferentes, 79, DYGS e TY.	324
Figura C2. Curva de calibração de BR 7411 em meio 79.	324
Curvas analíticas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.	342

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) prioritários.	21
Tabela 2. Níveis de HPA encontrados em amostras de sedimento para diferentes regiões do mundo.	27
Tabela 3: Cultivares de alfafa, utilizados no Sul e Sudeste do Brasil.	46
Tabela 4 - Proteínas identificadas em partes aéreas de <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas em solo controle (<i>fold change</i> > 2)	159
Tabela 5 - Proteínas identificadas em partes aéreas de <i>Medicago sativa L.</i> cultivadas em solo contaminado com 300 ppm de HPA total (<i>fold change</i> > 2)	160
Tabela 7. Possíveis candidatas a Proteínas Relacionadas a Fitorremediação (PRFs).	167
Tabela 8. Proteínas mais expressas em plantas cultivadas na ausência de HPA	290
Tabela 9. Proteínas mais expressas em plantas cultivadas na presença de HPA.....	300

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	19
1.1.1. Características gerais	19
1.1.2. Aspectos toxicológicos	22
1.1.5. Tecnologias de biodegradação.	31
1.2. FITORREMEDIAÇÃO.....	32
1.2.1. O uso de plantas no sequestro de contaminantes	32
1.2.2. Conceito de biodisponibilidade e bioacessibilidade	33
1.2.3. Aspectos bioquímicos da fitorremediação – Reações de fase I, II e III	35
1.2.4. Tecnologias de fitorremediação	37
1.2.4.1. Fitoextração	39
1.2.4.2. Rizofiltração	39
1.2.4.3. Fitoestabilização	39
1.2.4.4. Fitodegradação	40
1.2.4.5. Fitovolatilização	41
1.2.5. <i>Medicago sativa</i> L. e seu potencial de fitorremediação	43
1.2.6. Características, desenvolvimento e cultivo de <i>Medicago sativa</i> L.	44
1.2.7. Bactérias fixadoras de nitrogênio e seu potencial para biorremediação	46
1.2.8. O conceito de “Xenoma”	47
1.3. PROTEÔMICA	48
1.3.1. Uma ferramenta chave para a biologia de sistemas	48
1.3.2. Depleção de RuBisCO em proteômica vegetal – uma estratégia para o estudo de proteínas de baixa abundância (LAPs) por proteômica quantitativa (<i>Label-free</i>)	53
CAPÍTULO 2 - JUSTIFICATIVA	58
2. JUSTIFICATIVA	59
CAPÍTULO 3 - OBJETIVO.....	61
3. OBJETIVO.....	62
3.1. OBJETIVO GERAL.....	62
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.1. HPA e composição dos meios de cultura e soluções utilizadas na tese	64
4.2. Cultivo da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i>	64
4.2.1. Determinação da curva de crescimento da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i>	64
4.2.2. Estoque da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> em meio TY Glicerol 20 %	64
4.2.3. Curva de calibração da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> em meio 79	65
4.2.4. Controle de contaminação em culturas da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i>	65
4.2.5. Potencial de Oxidação de HPA pela cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i>	67
4.2.6. Crescimento e resposta de <i>Ensifer meliloti</i> (BR 7411) aos HPA – Cultivos em meio mineral (MM) e 79 com 50 % de sacarose.....	68
4.2.7. Autenticação do Inóculo da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> em <i>Medicago sativa</i> L.	70
4.3. Coleta e armazenamento do solo	73
4.4. Preparo dos solos para os ensaios experimentais - Metodologia de contaminação dos solos	74
4.5. Cultivo de <i>Medicago sativa</i> L. na presença de BR 7411 para os estudos de fitorremediação	75
4.6. Desenho experimental.....	78
4.6.1. Preparo das plantas para ensaios de biometria e biomassa seca	79
4.6.2. Biometria e biomassa seca	80
4.6.3. Monitoramento do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g ⁻¹) de Solo durante 40 DAS em resposta a presença de HPA	80
4.6.4. Preparo das plantas para avaliação do potencial de fitorremediação de <i>Medicago sativa</i> L.	81
4.7. Análise do potencial de fitorremediação de plantas de <i>Medicago sativa</i> L. na presença e ausência de BR 7411 e potencial de biorremediação de <i>Ensifer meliloti</i> (BR 7411).....	82

4.7.1. Extração e purificação dos extratos de HPA por cromatografia de adsorção em sílica (“Clean-Up”).....	82
4.7.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR).....	84
4.7.3. Confecção das curvas analíticas de fenantreno, antraceno e pireno	85
4.7.4. Preparo das amostras de HPA purificadas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)	85
4.8. Preparo das plantas para ensaio proteômico	86
4.8.1. Ensaio proteômico.....	87
4.8.2. Extração de proteínas com Tris-Mg/NP-40 e depleção de RuBisCO com sulfato de protamina - Identificação de proteínas pouco abundantes (Low Abundant Proteins – LAPs).....	87
4.8.3. Análise do perfil protéico por eletroforese unidimensional (1-DE).....	89
7.8.4. Hidrólise triptica (in gel), extração e dessalinização das amostras de peptídeos	89
7.8.5. Análise dos peptídeos por Nano-LC-ESI-Q/TOF	90
7.8.6. Análise proteômica quantitativa (Label-free 1D NanoUPLC/MS ^E).....	91
7.8.7. Caracterização funcional das proteínas	98
7.9. Preparo das plantas para ensaios de microscopia de fluorescência	98
7.9.1. Microscopia de fluorescência	98
7.9.2. Determinação do espectro de emissão de fluorescência de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e extração de HPA de tecidos de <i>Medicago sativa</i> L. e análise espectrofluorométrica. 99	
7.10. Análises estatísticas	101
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS	102
5. RESULTADOS	103
5.1. Controle de contaminação em culturas da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i>	103
5.2. Capacidade de oxidação dos HPA pela cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i>	104
5.3. Crescimento e resposta de <i>Ensifer meliloti</i> (BR 7411) aos HPA – Cultivos em meio mineral (MM) 105	
5.4. Crescimento e resposta de <i>Ensifer meliloti</i> (BR 7411) aos HPA – Cultivos em meio 79 (50 % de sacarose).....	107
5.5. Autenticação do Inóculo da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> em <i>Medicago sativa</i> L. ..	112
5.6. Influência do inóculo da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> no fenótipo de <i>Medicago sativa</i> L. em diferentes concentrações de HPA	114
5.7. Influência da cepa BR 7411 no comprimento médio das partes aéreas de <i>Medicago sativa</i> L. cultivada em diferentes concentrações de HPA.....	116
5.8. Influência da cepa BR 7411 no comprimento médio das partes radiculares de <i>Medicago sativa</i> L. cultivada em diferentes concentrações de HPA.	119
5.9. Influência da cepa BR 7411 na Biomassa das partes aéreas de <i>Medicago sativa</i> L. cultivada em diferentes concentrações de HPA.....	123
5.10. Influência da cepa BR 7411 na Biomassa das partes radiculares de <i>Medicago sativa</i> L. cultivada em diferentes concentrações de HPA.....	128
5.11. Monitoramento do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g ⁻¹) de Solo durante 40 DAS em resposta a presença de HPA	132
5.12. Potencial de fitorremediação e biorremediação em solos contaminados com 150 ppm de HPA total.....	135
5.13. Potencial de fitorremediação e biorremediação em solos contaminados com 300 ppm de HPA total.....	140
5.14. Potencial de fitorremediação e biorremediação em solos contaminados com 450 ppm de HPA total.....	146
5.15. Análise proteômica de <i>Medicago sativa</i> L. em solos contaminados com HPA	151
5.16. Extração de proteínas com Tris-Mg/NP-40 e depleção de RuBisCO com Sulfato de Protamina - Identificação de proteínas pouco abundantes (Low Abundant Proteins – LAPs) ...	151
5.17. Análise dos perfis protéicos de partes aéreas de <i>Medicago sativa</i> L. cultivadas em solos contaminado com 300 ppm de HPA na presença e ausência da Cepa BR 7411.	154
5.18. Análise proteômica Shotgun (Label-free) quantitativa das partes aéreas de <i>Medicago sativa</i> L. cultivadas na presença e na ausência de 300 ppm de HPA total.	157
5.19. Classificação das funções biológicas das proteínas identificadas em <i>Medicago sativa</i> L. cultivadas em solo controle e contaminado com HPA	163
5.20. Identificação de Proteínas Relacionadas à Fitorremediação (PRF) em <i>Medicago sativa</i> L. cultivadas em solos contaminados com HPA e suas interações.	165

5.21. Detecção dos HPA em <i>Medicago sativa</i> L. por microscopia de fluorescência e influência da cepa BR 7411.....	173
5.22. Detecção dos HPA em raízes de <i>Medicago sativa</i> L. por microscopia de fluorescência e influência da cepa BR 7411.....	180
CAPÍTULO 6 - DISCUSSÃO	188
6. DISCUSSÃO	189
6.1. Potencial da cepa BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i> como ferramenta para a degradação de HPA.	189
6.2. Interação entre <i>Ensifer meliloti</i> e <i>Medicago sativa</i> L. e sua influência no desenvolvimento das plantas em solos contaminados com HPA	195
6.3. Potencial de remediação de solos contaminados com HPA e o uso isolado e sinérgico das espécies de <i>Medicago sativa</i> L. e <i>Ensifer meliloti</i> (Cepa BR 7411).....	202
6.4. Análise proteômica quantitativa de proteínas de baixa abundância (LAPs) de <i>Medicago sativa</i> L., cultivada em solos contaminados com HPA e suas proteínas relacionadas a fitorremediação (PRFs).	213
6.5. Avaliação da presença e localização de HPA em tecidos aéreos e radiculares de <i>Medicago sativa</i> L. e a influência de da CEPA BR 7411 de <i>Ensifer meliloti</i>	237
CAPÍTULO 7 - CONCLUSÃO.....	248
6. CONCLUSÃO	249
CAPÍTULO 8 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....	251
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	252
CAPÍTULO 9 - BIBLIOGRAFIA	253
253	
8. BIBLIOGRAFIA.....	254
APÊNDICE A	288
LISTA DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM TECIDOS AÉREOS DE <i>Medicago sativa</i> L. CULTIVADAS EM SOLOS CONTROLE E CONTAMINADOS COM HPA. .	288
APÊNDICE B – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES USADAS NA TESE	311
311	
APÊNDICE C – Curvas de crescimento da Cepa BR 7411 e curva de calibração.	324
ANEXO A.....	325
ANEXO B.....	332
Supplemental Data A.....	340
Supplemental Data B.....	342

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

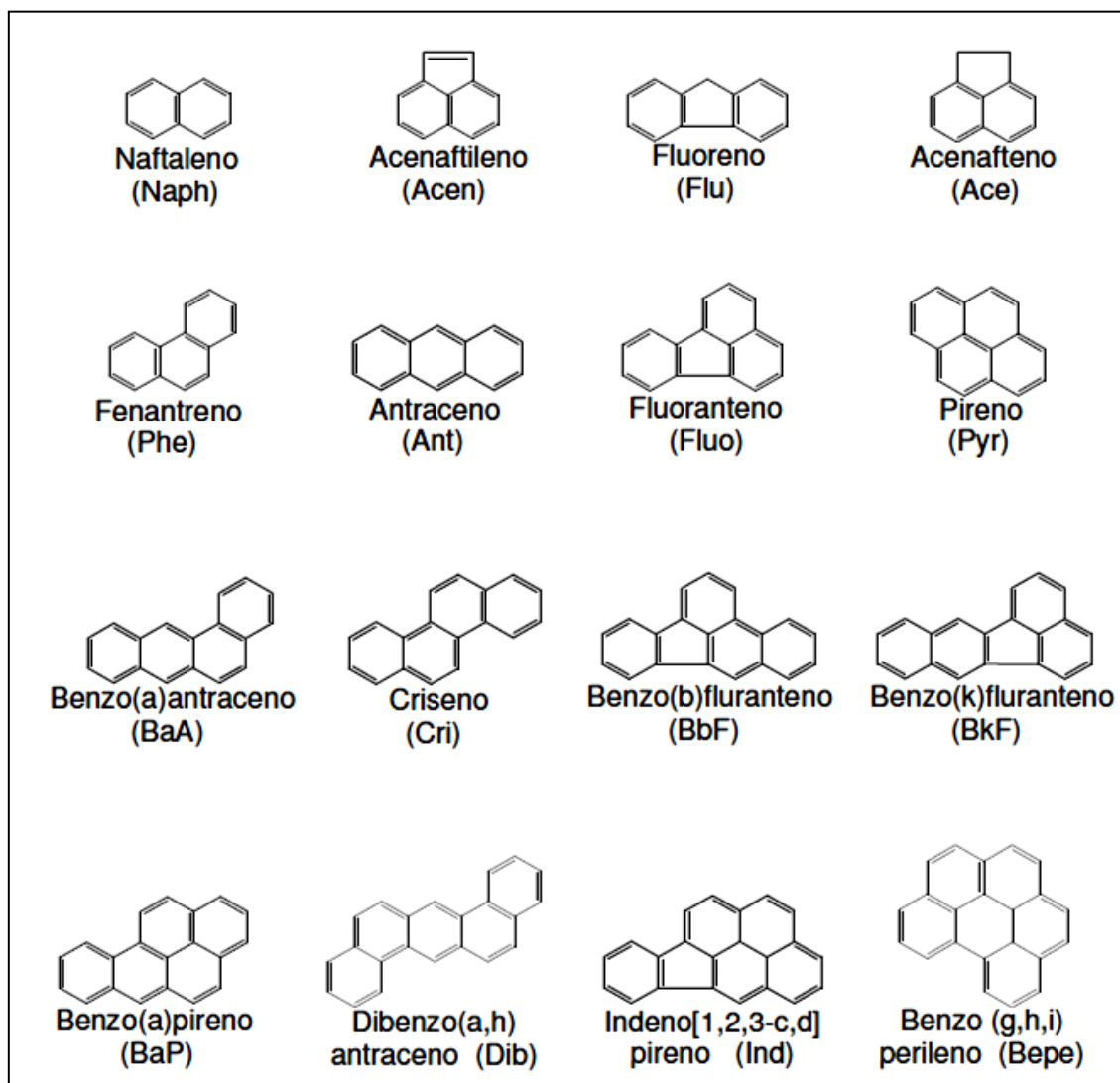
1. INTRODUÇÃO

1.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

1.1.1. Características gerais

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) são considerados poluentes prioritários em estudos ambientais, sendo alguns destes descritos como precursores de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos, (KIPOPOULO *et al.*, 1999; BRADY *et al.*, 2003; JONER *et al.*, 2002; GAO & ZHU, 2004; SU & ZHU, 2008; MEIRE *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2010). São compostos aromáticos formados por dois, ou mais, anéis benzênicos, constituídos exclusivamente de átomos de carbono e hidrogênio, podendo ser organizados sob formas lineares, angulares e agrupadas (NETTO *et al.*, 2000) (Fig. 1). Estes compostos lipossolúveis têm sua origem na combustão incompleta da matéria orgânica, sendo esta influenciada principalmente por fatores como temperatura e pressão. (GRIMMER, 1983; PAGE *et al.*, 1999, SHORT *et al.*, 2004; GAO & ZHU, 2004; SU & ZHU, 2008; LI *et al.*, 2008).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – *Environmental Protection Agency*), 16 HPA são considerados poluentes orgânicos prioritários, sendo foco de monitoramento ambiental (USEPA, 2014). São eles: Acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(α)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3 - cd)pireno, naftaleno e pireno (Fig. 1). Esses compostos apresentam de 2 a 6 anéis aromáticos fundidos entre si com peso molecular (PM) variando entre 128 e 278 g.mol⁻¹ (LATIMER e ZHANG, 2003). Suas características físico-químicas podem ser observadas na tabela 1.



Fonte: USEPA, 2014.

Figura 1. Estrutura molecular dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), considerados poluentes prioritários pela USEPA. (ALVES, 2014).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) prioritários.

Composto	Peso Molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade (mg.L ⁻¹)	Log K _{oa}	Pressão de vapor (Pa)	Número de anéis
Naftaleno	128,17	80	218	30	3,40	3,11	2
Acenaftileno	152,20	92	265	3,93	4,07	1,40	3
Acenafteno	154,21	96	279	3,47	3,92	3,66	3
Fluoreno	166,22	116	293	1,98	4,18	3,86	3
Antraceno	178,12	216	340	7x10 ⁻²	4,60	4,15	3
Fenantreno	178,23	101	340	1,29	4,50	4,15	3
Pireno	202,26	149	360	1,4x10 ⁻¹	5,18	4,58	4
Fluoranteno	202,26	111	-	2,6x10 ⁻¹	5,22	4,58	4
Benzo(a)antraceno	228,29	158	400	1,4x10 ⁻²	5,61	5,30	4
Criseno	228,29	255	-	2x10 ⁻³	5,91	5,30	4
Benzo(a)pireno	252,31	179	496	3,8x10 ⁻³	6,50	6,74	5
Benzo(b)fluoranteno	252,32	167	-	1,2x10 ⁻³	6,12	5,74	5
Benzo(k)fluoranteno	252,32	217	480	5,5x10 ⁻⁴	6,84	5,74	5
Dibenzo(a,h)antraceno	278,35	262	-	5,0x10 ⁻³	6,50	6,52	5
Benzo(g,h,i)perileno	276,23	222	-	2,6x10 ⁻⁴	7,10	6,20	6
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276,23	163	-	6,2x10 ⁻²	6,58	6,20	6

Fonte: Adaptado de LATIMER & ZHANG (2003) (ALVES, 2014).

Nota: log K_{oa} = coeficiente de partição octanol-água.

A solubilidade dos HPA em água varia desde os altamente insolúveis (ex: Benzo[g,h,i]perileno com 0,0003 mg.L⁻¹) até os pouco solúveis (ex: naftaleno, 31 mg.L⁻¹) já a pressão de vapor transita entre os compostos altamente voláteis (naftaleno) e compostos relativamente pouco voláteis (Dibenzo[a,h]antraceno).

Os HPA apresentam características lipofílicas, onde seus constituintes são classificados como moderadamente a altamente lipossolúveis, representando altos coeficientes de partição octanol-água (Log K_{oa}), que variam entre 3,37 e 6,75. Este parâmetro é definido como a relação da concentração em equilíbrio de um contaminante orgânico na fase octanol em relação à concentração do contaminante na fase aquosa, sendo importante para avaliar a mobilidade dos compostos orgânicos, pois define a hidrofobicidade do composto. Tais valores nos permitem prever possíveis processos cumulativos em compartimentos como sedimentos e solos, que são ricos em matéria orgânica adsorvida, assim como na bioacumulação em sistemas biológicos (NEFF *et al.*, 1984).

O valor de K_{oa} pode ser usado para estimar o comportamento de compostos orgânicos hidrofóbicos, que não interagem eletrostaticamente com a superfície do solo (D'AGOSTINHO & FLUES, 2006). HPA com Log K_{oa} em torno de 4 não são considerados móveis no ambiente. Contudo, aqueles que apresentam valores menores que 4, como o naftaleno e fenantreno, são capazes de entrar na cadeia alimentar concentrando-se desde os níveis primários até o topo da cadeia (HARVEY *et al.*, 2002).

Como observado na tabela 1, o peso molecular está inversamente relacionado com a solubilidade dos HPA que diminui com o aumento do número de anéis. O mesmo pode ser relacionado com a volatilidade dessa classe de substâncias, onde compostos com menores pesos moleculares apresentam elevada pressão de vapor e conseqüentemente ampla dispersão ambiental (NETTO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2005), justificando a importância do estudo, monitoramento e combate desses poluentes.

1.1.2. Aspectos toxicológicos

Graças as características lipossolúveis dos HPA, estes compostos podem ser rapidamente absorvidos pelos pulmões, intestinos e pela pele de animais expostos aos mesmos. Em dados experimentais, níveis detectáveis de HPA podem ser observados em muitos órgãos internos, sendo os maiores níveis encontrados no fígado (FORTH *et al.*, 1988; MEIRE *et al.*, 2007, IARC, 2010), glândulas mamárias e tecido adiposo, onde pelas características físico-químicas desses órgãos, podem ser considerados significativos depósitos de estocagem para HPA (MODICA *et al.*, 1983). Estudos mostram que os HPA induzem a formação de tumores em muitos tecidos de roedores e humanos (GRIMMER, 1983; CAVALIERI *et al.*, 1991; HARVEY, 1991; DIGIOVANNI, 1992; LA VOIE *et al.*, 1993; MELENDEZ-COLON *et al.*, 2000; SOLHAUG *et al.*, 2004). Alguns HPA como o benzo(α)pireno, o benzo(b)fluoranteno, benzo(a)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno e dibenzo(a,h)antraceno são apontados como carcinogênicos em testes com animais de laboratório (LO & SANDI, 1978; KRAMERS & VAN DER HELJDEN, 1988; FAZIO & HOWARD, 1993; PUNGALENDHI & MANOHARAN, 2010; IARC, 2010). Dentre esses o benzo(α)pireno, B(α)P, se destaca como um dos mais perigosos da lista de poluentes prioritários. Em

experimentos de laboratório, foi capaz de cruzar rapidamente a barreira placentária de ratos e camundongos. Também foi facilmente absorvido no trato digestório quando presente como soluto em vários tipos de lipídeos da dieta, sendo a absorção facilitada na presença de sais biliares na luz intestinal (MEIRE *et al.*, 2007). A exposição da pele humana a solos contendo concentrações em torno de 50-100 mg.kg⁻¹ de HPA ou 0,5-5 mg.kg⁻¹ de B(α)P já é considerada um fator de risco para o surgimento de câncer de pele (HARVEY *et al.*, 2002).

Uma vez absorvidos por células, os HPA são metabolicamente ativados, tornando-se reativos a grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares, onde a formação de adutos de DNA é considerada essencial na carcinogenicidade química desses compostos. No entanto, com a indução de monoxigenases de função mista da superfamília dos citocromos P450, estes contaminantes podem ser transformados em compostos mais hidrofílicos que seu precursor, e serem excretados através de fluidos biológicos (HARVEY *et al.*, 2002; MEIRE *et al.*, 2007; HARITASH *et al.*, 2009). O procedimento de oxidação enzimática, seguida de hidrólise com formação de diol-epóxidos é considerado um dos mecanismos de ativação mais aceitos atualmente na literatura para bioativação dos HPA carcinogênicos (MEIRE *et al.*, 2007).

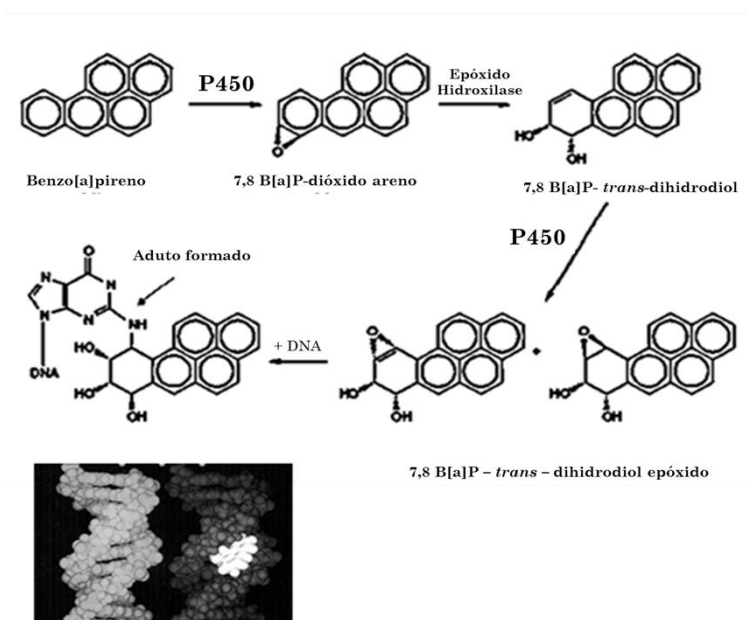


Figura 2. Ativação de benzo(α)pireno. Rota de ativação de benzo(α)pireno com a geração de diolepóxido, em detalhe, vemos o aduto de DNA representado em branco ligado a molécula de DNA. Adaptado de Harvey *et al.*, 2002 e Meire *et al.*, 2007 (ALVES, 2014).

Tomando como exemplo a ativação de B(α)P (Fig. 2), observa-se que é conduzida pela enzima citocromo P450, especialmente sob duas isoformas principais P4501A1 e P4501A2 (HALL *et al.*, 1989). No caso, o citocromo P450 é responsável pelo metabolismo de B(α)P em benzo(α)pireno-7,8-diol. Estes dióis sofrem novamente ação do citocromo P450 e transformam-se em benzo(α)pireno-7,8-diol-9,10-epóxido, que é apontado como metabólito final de efeito carcinogênico e mutagênico. Isto se deve ao fato de seu alto poder de ligação covalente ao grupo 2-amino da base nitrogenada guanina presente na fita dupla de DNA.

A carcinogenicidade do benzo(α)pireno-7,8-diol-9,10-epóxido é explicada pela teoria da região de baía, baseada em sua notável reatividade. Esta molécula possui uma característica estrutural chamada de região de baía que é um local com maior probabilidade de sofrer reação (Fig. 3). A elucidação de que a região de baía tinha grande importância na formação de cânceres se deu devido a diminuição na formação de tumores quando eram aplicados em cobaias, metabólitos contendo grupos alquil ou com halogênio substituindo a região de baía (JERINA *et al.*, 1978; MEIRE *et al.*, 2007).

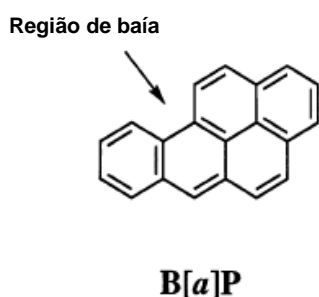


Figura 3. Estrutura molecular do benzo(α)pireno. Em destaque (seta) a localização da região de baía. (ALVES, 2014)

Quando são observados adutos de DNA em altas concentrações nas células, pode ocasionar a potencialização dos efeitos mutagênicos (AKCHA *et al.*, 2000). Como indícios disso, tem-se o envolvimento da proteína p53, responsável pelo controle da proliferação celular em mamíferos (BINKOVA *et al.*, 2000).

No trabalho de Denissenko *et al.*, (1996), foi demonstrado a ligação do derivado diolepóxido do benzo(α)pireno com regiões de alta frequência de mutações no gene

p53, particularmente nos códons 157, 248 e 273. O códon 157 foi mostrado ser um local de mutação específico de tumores de pulmão, (HOLLSTEIN *et al.*, 1991; GREENBLATT *et al.*, 1994; LEVINE *et al.*, 1995; SOLHAUG *et al.*, 2004). Já os outros códons são afetados em diferentes tipos de tumores (MEIRE *et al.*, 2007). Um exemplo disso são os HPA oriundos da queima do fumo de tabaco, largamente conhecidos por ocasionar o surgimento de câncer em vários órgãos: pulmões, laringe, cavidade oral, esôfago, bexiga, pâncreas e rins (MEIRE *et al.*, 2007).

1.1.3. Fontes de emissão

Em geral, as emissões de HPA no meio ambiente ocorrem através de quatro fontes principais: pirolítica, petrogênica, diagênicas e biogênicas (MEIRE *et al.*, 2007). O transporte desses poluentes no ambiente se dá principalmente por via atmosférica associado ao material particulado fino, permitindo sua ampla distribuição. Uma vez emitidos na atmosfera, os HPA podem ser depositados sob forma seca (vapor ou particulada) ou úmida (precipitação sob forma dissolvida ou particulada sobre sistemas aquáticos e terrestres) (GARBAN *et al.*, 2002, ROSE & RIPPEY, 2002.).

Os HPA de origem pirolítica apresentam uma maior frequência relativa para compostos com 4 e 6 anéis (ex: fluoranteno, pireno, benzo(b,k)fluorantenos e benzo(g,h,i)perileno). Eles resultam da combustão incompleta de matéria orgânica sob condições de elevada temperatura, baixa pressão e curto tempo de formação. Acredita-se que esses HPA são formados pela “quebra” ou “rompimento” da própria matéria orgânica em moléculas menores durante a pirólise, e consecutivamente rearranjados em HPA não alquilados (NEFF, 1979; MEYER & ISHIWATARI, 1993).

Os HPA de origem petrogênica são constituídos predominantemente por 2 e 3 anéis aromáticos (ex: naftaleno, fluoreno e fenantreno). Eles são formados em condições de baixa temperatura relativa, sobre escalas geológicas de tempo. Essas condições influenciam a composição primária de moléculas alquiladas, onde HPA são derivados principalmente de material vegetal fóssil (NEFF, 1979).

Os processos diagênicos, onde ocorrem no sedimento através de mudanças químicas, físicas ou biológicas sofridas após sua deposição inicial, sob condições

relativas de baixa deposição inicial, temperatura e pressão. Eles também podem formar HPA através de precursores biogênicos, como por exemplo, a formação de terpenos, derivados de material vegetal e que potencialmente geram hidrocarbonetos polinucleados como perilenos, retenos e crisenos, assim como em alguns compostos derivados de fenantreno (MEYER & ISHIWATARI, 1993; SILLIMAN *et al.*, 1998).

Uma quarta fonte potencial de HPA está na síntese biogênica desses compostos. Relatos na literatura mostram a síntese de HPA por plantas e animais, em locais onde a influência antrópica é baixa. Como exemplo temos a presença de elevadas concentrações de naftaleno em cupinzeiros, onde é mediador da comunicação entre espécies de cupim *Coptotermes formosanus* e também atua na defesa contra patógenos (WRIGHT *et al.*, 2000). Temos ainda a presença de naftaleno, perileno, e fenantreno em tecidos de plantas, como no caso do naftaleno encontrado em extratos de folhas de magnólia (AZUMA *et al.*, 1996).

Porém, a principal via de HPA para o meio ambiente está nas atividades humanas presentes em grandes centros urbanos e complexos industriais (PEREIRA *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2002; GARBAN *et al.*, 2002). Estes poluentes orgânicos chegam ao ambiente por distintas origens, seja pelos desastres ambientais como derramamentos de petróleo, combustíveis e solventes orgânicos, pelas atividades militares com explosivos e armas químicas, através da agricultura com pesticidas e herbicidas, além da ação industrial, principalmente das indústrias química e petroquímica (PILON-SMITS, 2005).

Alguns estudos relacionam positiva e diretamente os níveis de HPA no ambiente com a presença humana, principalmente quando associada às atividades industriais locais (ROSE & RIPPEY, 2002; BARRA *et al.*, 2005; HAFNER *et al.*, 2005). Sendo assim, quanto maior a atividade antrópica, maiores os níveis de HPA. Em estudo de Meire *et al.*, (2007), onde foi observado os níveis de HPA em sedimento no mundo, isto é evidente (Tab. 2).

Tabela 2. Níveis de HPA encontrados em amostras de sedimento para diferentes regiões do mundo.

Localização	HPA total (ng.g ⁻¹)	Referências
<i>Áreas remotas</i>		
Florida, NE (EUA)	1.800	Furlong <i>et al.</i> 1987
Lago Iarto, LA (EUA)	100	Catallo <i>et al.</i> 1995
Arresjoen (Ártico)	260	Fernández <i>et al.</i> 1999
Europa Central	1.100	Fernández <i>et al.</i> 1999
Lago Laja (Chile)	359	Quiroz <i>et al.</i> 2005
PARNA Serra da Bocaina, RJ (Brasil)	115	Meire 2006
<i>Áreas Urbanas & Industriais</i>		
Lago Michigan (EUA)	3.500	Simick <i>et al.</i> 1996
Lago Zurich (CH)	15.000	Walkeman <i>et al.</i> 1980
Washington (EUA)	7.000	Walkeman <i>et al.</i> 1980
Priest pot (RU)	16.000	Cranwell & Koul 1989
Rio Paraíba do Sul, RJ (Brasil)	40.000	Torres <i>et al.</i> 2002
Baía de Guanabara, RJ (Brasil)	8.035	Meniconi <i>et al.</i> 2002
Baía de Todos os Santos, BA (Brasil)	4.163	Venturini & Tommasi 2004
Lagoa dos Patos, RS (Brasil)	11.780	Medeiros <i>et al.</i> 2005
Estuário de Santos, SP (Brasil)	68.130	Bicego <i>et al.</i> 2006

Nota: Áreas consideradas urbanas e/ou industriais apresentam níveis de HPA superiores em até duas ordens de grandeza, quando comparadas com regiões remotas do globo, ou consideradas distantes de possíveis fontes de contaminação pontuais. Fonte: Meire *et al.*, (2007).

No Brasil, os maiores níveis de HPA são observados nos grandes centros urbanos e industriais do país, como no caso dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Estudos feitos na cidade de São Paulo revelam que a presença de pireno, criseno, fluoranteno e benzo(α)antraceno observados na atmosfera da cidade seriam oriundos da exaustão de veículos como automóveis, motocicletas e outros veículos movidos a gasolina e diesel (VASCONCELLOS *et al.*, 2003), como também a presença de benzo(α)pireno oriundo de fontes pontuais de queima de carvão por termoelétricas (SANTOS *et al.*, 2004). Nos trabalhos de Nishigima *et al.*, (2001) e Bicego *et al.*, (2006) elevadas concentrações de HPA (80-42,239 ng.g⁻¹ e 22,6-68.130 ng.g⁻¹ respectivamente) foram observadas em regiões de estuário próximos ao complexo industrial em Cubatão (Santos, São Paulo).

Num estudo, Pereira *et al.*, (2007) observaram que a deposição atmosférica total de HPA pode atingir concentrações acima de 2.000 ng/ (m² dia) em regiões industrializadas (Volta Redonda, RJ). Nos trabalhos de Azevedo *et al.*, (2002),

elevadas concentrações de HPA foram vistas em material particulado atmosférico (342 ng.m^{-3}) para a cidade de Campos dos Goytacases (RJ), que apresenta vasta atividade agrícola ao redor, envolvendo principalmente a monocultura de cana-de-açúcar (MEIRE *et al.*, 2007). Atividades agrícolas envolvendo a queima de biomassa vegetal são caracterizadas como fontes importantes de HPA para o ambiente (AZEVEDO *et al.*, 2002; GOMES & AZEVEDO, 2003). Outros dados importantes publicados no 1º levantamento mundial da qualidade do ar feito pela organização mundial da saúde (OMS) (Fig. 4) colocaram São Paulo e Rio de Janeiro entre as 300 cidades mais poluídas do mundo (WHO, 2012).

O Rio de Janeiro apresentou um índice de poluição do ar três vezes superior aos níveis recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e seis vezes superior aos níveis de poluição de Luxemburgo e Austrália, ocupando a 144ª posição no ranking. Nessa avaliação, contendo 1100 cidades pelo mundo, a OMS alertou que as cidades de países emergentes são hoje, não apenas as que mais se beneficiam de uma expansão econômica, mas também são as mais poluídas, seja no Brasil, Indonésia, Coreia, China ou Índia (WHO, 2012).

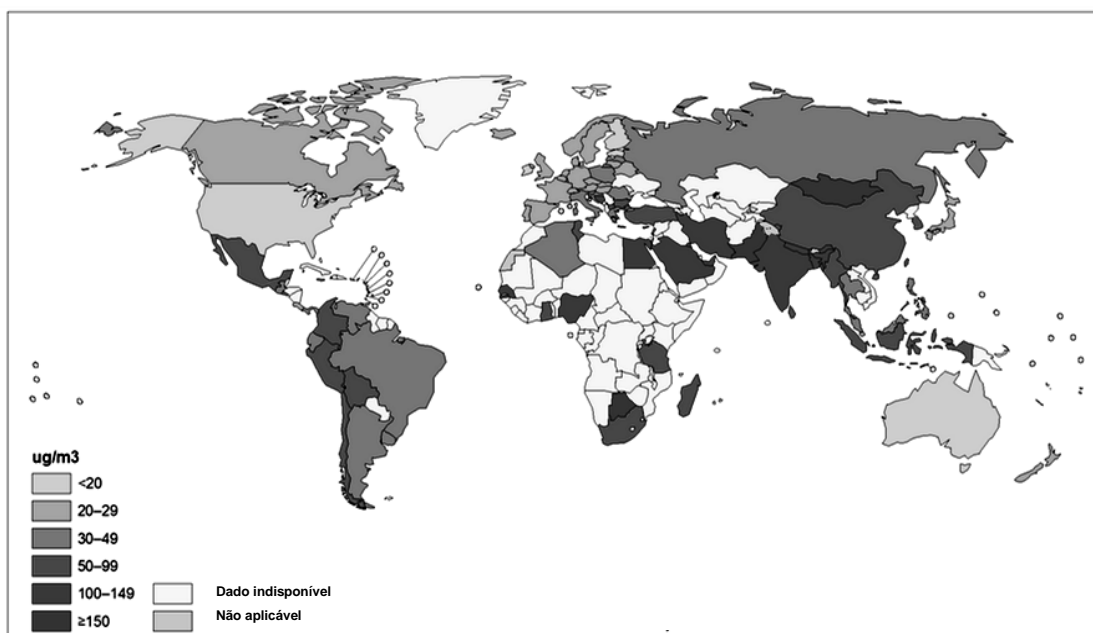


Figura 4. Mapa com os níveis de exposição à poluição ($\mu\text{g}/\text{m}^3$ de material particulado) em áreas urbanas. Fonte: WHO, 2012. (ALVES, 2014).

De acordo com Fernandes *et al.*, (2002), de 6 a 7 pessoas entre 100.000 indivíduos morrem de câncer em consequência ao tempo de exposição a ambientes contaminados que apresentem concentrações médias em torno de 0,75 ng.m⁻³ de benzo(α)pireno no ar. Isto representaria uma estimativa em torno de 720 casos extras de câncer numa população exposta de aproximadamente 11.000.000 de pessoas, (MEIRE *et al.*, 2007). De acordo com o último censo de 2010, o Rio de Janeiro apresenta-se como o terceiro estado mais populoso do Brasil, depois de São Paulo e Minas Gerais, com 15.989.929 habitantes, dos quais cerca de 80 % (o equivalente a cerca de 13 milhões de habitantes) vivem na capital Rio de Janeiro e em toda sua região de influência (IBGE, 2010). Sendo assim, seguindo as estatísticas estimadas por Fernandes *et al.*, (2002) e Meire *et al.*, (2007), isso representaria, para a população exposta, mais de mil casos extras de câncer na cidade do Rio de Janeiro.

1.1.4. Métodos de monitoramento e extração

Considerando os riscos causados pelos HPA ao meio ambiente e aos seres humanos, vários métodos de monitoramento incluindo técnicas de extração e análises quantitativas e qualitativas vêm sendo desenvolvidas para o auxílio ao combate desses poluentes prioritários. Para o monitoramento de amostras ambientais é necessário seguir as seguintes etapas: extração do (s) analito (s) da matriz onde se encontra; purificação dos extratos através da remoção de interferentes (Cromatografias de adsorção em sílica - *clean-up*); pré-concentração dos extratos a fim de ajustar as concentrações dos analitos ao nível de detecção dos aparelhos; identificação e quantificação do(s) contaminante(s) presente(s) nas amostras por técnicas instrumentais, sendo as principais a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todas estas etapas são críticas e podem influenciar nos resultados das análises. (QUEIROZ *et al.*, 2009).

Há uma variedade de técnicas de extração de HPA de amostras sólidas (solo, lodo e sedimento) utilizando solventes orgânicos. Os processos tradicionais incluem Soxhlet (WONG & WILLIAMS, 1980; GRIMALT *et al.*, 1984; LEE *et al.*, 1987; CASTRO & GARCÍA-AYUSO, 1998; GUERIN, 1998; SAUVAIN *et al.*, 2001), ultrassonicação (GRIMALT *et al.*, 1984; KRAHN *et al.*, 1991; SUN *et al.*, 1998; GUERIN, 1998; PÉREZ *et al.*, 2001; BARAN & OLESZCZUK, 2002; BARAN & OLESZCZUK, 2003; SISSINO

et al., 2003; LUQUE-GARCÍA & LUQUE DE CASTRO, 2003; HELALEH *et al.*, 2005; BANJOO & NELSON, 2005; BRUNETE-SÁNCHEZ, *et al.*, 2007), agitação mecânica (MACLEOD *et al.*, 1985; BERSET *et al.*, 1999) e refluxo com KOH metanólico (WONG *et al.*, 1980; BANJOO & NELSON, 2005). Outras técnicas mais modernas incluem extração por fluido supercrítico (SCF – *super critical fluide*) (REINDL & HÖFLER 1994; BARNABAS *et al.*, 1995; BENNER, 1998; MORSELLI *et al.*, 1999; LUQUE DE CASTRO & JIMÉNEZCARMONA, 2000), extração por líquido pressurizado (PLE – *pressure liquid extraction*) ou ASE (*accelerated solvent extraction*) - nome comercial da Dionex (HELALEH *et al.*, 2005), extração assistida por microondas (MAE – *microwave assisted extraction*) e extração assistida por microondas focalizada (FMAE – *focused microwave assisted extraction*) (QUEIROZ *et al.*, 2009).

Cada uma das técnicas tem o seu mérito e a escolha depende de vários fatores. Podemos destacar o custo do equipamento, custo operacional, quantidade de solvente orgânico requerida, número de amostras que podem ser extraídas por unidade de tempo e disponibilidade de métodos padronizados.

Dentre as técnicas listadas a ultrassonicação oferece uma série de vantagens, tornando-se o método ideal para analisar um grande número de amostras. Isto inclui alta eficiência de extração, baixo custo do equipamento e fácil operação, pouco ou nenhum preparo de amostra, baixa temperatura de extração e capacidade de processar várias amostras simultaneamente (BANJOO *et al.*, 2005).

Essa técnica de extração é fundamentada no fenômeno de cavitação acústica, onde na interface sólido-líquido, o colapso das bolhas de cavitação geradas pelo ultrassom leva a formação de “microjatos”. Com isso, tem-se energia suficiente para causar a fragmentação e aumentar a área superficial efetiva para a extração, além do aparecimento de fissuras, através das quais a mistura de solvente pode penetrar no interior das partículas, aumentando a eficiência da extração (HARDCASTLE *et al.*, 2000). Diante disso, muitos autores relataram a eficácia dessa metodologia como adequada para análise de HPA em amostras de sedimento e solo (HELALEH *et al.*, 2005; BANJOO & NELSON, 2005; BRUNETE-SÁNCHEZ, *et al.*, 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) é uma metodologia amplamente usada para análise de HPA em amostras diversas como

material particulado, sedimento, solo, amostras de água, e outros produtos derivados de petróleo, permitindo uma separação adequada dos extratos obtidos (ESCHENBACH *et al.*, 1994; BARAN & OLESZCZUK, 2002; LORS *et al.*, 2012). O uso de CLAE-FR acoplado a detecção ultravioleta compõem uma metodologia viável para separação e quantificação de HPA em amostras de solo.

1.1.5. Tecnologias de biodegradação.

Uma alternativa inteligente para o combate aos HPA está centrada na capacidade desses compostos serem degradados por processos físico-químicos e biológicos no meio ambiente. Muitos estudos vêm demonstrando a capacidade hidrocarbonoclástica de diferentes espécies de bactérias, fungos e plantas (HEDLUND *et al.*, 2001; CHAILLAN *et al.*, 2004). Valendo-se dessa capacidade, é possível observar um potencial biotecnológico nesses organismos para a remediação de ambientes contaminados (BRITO *et al.*, 2006).

São várias as técnicas de remediação desenvolvidas que podem ser empregadas. Elas são classificadas como “*in situ*” (no próprio local) ou “*ex situ*” (tratamento do material contaminado em outro local, o que implica na sua remoção e transporte), e ainda como ativa (remoção, degradação ou transformação do contaminante) ou passiva (apenas contenção e monitoramento da contaminação). Dentre as técnicas de remediação físico-química, podemos citar: Oxidação Química; Extração de Vapor do Solo (SVE); Injeção de ar (*Air Sparging*) Lavagem do Solo (*Soil Flushing*); Escavação e tratamento; Bombeamento e tratamento (*Pump and Treat*), entre outras. Contudo, as tecnologias baseadas no uso de plantas e seus microrganismos para a degradação de poluentes, como a fitorremediação, representam uma alternativa sustentável, estética e menos onerosa para o tratamento de ambientes contaminados. (PILON & SMITH, 2005).

1.2. FITORREMEDIAÇÃO

1.2.1. O uso de plantas no sequestro de contaminantes

A fitorremediação é uma das várias alternativas possíveis que podem ser utilizadas para restaurar ambientes contaminados. O aumento da popularidade dessa tecnologia é corroborado por muitos autores (CUNNINGHAM *et al.*, 1996; SALT *et al.*, 1998; MOREL *et al.*, 1999; KORTE *et al.*, 2000; MACEK *et al.*, 2000; MEAGHER, 2000; MEJARE & BULOW, 2001; PILON-SMITS, 2005; LANDMAYER, 2012). O termo fitorremediação pode ser definido como o uso de organismos vivos (plantas) com o intuito de recuperar ambientes contaminados para níveis menos nocivos (LANDMAYER 2012). Outra definição diz que a técnica faz uso da capacidade das plantas e seus microorganismos de remover, imobilizar, degradar ou tornar inofensivos ao ecossistema, contaminantes de origem orgânica e inorgânica presentes em ambientes aquáticos, terrestres e aéreos (RASKIN *et al.*, 1994, SALT *et al.*, 1995 e 1998, DOBSON *et al.*, 1995; PILON-SMITS, 2005) (Fig. 5).

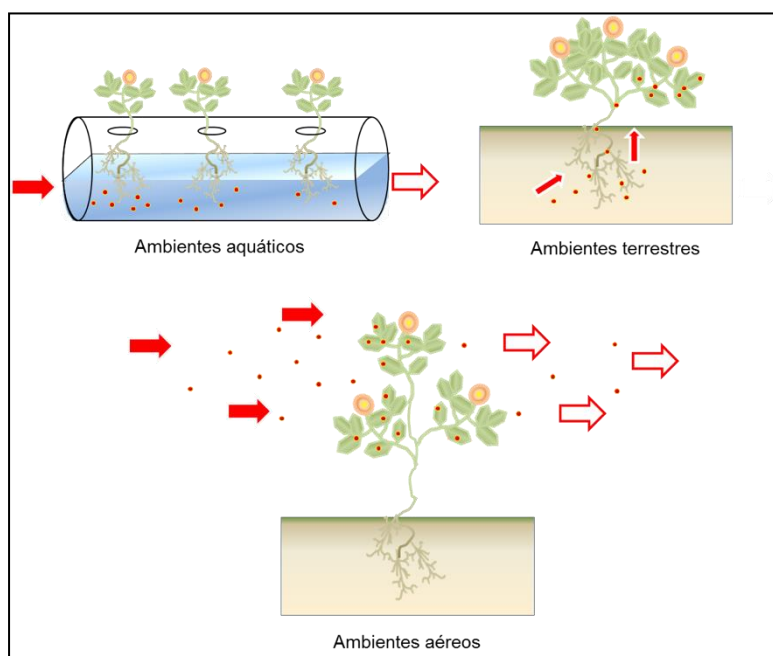


Figura 5. Tipos de ambientes que podem ser tratados pela fitorremediação. Essa técnica pode ser utilizada para a remediação de ambientes, aquáticos, terrestres e aéreos. Os pontos vermelhos indicam os contaminantes, e seu destino é representado por setas. As setas vermelhas representam os contaminantes em altas concentrações, já as brancas em baixas indicando assim o efeito remedia. Alves (2014).

A fitorremediação tem ganhado aceitação nas últimas décadas como uma alternativa rentável, não invasiva ou tecnologia complementar para os métodos baseados em engenharia de remediação (PILON-SMITS, 2005). Embora a fitorremediação pareça uma tecnologia recente, a mesma possui precedentes históricos naturais antigos. As plantas terrestres, que hoje são utilizadas para fitorremediação, apresentam adaptações evolutivas que forneceram uma vantagem seletiva para sua sobrevivência e reprodução (LANDMEYER, 2012). Estas adaptações incluíam a defesa contra ameaças químicas, pragas, bem como a produção de arsenais químicos para inibir o crescimento de plantas que competiam por recursos limitados, por um fenômeno conhecido como alelopatia, essencialmente através de uma guerra química natural para garantir sua sobrevivência (LANDMEYER, 2012). Sendo assim, por serem organismos sésseis, as plantas desenvolveram estratégias de sobrevivência para várias situações ambientais, como mudanças climáticas, disponibilidade de luz, água e nutrientes, como também a resposta à presença de compostos químicos de origem orgânica e inorgânica. Dessa forma, a interação entre as plantas e compostos alelopáticos fornece uma analogia natural para a interação entre as plantas e produtos químicos xenobióticos, encontrados em ambientes contaminados (LANDMEYER, 2012).

1.2.2. Conceito de biodisponibilidade e bioacessibilidade

Para que as plantas possam atuar como agentes de remediação em ambientes contaminados, as mesmas devem ser capazes de interagir com os contaminantes da matriz. Para que isso ocorra, os mesmos devem encontrar-se disponíveis para tal processo (OKERE & SEMPLE, 2012; LANDMEYER, 2012).

A biodisponibilidade dos poluentes orgânicos no ambiente, é definida como as interações físicas, químicas e biológicas individuais que determinam a exposição de produtos químicos, associados com solos e sedimentos, aos organismos (LANDMEYER, 2012). Este é um fator importante em estudos de remediação, e depende da estrutura do solo (o conteúdo de substâncias húmicas, valor de pH, teor de água e de porosidade) e as propriedades do poluente.

Contudo, discussões sobre o conceito de biodisponibilidade abordadas nos trabalhos de Okere & Semple (2012) e Landmeyer, (2012) levaram a formulação de duas definições para o fenômeno: “biodisponibilidade” e “bioacessibilidade”. Os autores definem como composto biodisponível aquele "que está livremente disponível para atravessar a membrana celular de um organismo, a partir do meio onde tal organismo habita, num determinado momento". Por outro lado, a definição de composto bioacessível seria aquele "que está disponível para atravessar a membrana celular de um organismo, a partir do meio ambiente onde tal organismo habita, somente se o organismo tiver acesso ao contaminante". Logo, a diferença entre as frações biodisponíveis e bioacessíveis, de acordo com a sua definição é que: “enquanto o composto biodisponível está prontamente disponível para os organismos, o composto bioacessível só está disponível quando um obstáculo temporal ou espacial é removido” (OKERE & SEMPLE, 2012). Separando assim o que está “realmente disponível” (biodisponibilidade) no solo, do que está “potencialmente disponível” (bioacessibilidade) para a ação remediadora dos organismos. Esses conceitos estão representados na figura 6.

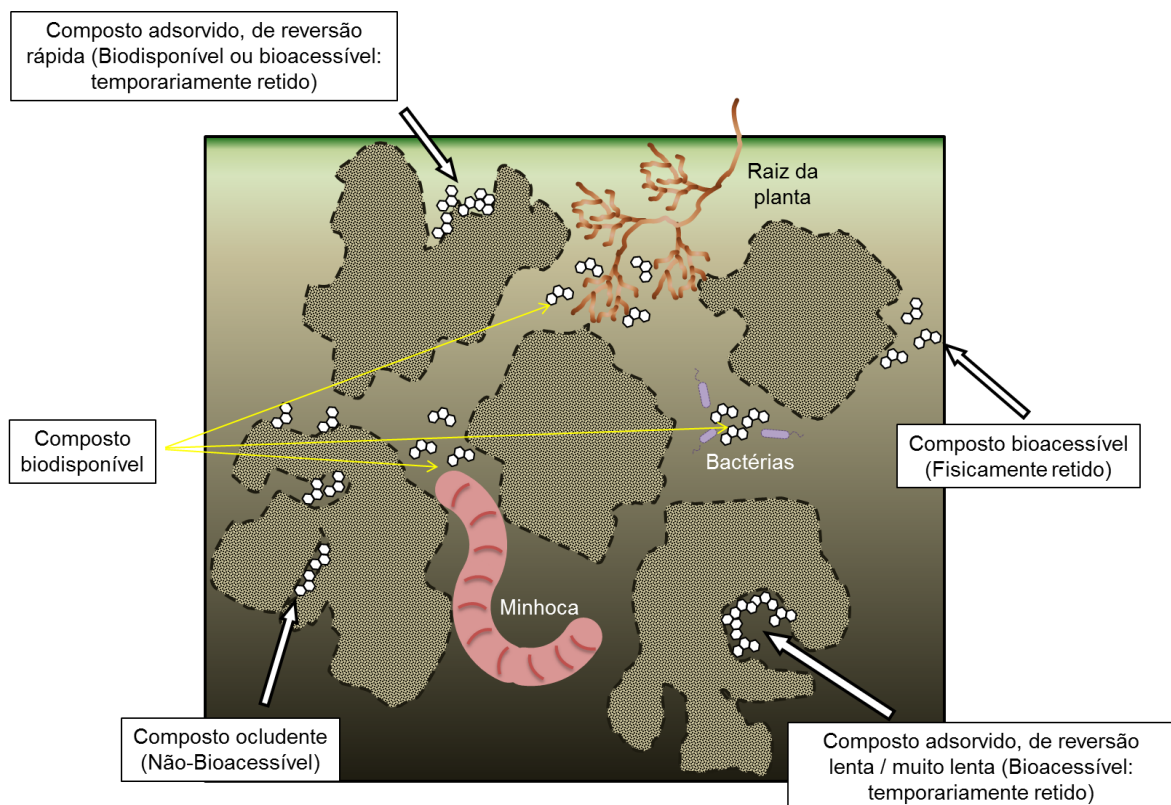


Figura 6. Conceito de biodisponibilidade e bioacessibilidade. Diagrama conceitual ilustrando as frações biodisponíveis e bioacessíveis de um contaminante no solo, conforme definido pela localização física. Adaptado de OKERE & SEMPLE, (2012). (Alves, 2014).

As substâncias húmicas representam a principal causa para as restrições colocadas sobre a biodisponibilidade. Estes compostos representam 60 - 80 % da matéria orgânica do solo. Eles são polímeros formados por unidades aromáticas e alifáticas, contendo elevado teor de grupos funcionais, incluindo grupamentos carboxílicos, compostos fenólicos, enólicos, alcoólicos e cetônicos como quinonas e hidroquinonas (STEVENSON, 1994). Eles são capazes de ligar-se aos HPA por reações de oxidação, reduzindo a biodisponibilidade desses contaminantes num processo denominado “*Aging*” ou “Envelhecimento”. Os surfactantes de origem sintética ou biológica têm sido usados para melhorar a solubilidade desses compostos em solos com altos teores de substâncias húmicas (LAHA & LUTHY, 1992; NOORDMANN & JANSSEN, 1995), tornando-os biodisponíveis/bioacessíveis para organismos presentes no solo. Uma vez solúveis esses compostos podem ser assimilados pelos vegetais e entrarem em rotas bioquímicas de degradação de xenobióticos.

1.2.3. Aspectos bioquímicos da fitorremediação – Reações de fase I, II e III

Graças à transpiração nos vegetais, a água pode ser absorvida pelas raízes e ser levada para as partes aéreas via xilema e eliminada, para a atmosfera através da abertura dos estômatos. Esse *continuum* entre solo, planta e atmosfera é que permite que compostos presentes no solo possam ser translocados para dentro do vegetal e interagir com seus tecidos, de acordo com suas propriedades físicas e químicas. Essas interações, quando deletérias, permitem a ativação de rotas metabólicas de desintoxicação. Estas vias promovem a transformação enzimática desses xenobióticos em compostos menos tóxicos (SANDERMANN *et al.*, 1992 e 1994). No caso de compostos com características lipofílicas, estes penetram mais facilmente nas células vegetais, sendo necessário torná-los compostos mais hidrossolúveis para que possam ser eliminados.

Os processos de desintoxicação das plantas são muito semelhantes aos encontrados em fígados de animais, sendo a nomenclatura utilizada para descrever essas reações e processos de degradação de xenobióticos, baseadas em modelos de mamíferos (SANDERMANN *et al.*, 1992, BURKEN, 2003 e LANDMEYER, 2012).

Esses processos recebem o nome de reações de fase I, II e III. As reações de fase I envolvem a transformação dos compostos através da oxidação e redução, bem como do metabolismo oxidativo e reações de hidrólise. As reações de fase II incluem as reações de desintoxicação, onde os compostos são ligados de forma irreversível nos tecidos vegetais por intermédio de reações de conjugação. E por fim, as reações de fase III compreendem a compartimentalização ou reações de eliminação, onde os produtos das duas reações anteriores são tratados dentro da planta em organelas celulares (McCUTCHEON & SCHNOOR, 2003).

Na fase I os compostos absorvidos, potencialmente prejudiciais ao vegetal, são transformados em subprodutos mais solúveis em água ou intermediários, que são submetidos a mais etapas de desintoxicação por outros processos. De uma maneira geral, as reações de fase I incluem a oxidação, redução e hidrólise tendo como produto final o dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O).

Outras reações de fase I incluem a hidroxilação, descarboxilação e desalquilação. Nesses casos, os grupos funcionais pertencentes a moléculas orgânicas são adicionados ao composto inicial num processo denominado funcionalização, que torna o contaminante hidrofóbico num composto mais hidrofílico, (Ex: a adição de grupamentos hidroxílicos após transformação enzimática por reações de oxidação). As reações de fase I são iniciadas pelas enzimas produzidas no retículo endoplasmático e no citoplasma das células vegetais (Fig. 7).

As reações da fase II ocorrem em seguida de reações de oxidação. Elas são predominantemente reações de conjugação e requerem enzimas como a GST (Glutathione-S-Transferase). Também necessitam de energia na forma de ATP a ser gasto pelas células (Fig. 7). As reações de conjugação permitem o aumento da hidrossolubilidade de compostos previamente oxidados e funcionalizados por reações de fase I, ou o contrário, a produção de resíduos insolúveis em água capazes de serem ligados de maneira irreversível ao tecido vegetal, tal como é feito no processo de lignificação. Pouco é conhecido sobre as rotas exatas de transformação de xenobióticos e suas taxas de desintoxicação, embora se saiba que as reações de fase II ocorrem a taxas muito mais lentas em plantas do que em mamíferos.

O acúmulo de subprodutos de fase II nas células pode reduzir a disponibilidade de enzimas necessárias para lidar com novas exposições ao contaminante. Assim, as plantas muitas vezes compartimentalizam estes subprodutos longe do citoplasma (Fig. 7). Tais reações são o último passo de desintoxicação e envolvem a estabilização dos conjugados insolúveis nos tecidos vegetais, como a lenhina, vacúolos, apoplasto e parede celular. É análoga a excreção em mamíferos, quando os produtos finais já não estão em contato direto com o citoplasma da célula (Fase III).

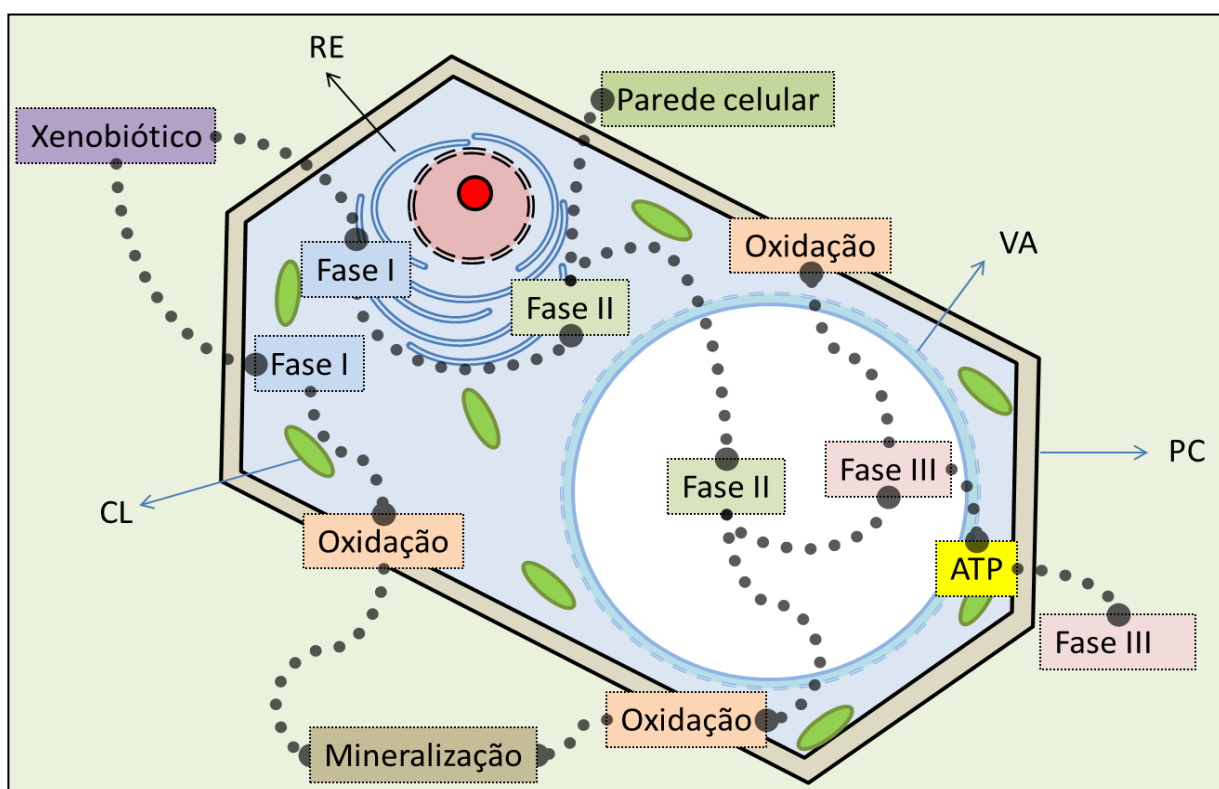


Figura 7. Resumo das reações de fase I, II e III. Esquema simplificado das diferentes rotas de desintoxicação de xenobióticos em células vegetais, através das reações de fase I, com a transformação dos compostos orgânicos em espécies químicas mais solúveis em água, ocorrendo principalmente no citoplasma da célula, e podendo ser oxidada posteriormente mineralizada (retirando o composto do citoplasma), ou passar para as etapas de fase II onde o composto segue para uma série de etapas desintoxicação e/ou conjugação, sendo direcionados para vacúolos ou paredes celulares, por fim, nas reações de fase III, pode ocorrer compartimentalização e/ou gasto energético para o bombeamento desses compostos para o meio extracelular. As legendas das setas são representadas a seguir: Retículo Endoplasmático (RE), Cloroplasto (CL), Vacúolo (VA) e Parede Celular (PC) (ALVES, 2014).

1.2.4. Tecnologias de fitorremediação

Atualmente são conhecidas diversas tecnologias de fitorremediação, estas diferem entre si de acordo com o destino que os poluentes tomam no processo de remediação. Vide a grande diversidade de estratégias de fitorremediação e os diferentes destinos desses poluentes, baseados nos processos envolvidos com a

fisiologia das plantas, McCutcheon & Schnoor (2003) classificaram a fitorremediação em cinco mecanismos básicos (Fig. 8): (1) Fitoextração - Capacidade das plantas terrestres, algas e tecidos de plantas para “sequestrar” elementos tóxicos; (2) Rizofiltração - Capacidade de absorver e, algumas vezes, precipitar contaminantes presentes em águas poluídas; (3) Fitoestabilização - Plantas tolerantes usadas para estabilizar contaminantes através da redução da biodisponibilidade; (4) Fitodegradação - Plantas e microorganismos associados utilizados para degradar poluentes orgânicos; (5) Fitovolatilização - Plantas com capacidade de volatilizarem poluentes extraídos do solo. A seguir, tais mecanismos são apresentados em maiores detalhes.

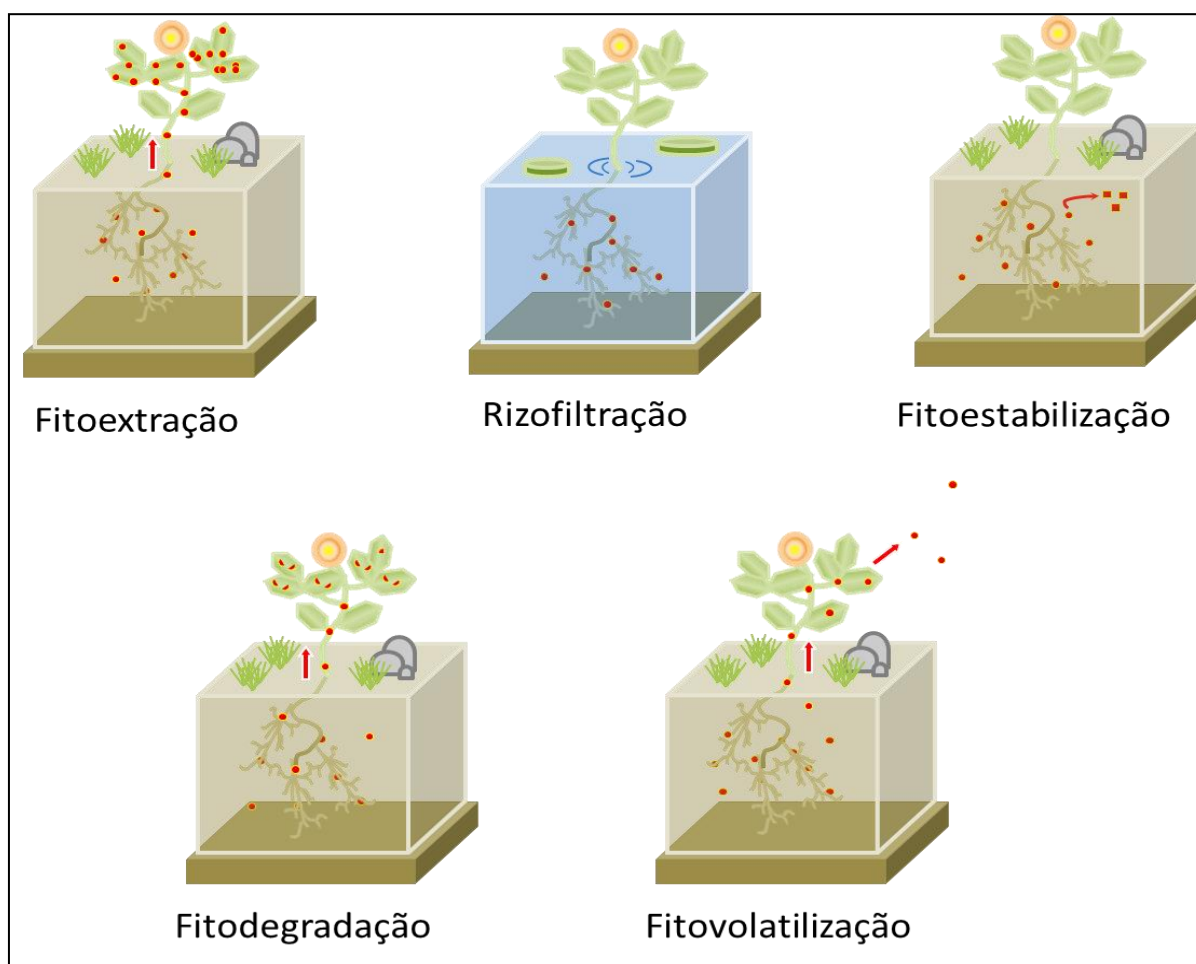


Figura 8. Mecanismos de fitorremediação. Na figura, está representado o trajeto (setas) dos contaminantes (pontos) pelo vegetal, solo e atmosfera para cada mecanismo. Nas etapas de fitoextração, o tráfego dos contaminantes ocorre das raízes até as partes aéreas, se concentrando nestes tecidos. Na rizofiltração os contaminantes podem ser observados em acúmulo nas raízes nas plantas. Para a fitoestabilização os contaminantes são estabilizados na rizosfera (indicados pelos quadrados vermelhos). Na fitodegradação o destino dos contaminantes culmina na concentração desses compostos, seguido de degradação dos mesmos (pontos partidos ao meio). Por fim, a fitovolatilização é representada pela eliminação dos compostos, em formas menos nocivas, para a atmosfera. (ALVES, 2014).

1.2.4.1. Fitoextração

A fitoextração é a absorção de contaminantes pelas raízes das plantas, seguido da translocação desses contaminantes para as partes aéreas. Os contaminantes são geralmente removidos pela colheita das plantas. Esta tecnologia concentra os contaminantes no tecido vegetal, deixando uma massa muito menor a ser eliminada através da colheita da biomassa vegetal, do que a escavação do solo ou outros meios. Sendo assim, é usada principalmente no tratamento de solos, sedimentos, e lodos, podendo ser utilizado em menor grau para o tratamento de águas contaminadas (USEPA, 2000). Esta técnica desempenha um papel especial na remoção de metais do solo. Plantas acumuladoras de metais podem ser utilizadas tanto para extração como para o reuso dos metais, sendo este mecanismo conhecido como “biomineração” (McCUTCHEON & SCHONOR, 2003).

1.2.4.2. Rizofiltração

A rizofiltração corresponde à adsorção ou absorção de contaminantes nas raízes das plantas que se encontram solúveis na rizosfera, devido a processos bióticos ou abióticos. A absorção pelas plantas, concentração e translocação pode ocorrer, dependendo do contaminante. Exsudatos de raízes das plantas podem causar ainda a precipitação de alguns metais, imobilizando os mesmos dentro ou na superfície dos tecidos vegetais. Assim, os contaminantes são removidos através da remoção física da planta, sendo esta técnica comumente empregada no tratamento de águas subterrâneas ou por cultivos hidropônicos como no tratamento de rejeitos industriais (USEPA, 2000, McCUTCHEON & SCHONOR, 2003).

1.2.4.3. Fitoestabilização

A fitoestabilização pode ser definida como: (1) a imobilização do contaminante no solo por absorção e acúmulo nas raízes, adsorção ou precipitação na rizosfera das

plantas, e (2) o uso de plantas e suas raízes para evitar a migração de contaminantes através do vento, erosão, lixiviação e dispersão no solo. Deste modo, a fitoestabilização reduz a biodisponibilidade do contaminante, alterando a solubilidade e mobilidade dos metais ou impactando a dissociação de compostos orgânicos. O termo Fitolignificação tem sido utilizado para referir-se a uma forma de fitoestabilização em que os compostos orgânicos são incorporados à lignina vegetal (CUNNINGHAM *et al.*, 1996). De outra maneira, os compostos também podem ser incorporados à fração húmica dos solos. A fitoestabilização é comumente utilizada no tratamento de solos, sedimentos e lodos. Nessa tecnologia, a remoção dos solos se faz desnecessária. O processo de cultivo das plantas leva ao aumento da restauração do ecossistema e não se torna preciso a retirada da biomassa vegetal. Em contra partida, a permanência dos contaminantes no local fazem com que essa tecnologia seja considerada uma medida provisória, sendo o monitoramento do solo, exsudatos radiculares e alterações de pH, necessários para evitar o aumento da solubilidade e lixiviação de certos contaminantes como os metais (USEPA, 2000, McCUTCHEON & SCHONOR, 2003).

1.2.4.4. Fitodegradação

A fitodegradação (ou fitotransformação) refere-se à degradação de contaminantes pelas plantas através de processos metabólicos no seu interior ou no ambiente extracelular, devido à liberação de enzimas ou compostos que degradam o poluente. Qualquer degradação causada por microrganismos associados com a raiz da planta é considerada rizodegradação. A absorção do contaminante depende da hidrofobicidade, solubilidade, e polaridade do contaminante. Compostos orgânicos moderadamente hidrofóbicos (com uma constante K_{oa} entre 0,5 e 3,0) são mais prontamente absorvidos pelas plantas e translocados para dentro do vegetal. A técnica é utilizada no tratamento de solos, sedimentos, lodos e águas subterrâneas e superficiais. A degradação enzimática do contaminante, devido à ação de enzimas produzidas pela planta, pode ocorrer em um ambiente livre de microrganismos (por exemplo, um ambiente no qual os microrganismos foram mortos por altos níveis de contaminantes). As plantas, por sua vez, são capazes de crescer em solo estéril e em solos onde os níveis de concentração de poluentes são tóxicos para os microrganismos. Dessa forma, a fitodegradação potencialmente poderia ocorrer em

solos onde a biodegradação não pode (USEPA, 2000, McCUTCHEON & SCHONOR, 2003).

1.2.4.5. Fitovolatilização

A fitovolatilização é representada pela absorção seguida de transpiração do contaminante pela planta, com a sua liberação em uma forma menos tóxica para a atmosfera. A fitodegradação é um processo de fitorremediação que pode ocorrer juntamente com fitovolatilização. Essa técnica tem sido aplicada principalmente para águas subterrâneas, mas também pode ser aplicado ao solo e sedimentos. As vantagens estão na eliminação de formas menos tóxicas para a atmosfera, estando sujeito a outras formas de degradação como a fotodegradação. Contudo, formas mais tóxicas que seus precursores podem ser eliminadas na atmosfera, acarretando numa grande desvantagem para a utilização dessa técnica (USEPA, 2000, McCUTCHEON & SCHONOR, 2003). Embora seja improvável a existência de uma “planta ideal” para a fitorremediação, um esquema resumido, baseado na obra *“Introduction to Phytoremediation”* - USEPA, 2000 (Introdução à Fitorremediação – USEPA, 2000) é apresentado a seguir. São destacadas as características vegetais exigidos para cada técnica de fitorremediação, deixando claro que as técnicas são passíveis de ocorrência simultânea para um mesmo vegetal (Fig. 9).

- Tolera, transloca e acumula contaminantes nas partes aéreas e folhas;
- Taxa de crescimento rápido ;
- Elevada produção de biomassa;
- Não é favorecido para consumo por animais;

- Capaz de remover contaminantes;
- Sem translocação de contaminantes a partir das raízes para os brotos;
- Raízes com crescimento rápido;



- Possuem enzimas apropriadas ;
- Não deve sequestrar o contaminante;
- Raízes profundas e extensas;

- Capaz de sequestrar o contaminante;
- Eliminar formas menos tóxicas que seus precursores;

- Capaz de sequestrar os contaminantes;
- Degradar os contaminantes;
- Os produtos de degradação não são tóxicos;

Figura 9. Características vegetais necessárias para cada técnica de fitorremediação (ALVES, 2014).

1.2.5. *Medicago sativa* L. e seu potencial de fitorremediação

Estudos mostram que os solos cultivados apresentam maiores taxas de desaparecimento de compostos orgânicos do que os solos não-cultivados. Isto resultou no incremento das pesquisas visando a biorremediação de solos contaminados com agrotóxicos, metais pesados, HPA, solventes orgânicos, combustíveis e etc (MERKL *et al.*, 2005, LEE *et al.*, 2008; SU & ZHU, 2008; GAO *et al.*, 2010 e MA *et al.*, 2012).

Dentre as diversas espécies vegetais utilizadas para ensaios de fitorremediação, a alfafa ou *Medicago sativa* L. destaca-se pelo grande potencial para a fitorremediação de ambientes contaminados com poluentes orgânicos. A fitorremediação de HPA por alfafa é bem estudada (KIRK *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2008 e WANG *et al.*, 2012).

Esta planta é capaz de remediar até 80 % de contaminantes como pireno e antraceno em poucos dias (60 dias em média), além de crescer em solos contaminados com altas concentrações de HPA (30-500 ppm). A alfafa também é estudada na remediação de outros compostos aromáticos como fenol (FLOCCO *et al.*, 2002) e benzeno (FERRO *et al.*, 1997). Muitos estudos avaliaram o crescimento de alfafa em solos contaminados utilizando consórcios com outros vegetais como *Lolium perenne*, *Secale cereale* L., *Sorghum bicolor* L. Moench, *Zea mays* L., *Trifolium pratense* L. e *Festuca arundinacea*, o que aprimora a eficiência da fitorremediação (ZHOU *et al.*, 2009 e GAO *et al.*, 2010, MURATOVA *et al.*, 2015).

No trabalho de Russelle (2001), é apresentada uma completa revisão sobre os 8000 mil anos de exploração da cultura da alfafa no mundo e as expectativas para o futuro dessas plantas. A descoberta de novos usos como a fitorremediação de compostos orgânicos (ex: atrazina, HPA e derivados de petróleo) e metais pesados, fazem com que novas perspectivas possam ser adotadas para o estudo e exploração dessas plantas no combate a poluição.

1.2.6. Características, desenvolvimento e cultivo de *Medicago sativa* L.

Medicago sativa L. é uma leguminosa perene, que pertence à família Fabaceae, subfamília Papilonoideae. É uma planta originária da Ásia Menor e do Sul do Cáucaso, apresentando grande variedade de ecótipos. Foi a primeira espécie forrageira a ser domesticada. É considerada a "rainha das forrageiras" pelos norte-americanos, devido ao seu elevado valor nutritivo, bem como por produzir forragem tenra e de boa palatabilidade aos animais. Apresenta cerca de duas a quatro vezes mais proteína bruta do que o trevo-branco (*Trifolium repens* L.) e a silagem de milho (*Zea mays* L.). Devido a sua boa adaptabilidade aos variados tipos de clima e solo, a alfafa tornou-se conhecida e cultivada em quase todas as regiões agrícolas do mundo (RASSINI *et al.*, 2008), como também, tem seu genoma completo disponível (YOUNG *et al.*, 2011).

Quanto ao desenvolvimento, as sementes de *Medicago sativa* L. quando em solo úmido (Fig. 10, A), iniciam a absorção de água e promovem o crescimento da raiz, partindo da radícula pré-existente e dos cotilédones (Fig. 10, B e C). No decorrer do desenvolvimento da parte aérea, o hipocótilo cresce e expõe os cotilédones acima da superfície do solo (Fig. 10, D). Posteriormente, a plântula exibe uma folha unifoliolada de forma orbicular (Fig. 10, E). Em seguida, ao longo do seu desenvolvimento, surgem as folhas pinadicompostas imparipenadas, que na maioria das vezes são trifolioladas (Fig. 10, E-F), sendo seus folíolos peciolados, normalmente oblongos ou obovados. Estas folhas também são chamadas de "folhas verdadeiras".

À medida que a planta se desenvolve, forma-se na sua base, entre a parte aérea e a raiz, um conjunto de talos denominado coroa, que na planta adulta é formada por talos perenes. Cachos de pequenas flores surgem das gemas axilares superiores do caule. Com a chegada da maturidade, vagens enroladas contendo dois, oito ou mais sementes desenvolvem-se abundantemente em regiões ensolaradas, de calor moderado, tempo seco e insetos polinizadores. As alfafas atingem 30 - 90 cm de altura (Fig. 10, G) (RODRIGUES & EROLES, 2008).

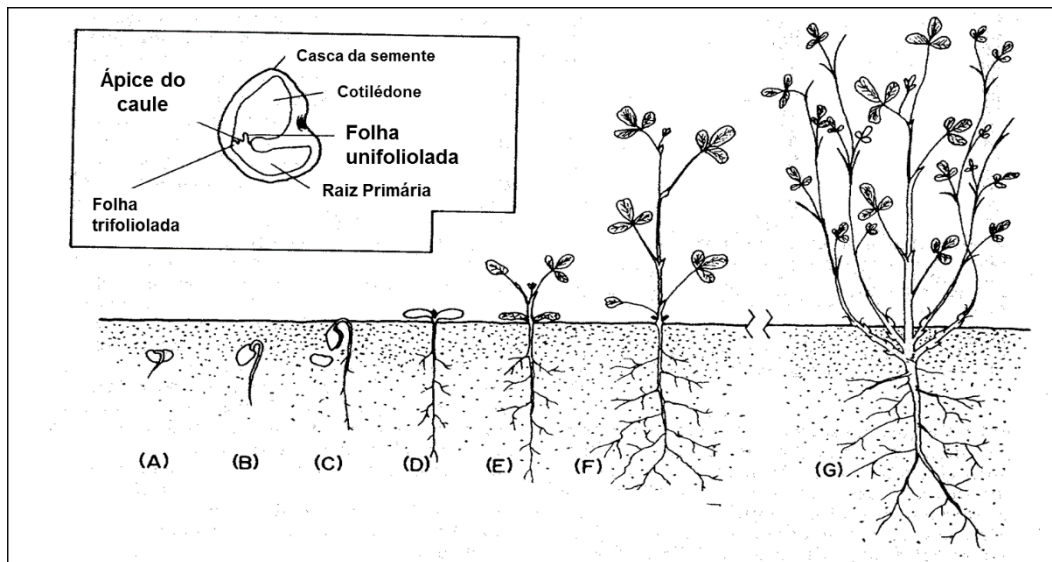


Figura 10. Etapas do desenvolvimento de *Medicago sativa* L. Adaptado de Barnes *et al.*, (1995).

O sistema radicular da alfafa é robusto e profundo, se não existirem impedimentos no perfil do solo, a raiz pode alcançar de 2 a 5 metros de profundidade com 2 a 4 anos de vida, podendo chegar a até 15 m. Essas características condizem com o fato de plantas de alfafa serem classificadas como plantas freatófitas (*Phreatophytes*), ou seja, plantas que possuem um sistema radicular profundo capaz de chegar até os lençóis freáticos (LANDMAYER, 2012). Esta característica é muito importante para a fitorremediação, vide que um denso e profundo sistema radicular permite que uma quantidade maior de contaminantes possa ter contato com as raízes e os microrganismos presentes na rizosfera, potencializando a descontaminação do ambiente. Como são freatófitas, também podem suportar grandes variações de temperatura podendo crescer em diferentes climas (Fig. 11).



Fonte: <http://west-fresh.homestead.com/>



Fonte: <http://farmprogress.com/story-western-alfalfa-conference-dec-11-3-9-54946>

Figura 11. Adaptação das alfafas em diferentes climas. A) Imagem aérea de cultivo de alfafas na Arábia Saudita. B) Alfafal em Yreka, Califórnia, EUA.

No Brasil, o cultivo da alfafa ainda é pequeno comparado ao grande potencial dessa cultura no nosso país. O estado do Rio Grande do Sul foi pioneiro propagando

amplamente a cultura em outras partes do país. Neste sentido, diversos trabalhos conduzidos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil indicam uma cultivar Crioula como a mais produtiva (RASSINI *et al.*, 2003), conforme observado na Tabela 3.

Tabela 3: Cultivares de alfafa, utilizados no Sul e Sudeste do Brasil.

Estado	Local	Melhores cultivares
RS	Guaíba	Crioula
SC	Lages	Crioula
PR	Bandeirantes	Crioula , Moapa
SP	São Carlos	Crioula , Florida-77, P ₃₀
SP	Botucatu	Crioula , Florida-77, CUF-101, Moapa
SP	Piracicaba	Florida-77, Crioula , Moapa
SP	Sertãozinho	Florida-77, Crioula , Moapa, BR 2
RJ	Paty do Alferes	Crioula , Florida-77, P ₃₀
MG	Coronel Pacheco	Crioula
MG	Sete Lagoas	Crioula , P ₃₀
MG	Lavras	Crioula , P ₃₀

Nota: Em vermelho, destaca-se a cultivar Crioula, tida como a mais produtiva. Adaptado de Rassini *et al.*, (2003)

1.2.7. Bactérias fixadoras de nitrogênio e seu potencial para biorremediação

Uma saída eficaz para o combate a essa classe de contaminantes está centrada no uso de plantas e microrganismos atuando em conjunto como ferramentas promissoras para aceleração, remoção e sequestro de poluentes orgânicos persistentes em solos contaminados. A utilização de inóculos microbianos pode acelerar a degradação dessas substâncias químicas na rizosfera (LISTE & PRUST, 2006). Vegetais e microrganismos do solo possuem limitações no que diz respeito às suas habilidades individuais de remoção e degradação de compostos orgânicos. Por sua vez, quando associados a vegetais, microrganismos podem encontrar um ambiente propício para sua sobrevivência e, em conjunto com o metabolismo vegetal,

remediar ambientes contaminados, vide que as raízes das plantas são capazes de excretar ácidos aromáticos e fosfolipídios surfactantes que são capazes de aumentar a mobilidade e a biodisponibilidade de poluentes orgânicos (NOVAK *et al.*, 1995; XING & PIGNATELLO, 1998; OLSON *et al.*, 2003; READ *et al.*, 2003).

A capacidade de degradação de HPA oriundos de óleo por microrganismos hidrocarbonoclasticos já é conhecida desde o início do século XX, pelos estudos de Stormer (1908) e Söhngen (1913), sendo a primeira apresentação da via metabólica, e suas reações enzimáticas resultante da mineralização do naftaleno, descrita por Davies & Evans (1964). Desde então, a degradação de HPA por microrganismos de vida livre tem sido intensivamente estudada, sendo identificada em uma ampla variedade de bactérias, fungos, e algas, (KUIPER *et al.*, 2004).

Em contrapartida, poucos estudos envolvendo o uso de bactérias simbióticas, em relação às de vida livre, podem ser relatados em estudos de fitorremediação de poluentes orgânicos. Neste sentido, bactérias simbióticas pertencentes ao gênero *Rhizobium sp.* e *Ensifer sp.* são bem conhecidas no estabelecimento de simbiose com leguminosas, e por sua contribuição na fixação biológica de nitrogênios atmosféricos, e mais recentemente, vistos como sendo microrganismos capazes de degradar HPA perigosos e de alto peso molecular como o benzo(a)pireno. (GONZÁLEZ-PAREDES *et al.*, 2013). Sendo assim, pesquisas envolvendo a interação planta-microrganismo simbiótico podem oferecer meios úteis para a remediação de ambientes contaminados com compostos orgânicos recalcitrantes (CHAUDHRY *et al.*, 2005), sendo estudos básicos dessa natureza essenciais para tornar a fitorremediação uma tecnologia eficaz e economicamente competitiva (HARVEY *et al.*, 2002).

1.2.8. O conceito de “Xenoma”

Embora seja conhecido o potencial de *Medicago sativa L.* em remediar HPA e outros compostos aromáticos, a elucidação dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na sua fitorremediação, continua pouco explorada na literatura e muitas vezes citado como uma lacuna de conhecimento (MERKL *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008 e WANG *et al.*, 2012, MURATOVA *et al.*, 2015). Contudo, com o advento das tecnologias “ômicas” como a genômica, proteômica,

transcriptômica e metabolômica, nos vemos num cenário promissor para o início de estudos focados nesse tema. Na tentativa de compreender os mecanismos pelos quais as plantas processam compostos sintéticos, um novo conceito denominado “Xenoma” foi definido (EDWARDS *et al.*, 2011). Entende-se por Xenoma o conjunto de proteínas envolvidas na biotransformação e processamento de compostos xenobióticos e produtos naturais envolvendo a detecção, transporte e desintoxicação desses compostos.

Atualmente, os estudos Xenômicos ainda estão centrados no metabolismo e interação de plantas, herbicidas e outros compostos diferentes de HPA. Até o presente, apenas poucos trabalhos visando à identificação de proteínas vegetais na presença de HPA foram publicados, com o intuito de estudar as proteínas envolvidas na fitorremediação (XU *et al.*, 2007 e TERVAHAUTA *et al.*, 2009, ZHANG *et al.*, 2013, LIU *et al.*, 2014, DUMAS *et al.*, 2016 e SHEN *et al.*, 2019).

Os primeiros estudos visando a identificação de proteínas relacionadas à fitorremediação (PRF), denominadas como PRP (do inglês, *Phytoremediation Related Proteins*), tiveram início em plantas de milho cultivadas na presença de pireno, e nos últimos 12 anos, as estratégias utilizadas para a identificação de PRP evoluíram, partindo dos trabalhos pioneiros de Xu *et al.*, (2007) com a utilização de análises proteômicas qualitativas, baseadas em eletroforese bidimensional seguida de MALDI-TOF, até os trabalhos de SHEN *et al.*, (2019) utilizando técnicas de proteômica quantitativa (iTRAQ).

Deste modo, as técnicas proteômicas apresentam-se como ferramentas muito úteis para auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na fitorremediação de HPA, sendo essa uma lacuna de conhecimento a ser explorada.

1.3. PROTEÔMICA

1.3.1. Uma ferramenta chave para a biologia de sistemas

O termo “proteoma” foi primeiramente utilizado em 1994 por Marc R. Wilkins, para designar todo o conjunto de “PROTEÍNAS” expresso pelo “genOMA” de uma célula, sob determinada condição ambiental e temporal (WILKINS *et al.*, 1995). Este foi o marco de uma importante vertente da era pós-genômica, que continuamente vem

contribuindo com o advento de novas tecnologias, para elucidar de maneira holística e integrada os sistemas biológicos.

O conceito do proteoma tem algumas diferenças em relação ao do genoma. Embora exista apenas um genoma definitivo para um organismo, o proteoma é uma entidade que pode alterar-se sob diferentes condições e tecidos de um único organismo. Apesar disso, o proteoma continua a ser um produto direto do genoma. Curiosamente, o número de proteínas em um proteoma pode exceder o número de genes presentes, como produtos de proteínas expressas por *splicing* alternativo do gene ou com diferentes modificações pós-traducionais (Fig.12) (WILKINS *et al.*, 1995).

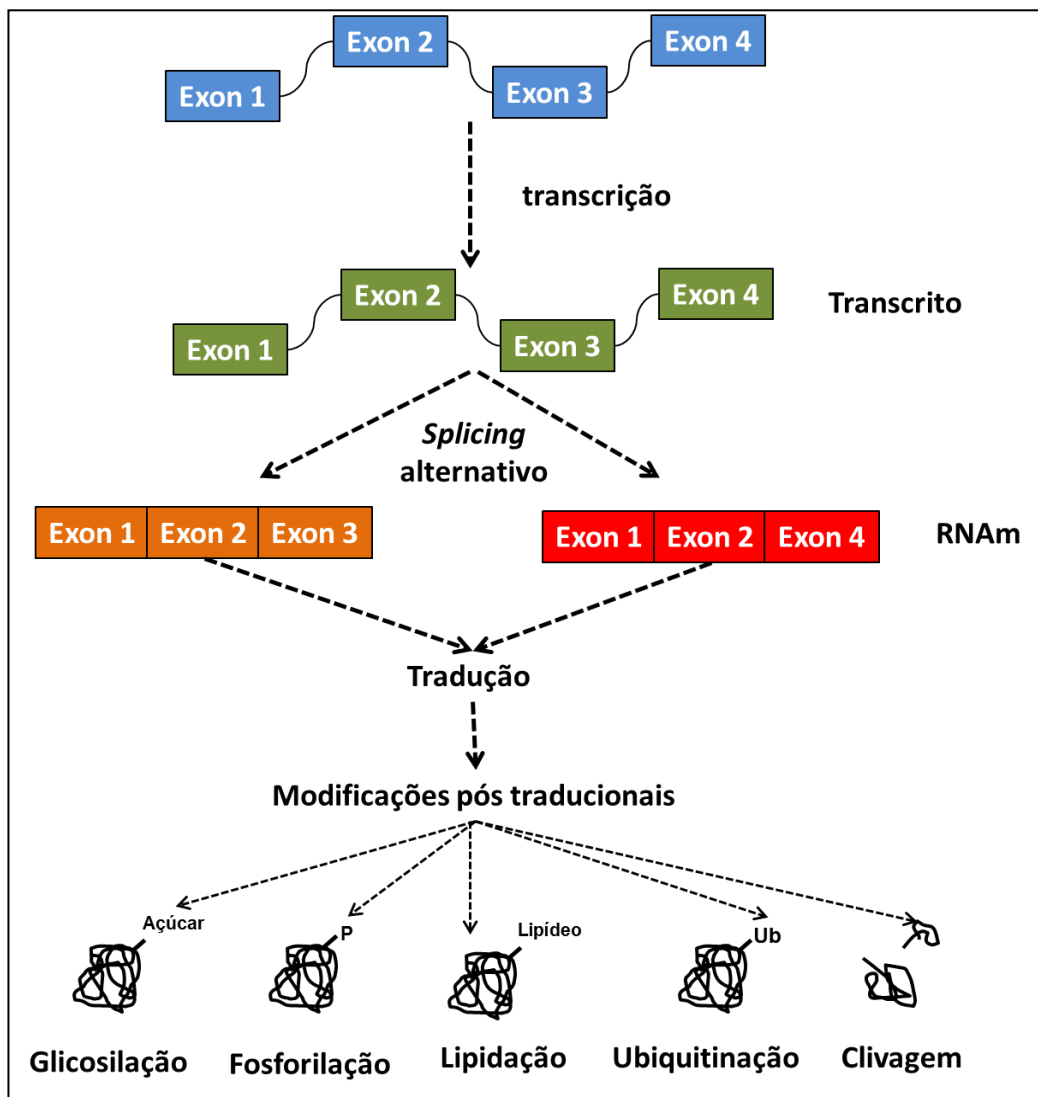


Figura 12. A complexidade do proteoma: Um gene pode produzir múltiplos RNAm via splicing alternativo de transcritos de pré-RNAm. Seguido da tradução, uma miríade de modificações pós traducionais podem produzir diferentes tipos de proteoformas. Adaptado de Wilkins *et al.*,(1995).

Com os avanços obtidos pelo sequenciamento de DNA em larga escala, houve um acúmulo de sequências em bancos de dados. Porém, essas informações isoladas não contribuem para a elucidação das funções biológicas, vide que a presença de uma *open reading frame* (ORF) nos dados genômicos não implica, necessariamente, a existência de um gene funcional (PANDEY & MANN, 2000). Isto revela a dificuldade de predizer genes a partir de dados genômicos. A confiabilidade das ORFs preditas é considerada baixa, especialmente para genes pequenos ou genes com pouca ou nenhuma homologia com genes conhecidos, sendo importante a confirmação de um produto gênico por meio da análise proteômica (MEIRELES, 2007).

As proteínas são responsáveis pelos fenótipos das células e, em função disso, torna-se impossível elucidar processos, como mecanismos de doença, envelhecimento e os efeitos do ambiente, somente pelo estudo dos genes (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Como efeito, a proteômica dedica-se ao estudo das propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK & WEIR, 1999). Embora o conceito de proteômica seja relativamente recente, os primeiros trabalhos de mapeamento de proteínas e construção de bancos de dados protéicos, usando imagens de eletroforese bidimensional, datam de meados dos anos 70 (O'FARREL, 1975), contudo a identificação dessas proteínas se tornava um problema pela falta de tecnologias sensíveis para este fim. Com o passar dos anos novas tecnologias surgiram e no final dos anos 80, o desenvolvimento da espectrometria de massas gerou grandes avanços para a identificação de proteínas em larga escala (AEBERSOLD & MANN, 2003). Surgindo com desenvolvimento dos métodos de ionização branda, como a ionização por eletrospray (FENN *et al.*, 1989) e a ionização e dissorção a laser assistida por matriz (MALDI) (TANAKA *et al.*, 1987, KARAS & HILLENKAMP, 1988) o estabelecimento da espectrometria de massa se consolidou como uma ferramenta de importância ímpar para determinar a estrutura primária das proteínas no campo da proteômica.

Hoje, os estudos proteômicos estão cada vez mais avançados e os dados gerados permitem alcançar diferentes objetivos, os trabalhos vão desde a elucidação de proteínas envolvidas em rotas metabólicas, identificação de alvos farmacológicos

e marcadores biológicos relacionados ao processo de estabelecimento e progressão de doenças, como também a caracterização de respostas celulares à drogas, doenças e fatores ambientais (ZHANG *et al.*, 2013).

A proteômica faz uso de vários métodos para a identificação de proteínas. O fluxo experimental consiste da extração de proteínas de um determinado tecido, seguido de etapas de fracionamento e posterior identificação. O proteoma de uma amostra pode ser analisado por três estratégias conhecidas como: *bottom-up*, *top-down* e *middle-down*. A primeira abordagem analisa peptídeos de origem proteolítica. Em contraste, o método *top-down* analisa proteínas intactas, e uma forma híbrida dessas duas estratégias é denominada *middle-down*, que analisa peptídeos maiores, resultantes de uma digestão limitada ou pela utilização de proteases mais seletivas (Fig. 13) (ZHANG *et al.*, 2013).

Etapas Estratégias	Mistura de proteínas	Fracionamento de proteínas	Digestão Proteolítica	Fracionamento de peptídeos	LC-MS/MS	Banco de dados de proteínas
<i>Bottom-up</i>	Lisado celular ou tecidual, frações proteicas subcelulares etc.	PAGE 1D, 2D LC, IEF etc. (opcional)	Tipicamente tripsina	SCX, IEF etc. (opcional)	Fragmentos de peptídeos	Identificação das proteínas
<i>Middle-down</i>		Dependente de tamanho.	Proteólise restrita	Dependente de tamanho.	Fragmentos maiores de peptídeos	
<i>Top-down</i>		PAGE 1D, 2D, IEF etc.	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	Fragmentos da proteína		

Figura 13. Estratégias proteômicas e suas etapas para a identificação de proteínas a partir de misturas complexas. Adaptado de Zhang *et al.*, (2013).

Um experimento genérico de proteômica com base em espectrometria de massa (MS), utilizando a estratégia *bottom-up*, consiste em cinco etapas (Fig. 14). 1º) Proteínas são isoladas a partir de lisados de células ou tecidos através de fracionamento bioquímico ou seleção de afinidade. Isto inclui frequentemente um passo final de eletroforese em gel unidimensional, e define o "sub-proteoma" a ser analisado. 2º) Após a primeira etapa, as proteínas são degradadas enzimaticamente em peptídeos, em geral por tripsina, que cliva a sequência polipeptídica na região C-terminal de Arginina e Lisina. 3º) Em seguida os peptídeos são separados por uma ou mais etapas de cromatografia líquida de alta eficiência em capilares muito finos e eluídos numa fonte iônica de electropulverização, onde são nebulizados em pequenas gotículas altamente carregadas. 4º) Após evaporação, múltiplos peptídeos carregados entram no espectrômetro de massas gerando espectros de massas da eluição dos

peptídeos, nesse caso, espectros MS1, ou "espectro de massa normal". 5º) A partir do espectro de MS1, o software gera uma lista priorizada desses peptídeos, que seguirão para a fragmentação em experimentos de espectrometria de massa em série (*tandem*) ou experimentos "MS/MS".

Isso consiste no isolamento de um determinado íon para fragmentação por colisão energética com gás inerte e obtenção do conjunto de espectro MS/MS. O MS e MS/MS são normalmente adquiridos por cerca de segundos e armazenados para fazer a comparação com bases de dados de sequências de proteínas.

O resultado do experimento é a identificação dos peptídeos e, por conseguinte, as proteínas que constituem a população proteica obtida de determinado tecido, ou órgão de um organismo (AEBERSOLD & MANN 2003).

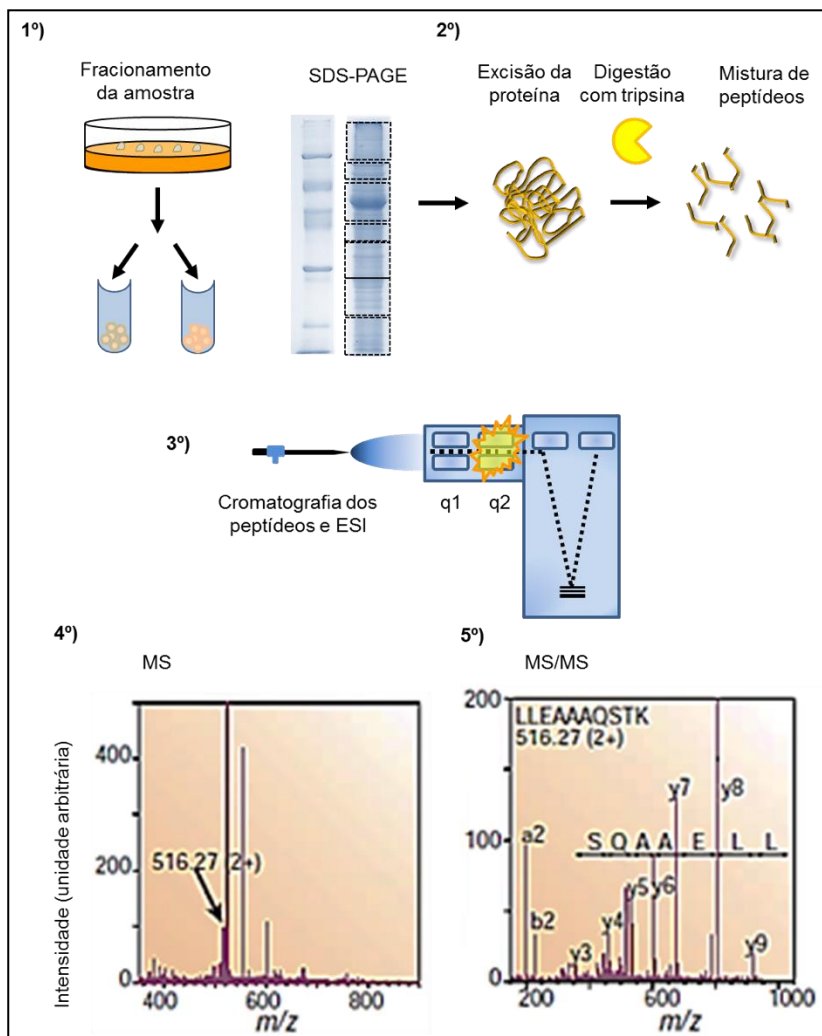


Figura 14. Etapas experimentais para um experimento genérico de proteômica baseado em espectrometria de massas. Adaptado de Aebersold & Mann (2003).

1.3.2. Depleção de RuBisCO em proteômica vegetal – uma estratégia para o estudo de proteínas de baixa abundância (LAPs) por proteômica quantitativa (*Label-free*).

A eletroforese bidimensional em gel (2D-PAGE) percorreu um longo caminho desde sua introdução, em torno de 40 anos, pelos trabalhos pioneiros de três pesquisadores de Klose, (1975), O'Farrell, (1975) e Scheele, (1975). O 2D-PAGE foi um dos maiores avanços em proteômica, permitindo que os pesquisadores detectassem, analisassem e identificassem um grande conjunto de proteínas de uma célula ou tecido, simultaneamente. Com o avanço da tecnologia, algumas modificações nessa técnica, como o desenvolvimento de tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG), foram introduzidas, o que, sem dúvida, tornou essa técnica mais simples, rápida e autônoma (BJELLQVIST *et al.*, 1982). Após sua introdução ao presente, o 2D-PAGE tem sido o método de escolha para analisar os proteomas complexos de plantas. O 2D-PAGE tem sido amplamente utilizado para investigar os efeitos do estresse biótico e abiótico, papel dos hormônios e mudanças no desenvolvimento das plantas, entre outros (AGRAWAL & RAKWAL, 2008).

No entanto, percebeu-se lentamente que a identificação das proteínas das plantas levou à detecção repetida de proteínas de alta abundância (HAPs), incluindo a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase (RuBisCO) e outras proteínas “*housekeeping*” (GYGI *et al.*, 2000; PATTERSON e AEBERSOLD, 2003; GÖRG *et al.*, 2004). Proteínas responsáveis por processos de sinalização e regulação apresentam uma baixa quantidade de cópias dentro de uma célula, sendo necessário cerca de 100 moléculas apenas em cada célula, para que essas funções bioquímicas sejam efetivas. Dessa maneira, essas proteínas são difíceis de serem identificadas através de abordagens proteômicas baseadas em digestão enzimática *in gel* ou digestão enzimática em solução, mesmo com acesso aos mais recentes espectrômetros de massa.

A proteína RuBisCO ocupa um grande percentual no total de proteínas em amostras vegetais, dificultando assim a absorção de proteínas de baixa abundância (LAPs) nas tiras IPG, o que resulta na detecção e identificação deficiente de LAPs em géis 2D e por espectrometria de massa (MS), respectivamente. Como RuBisCO é a

proteína de maior abundância em folhas de plantas, torna-se estratégico recomendar a incorporação de um método de depleção / remoção da RuBisCO em cada etapa de extração de proteína vegetal para examinar mais profundamente o proteoma da planta. A depleção da RuBisCO definitivamente melhorará a cobertura do proteoma e levará à detecção de novos LAPs não identificados.

Vários métodos de extração de proteínas com numerosas etapas de depleção foram desenvolvidos na última década para remover a RuBisCO, que é responsável por quase metade do conteúdo total de proteína foliar. Kim e colaboradores inicialmente desenvolveram um método baseado em polietilenoglicol (PEG) para a depleção da RuBisCO de folhas de arroz (KIM *et al.*, 2001). A aplicação de 20 % de PEG precipitou significativamente a proteína RuBisCO (subunidades grandes e pequenas) na fração de sedimento, resultando no enriquecimento de LAPs na fração sobrenadante. Posteriormente, foi demonstrado que 16 % de PEG foi suficiente para depletar a RuBisCO das folhas de *Arabidopsis* (XI *et al.*, 2006) indicando que este método pode ser aplicado a todas as plantas para a remoção da RuBisCO. No entanto, este método PEG apresenta-se como trabalhoso e demorado. Seguindo a abordagem de fracionamento com PEG, um novo método usando cálcio e fitato foi introduzido para a remoção da RuBisCO de folhas de soja. Os resultados revelaram que uma incubação de 10 min do extrato de folhas com 10 mM de cálcio e 10 mM de fitato a 42 °C , esgotou 86 % da proteína RuBisCO na fração do pellet (KRISHNAN & NATARAJAN, 2009). Como a incubação do extrato de proteína a 42 °C é absolutamente essencial para uma depleção significativa da RuBisCO, esta condição de temperatura pode levar à desnaturação de algumas proteínas lábeis ao calor.

A incubação a temperaturas mais baixas reduz significativamente a capacidade de precipitação de RuBisCO deste método. Por exemplo, apenas 44 % de depleção da RuBisCO foi alcançada a 4 °C (KRISHNAN & NATARAJAN, 2009). Mais recentemente, foi introduzido um método de depleção específico da RuBisCO baseado em sulfato de protamina (KIM *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a adição de 0,1 % de sulfato de protamina precipitaria diferencialmente a RuBisCO na fração do *pellet* e enriqueceria as LAPs na fração sobrenadante. Usando *Western blotting*, nenhuma RuBisCO foi detectada na fração do sobrenadante, sugerindo que este método é capaz de esgotar a RuBisCO abaixo do limite de detecção.

A análise 2D-PAGE mostrou que a aplicação desse método na soja resultou na visualização de 423 novos pontos na fração sobrenadante que não foram discerníveis na fração total. Além disso, além da soja, este método também foi aplicado a outras dicotiledoneas, como *Arabidopsis* e monocotiledôneas como arroz e milho, sugerindo que pode ser universalmente aplicado em plantas para a remoção de RuBisCO. Este método baseado em sulfato de protamina é rápido, confiável, rentável e altamente eficiente e é mais específico do que os métodos previamente publicados de PEG e fitato de cálcio (KIM *et al.*, 2013).

Além da detecção de LAPs em condições normais, a depleção de RuBisCO também pode ser frutífera para a análise de modificações pós-traducionais, pois a RuBisCO sendo uma proteína que apresenta regiões fosforilada e nitrosilada, acaba dificultando a detecção de modificações pós-traducionais em LAPs. Como observado em exemplos da literatura, a remoção da RuBisCO em amostras oriundas de folhas de *Brassica juncea* melhorou significativamente a detecção de novas LAPs que apresentavam modificações do tipo nitrosilação (SEHRAWAT *et al.*, 2013). Da mesma forma, a cobertura do fosfoproteoma da planta também pode ser aumentada com a incorporação da etapa de depleção da RuBisCO, durante a etapa de extração da proteína, como indicado na soja, onde a aplicação de fitato de cálcio durante a extração de proteína levou à identificação de 28 novas proteínas fosforiladas que eram anteriormente indetectáveis, sugerindo a aplicação dos métodos de depleção da RuBisCO também como uma poderosa ferramenta para a descoberta de proteínas modificadas pós-traducionalmente (KRISHNAN & NATARAJAN, 2009).

As técnicas quantitativas baseadas em espectrometria de massas têm sido amplamente utilizadas em toda a comunidade proteômica por vários anos (ELLIOTT *et al.*, 2009; NEILSON *et al.*, 2011). Em experimentos baseados em metodologias conduzidos por descobertas (*Discovery-Driven Science*), essas técnicas podem ser geralmente distinguidas com base na presença ou ausência de um procedimento de marcação com uma “*Label*”. Embora tenham sido alcançadas melhorias significativas nos principais passos analíticos e na análise de dados em grande escala, a identificação e quantificação de proteínas usando espectrometria de massas ainda é um desafio, especialmente para amostras biológicas complexas (NANJO *et al.*, 2011). Nesse cenário, a quantificação “*Label-free*” ganhou um grande destaque por ser uma

abordagem proteômica com um extenso número de publicações, como uma técnica de proteômica quantitativa (EVANS *et al.*, 2012). Alguns métodos utilizam marcação de proteínas ou peptídeos por isótopos ou outros reagentes identificáveis por MS, como *linkers* com isótopos pesados no caso do ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*) (GYGI *et al.*, 1999), tags isobáricas no iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) (ROSS *et al.*, 2004), e incorporação *in vivo* de aminoácidos contendo isótopos não radioativos no SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell Culture*) (ONG *et al.*, 2002). Estas técnicas são frequentemente consideradas mais precisas na quantificação de proteínas abundantes (NEILSON *et al.*, 2011).

No entanto, a alta despesa, a limitação de amostras que podem ser analisadas em um único experimento e a necessidade de software dedicado, são as principais desvantagens das técnicas de marcação isotópica, especialmente quando comparadas à quantificação *Label-free*. Além disso, relatos de subestimação de valores de *Fold changes* em experimentos iTRAQ não são incomuns (EVANS *et al.*, 2012) assim como modificações de O-acilação dependente de seqüência que podem comprometer a quantificação precisa (WIKTOROWICZ *et al.*, 2012).

As estratégias *Label-free* podem ser divididas em dois grupos distintos em experimentos proteômicos *bottom-up*: corrente de íons extraída e contagem espectral. A contagem espectral é um método quantitativo de "amostragem aleatória" baseado na premissa de que os peptídeos de alta abundância provavelmente serão mais selecionados para fragmentação e, assim, resultarão em maior número de espectros adquiridos de MS/MS (THELEN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009). Em outras palavras, a frequência dessas varreduras MS/MS reflete a abundância desse peptídeo em uma amostra. Uma vez que os dados são pesquisados contra uma base de dados particular, a abundância da proteína será estimada com base na soma de todos os espectros de MS/MS correspondentes a cada peptídeo derivado da consulta da proteína (exemplo, o número de correspondências de espectro peptídico). As razões protéicas determinadas pela contagem espectral correlacionam-se bem com outras estratégias *Label-free* (OLD *et al.*, 2005 e ZHANG *et al.*, 2006) No entanto, esta abordagem mostrou-se fraca para proteínas de baixa abundância, quando poucas contagens espectrais são adquiridas para uma proteína particular (ZHANG *et al.*, 2009 e CLOUGH *et al.*, 2009). Dessa forma, a utilização de técnicas de depleção de

RuBisCO para o enriquecimento de proteínas de baixa abundância (LAPs) pode ser uma estratégia eficiente para contornar as limitações da técnica de proteômica *Label-free*, permitindo assim identificar e quantificar proteínas antes comprometidas pela baixa contagem espectral. Além disso, o principal gargalo para a análise do proteoma foliar é a presença da proteína de alta abundância, RuBisCO, que mascaram a expressão e identificação das LAPs e dificultam sua análise, resultando na identificação repetida de grandes e pequenas subunidades da RuBisCO, acarretando em uma notável perda de tempo e dinheiro.

CAPÍTULO 2 - JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Com a revolução industrial e o desenvolvimento das grandes metrópoles, exploramos recursos naturais sem a devida preocupação com os impactos gerados ao ambiente. A crescente emissão de resíduos e poluentes, gerados por um desenvolvimento “não sustentável” acarreta sérios problemas ao planeta. Neste cenário, verificamos a ocorrência de acidentes envolvendo o derramamento de derivados de petróleo em solos e corpos d’água, destacando a periculosidade dos HPA para o ambiente. Cidades de países emergentes como o Brasil são hoje, não apenas as que mais se beneficiam de uma expansão econômica, como também as mais poluídas.

Os maiores níveis de HPA são observados nos grandes centros urbanos e industriais do nosso país como São Paulo e Rio de Janeiro, que estão entre as 300 cidades mais poluídas do mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo o Rio de Janeiro detentor de índices elevados de poluição, ocupando em 2010 a 144^a posição no *ranking* das cidades mais poluídas do mundo (WHO, 2012). Como forma de reverter este cenário, técnicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de descontaminar o ambiente, contudo, a fitorremediação destaca-se devido à sua eficiência, baixo custo, fácil acesso e por ser uma tecnologia “verde”. Esta vem ganhando destaque como uma alternativa rentável para o combate aos HPA, já que faz uso da capacidade natural das plantas e microrganismos de degradar, sequestrar ou imobilizar poluentes em diversas matrizes ambientais.

Contudo, aspectos envolvendo os fenômenos fisiológicos e bioquímicos ligados a fitorremediação ainda carecem de elucidação (XU *et al.*, 2007; TERVAHAUTA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; DUMAS *et al.*, 2016 e SHEN *et al.*, 2019) como também o trajeto desses contaminantes pelos tecidos vegetais (ALVES *et al.*, 2018), sendo estudos básicos dessa natureza essenciais para torna-la uma tecnologia eficaz e economicamente competitiva (HARVEY *et al.*, 2002). Sendo assim, o presente trabalho busca avaliar a capacidade de remediação de solos artificialmente contaminados com HPA pela planta modelo, *Medicago sativa* L. na presença de bactérias simbióticas *Ensifer meliloti*. Como também, através da abordagem proteômica, identificar possíveis proteínas envolvidas no processo, através do uso conjunto de duas técnicas, a depleção de RuBisCO e a proteômica quantitativa (*Label-*

free), permitindo assim, tal qual mencionado nos trabalhos de Gupta *et al.*, (2015), “ir mais a fundo no proteoma vegetal, em busca das proteínas de menor abundância (LAPs)” como também, ir além disso e reforçar essa afirmação, dizendo que “dentre as LAPs, também é a hora de cavar mais fundo em busca das proteínas relacionadas a fitorremediação - PRF”.

CAPÍTULO 3 - OBJETIVO

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de fitorremediação de HPA por espécies de *Medicago sativa* L. (alfafa) inoculadas com *Ensifer meliloti* BR 7411 e identificar potenciais proteínas relacionadas a fitorremediação (PRF) em alfafas cultivadas na presença de HPA.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o crescimento e geração de biomassa de alfafas (inoculadas e não inoculadas com *Ensifer meliloti* BR 7411 cultivadas em diferentes concentrações de pireno, antraceno, fenantreno em solos artificialmente contaminados (Alterados com esses contaminantes).
- Analisar o potencial de fitorremediação de alfafas acompanhando o decréscimo das concentrações de pireno, antraceno, fenantreno em solos cultivados e não cultivados ao longo do tempo de ensaio.
- Comparar o potencial de fitorremediação de alfafas inoculadas e não inoculadas com *Ensifer meliloti* BR 7411, e acompanhar o decréscimo das concentrações de pireno, antraceno, fenantreno em solos cultivados e não cultivados ao longo do tempo de ensaio.
- Avaliar a presença e localização de HPA em partes aéreas e radiculares de plantas de alfafa, por técnicas de microscopia de fluorescência.
- Identificar e classificar as proteínas expressas na presença e na ausência dos contaminantes (em plantas inoculadas e não inoculadas com *Ensifer meliloti* BR 7411), além de identificar possíveis PRF em extratos protéicos de alfafas cultivadas na presença de HPA.

CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. HPA e composição dos meios de cultura e soluções utilizadas na tese

Foram utilizados três tipos de HPA prioritários: Fenantreno, Pireno e Antraceno. Os mesmos foram obtidos nas concentrações de 98 % pela SIGMA-ALDRICH™. A composição de alguns meios de cultura e soluções podem ser vistos no apêndice B.

4.2. Cultivo da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*

4.2.1. Determinação da curva de crescimento da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*.

A cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* (pertencente a coleção de culturas de bactérias diazotróficas - CCBD – EMBRAPA Agrobiologia) foi ativada em 10 mL de meio de cultivo 79, sob agitação de 200 rpm à 30 °C por 16 horas. Após o tempo de crescimento, 1 mL de pré-inóculo de BR 7411 foi adicionado a 100 mL de três meios de cultivo diferentes: DYGS, TY e meio 79, para determinação do perfil de crescimento (SOMASEGARAN P. & HOBEN H. J. 1985 E DÖBEREINER *et al.*, 1999). (Apêndice C Fig. 1). Após análise, o meio DYGS não foi escolhido para os demais experimentos pois, após 30 horas, não era possível observar o fim da fase exponencial, além de ser um meio mais caro, sendo escolhido para o estudo o meio TY para o estoque em glicerol, vide a cepa alcançar uma alta densidade óptica (D.O.), próxima de 5 a 540 nm, em um intervalo de aproximadamente 16 horas (*overnight*), e o meio 79 por possuir em sua composição a presença de sacarose, um açúcar osmoticamente ativo em plantas, como fonte de carbono principal e por ser reportado na literatura como um meio de cultivo utilizado em ensaios de autenticação de cepas de rizóbios em leguminosas (VINCENT 1970, VINCENT *et al.*, 1979, SOMASEGARAN P. & HOBEN H. J. 1985 E DÖBEREINER *et al.*, 1999 TENG *et al.*, 2011).

4.2.2. Estoque da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em meio TY Glicerol 20 %

Após análise do perfil de crescimento da cepa BR 7411, 50 mL de um cultivo de BR 7411 em meio TY, partindo de uma D.O. de 0,2, foi crescido até metade de sua

fase exponencial (aproximadamente 11 h com D.O. de 3,0) sob agitação de 200 rpm a 30 °C e utilizado para a confecção do estoque em glicerol. Após o crescimento, em condições estéreis, alíquotas de 750 µL da cultura foram transferidas para criotubos contendo 250 µL de glicerol 80 %, homogeneizadas e estocadas em freezer - 80 °C.

4.2.3. Curva de calibração da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em meio 79

A partir do estoque em glicerol de BR 7411, foi feito um pré-inóculo 1:10 em meio 79, sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 16 horas. Após cultivo do pré-inóculo, em condições assépticas, 10 mL da cultura foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL estéril, contendo 90 mL de meio 79, totalizando 100 mL de uma cultura de BR 7411 com D.O. inicial de 0,2. A cultura de BR 7411 foi posta para crescer sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 10 horas. Em seguida, pontos foram coletados, diluições seriadas, e feito o plaqueamento em meio 79 sólido (ágar 1,5 %) para cálculo das unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹) de acordo com Somasegaran P. & Hoben H. J. (1985) (Apêndice C Fig.2). Baseados nos trabalhos de Teng *et al.*, (2011) definimos a D.O. ideal para o inóculo nas sementes de alfafa sendo igual a 1,04 (equivalente a 1x10⁹ células.mL⁻¹) e o volume a ser inoculado seria 300 µL por planta, para os ensaios de autenticação da cepa BR 7411 e 1 mL/planta para os ensaios de fitorremediação.

4.2.4. Controle de contaminação em culturas da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*.

Para averiguar a pureza do estoque de *Ensifer meliloti* (BR 7411) e monitorar possíveis contaminações em ensaios futuros, a cepa BR 7411 foi cultivada em meios de cultura contendo marcadores seletivos para *Ensifer meliloti*. Três meios de cultivo sólido (ágar 1,5 %) foram utilizados inicialmente: Meio 79 contendo marcador de vermelho do congo 25 ppm, meio 79 contendo marcador de azul de bromotimol 25 ppm e meio glicose e peptona com marcador de púrpura de bromocressol 100 ppm (Fig.15).

O indicador vermelho do congo não é absorvido (ou sutilmente) pela *Ensifer meliloti* mas é por outras bactérias, sendo assim, quando cultivada na presença do indicador, a *Ensifer meliloti* é facilmente distinguível das bactérias contaminantes, pois gera colônias brancas e cintilantes enquanto as contaminantes podem ser observadas formando colônias vermelhas e laranjas. O marcador de azul de bromotimol é um indicador de pH, sendo utilizado para determinar se a cepa pertence a um tipo de bactéria diazotrófica de crescimento ácido ou alcalino, geralmente bactérias diazotróficas de crescimento ácido possuem um crescimento mais rápido em meio 79, mudando a sua coloração verde (indicativa de pH neutro) para a coloração amarela (indicativo de pH ácido), sendo esta a característica esperada para a cepa BR 7411 (uma bactéria de crescimento rápido e ácido), ou para a coloração azul (indicativo de pH básico), esperado para algumas cepas do gênero *Bradyrhizobium* sp. O meio de cultivo glicose e peptona com marcador de púrpura de bromocressol promove a ausência de crescimento ou pouco crescimento para alguns representantes da família Rhizobiaceae, cepas pertencentes ao gênero *ensifer* tendem a ter baixo crescimento em meio glicose e peptona e não alteram a coloração do meio, mantendo as placas na coloração púrpura (pH 7,0), quando cultivado na presença de cepas contaminantes, o meio tende a acidificar tornando-se amarelo devido a fermentação da glicose, com o sem produção de CO₂ (VINCENT, 1970, VINCENT, *et al.*, 1979, SOMASEGARAN P. & HOBEN H. J., 1985 e DÖBEREINER, *et al.*, 1999).

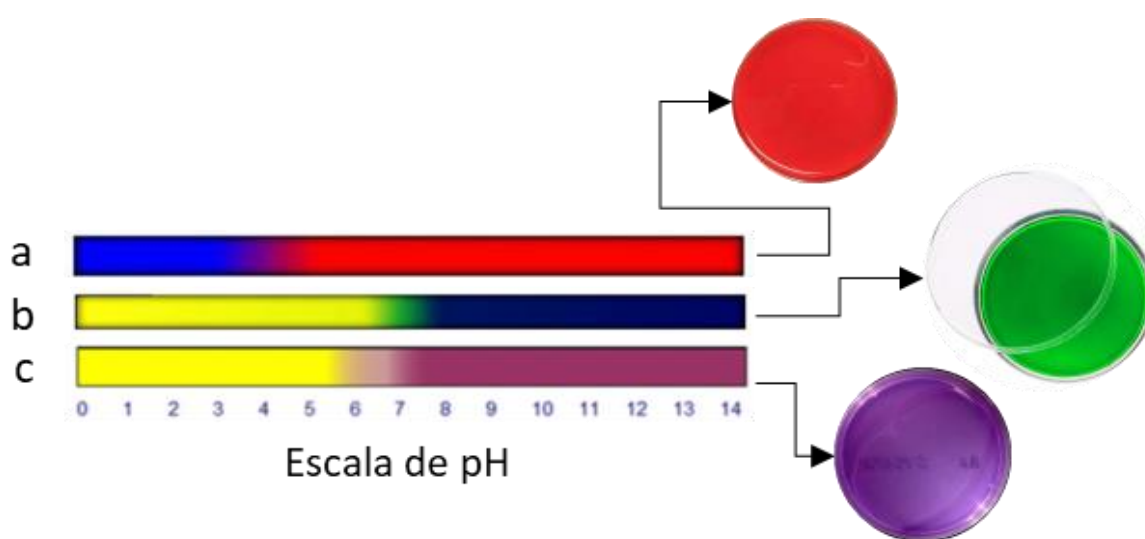


Figura 15. Coloração dos marcadores do controle de contaminação em diferentes valores de pH. A) vermelho do congo B) azul de bromotimol C) púrpura de bromocressol.

4.2.5. Potencial de Oxidação de HPA pela cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*.

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Hanson *et al.*, (1993). De início, foi feito um pré-inóculo da cepa BR 7411 em 10 mL de meio 79 onde o crescimento foi feito em shaker nas condições de 30 °C e 200 rpm. Após 16 horas de cultivo, as células centrifugadas a 5000 rpm foram lavadas (2x) com 30 mL solução de NaCl (0,85 %), para a retirada das fontes de carbono oriundas do meio 79, resultando em um inóculo livre de interferentes para o ensaio de Hanson.

Após a etapa de lavagem da biomassa celular, a mesma foi inoculada em 50 mL de meio mineral (MURATOVA *et al.*, 2015) e cultivada em shaker nas condições de 30 °C e 200 rpm até atingir a D.O. de 0,6 (aproximadamente 5 dias, etapa de estarvação). Uma vez padronizada a D.O. da cepa BR 7411 em 0,6. Para o ensaio, foram utilizadas placas de 24 poços sendo inoculadas (por poço): 200 µL da cultura de BR 7411, seguido de 1,45 mL de meio mineral, 150 µL de solução (2 g.L⁻¹) de fenantreno, antraceno ou pireno (como única fonte de carbono) em metanol, para uma concentração final de 150 ppm de HPA (150 mg.L⁻¹), e por fim 200 µL de indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol 1 % (DCPIP) para uma concentração final de 1 ppm (µg.mL⁻¹).

A capacidade de oxidação dos três HPA foi observada durante 4 dias, monitorando a mudança na coloração do meio, de azul para incolor, indicando a oxidação dos HPA e por sua vez, o consumo dessas moléculas como fonte de carbono. Como controle positivo, foram feitos ensaios contendo, por poço, 1,45 mL meio mineral suplementado com 150 µL de solução de sacarose 10 %, fonte majoritária de carbono usada para o crescimento da cepa BR 7411 em meio 79 (substituindo os HPA), além de 200 µL de BR 7411 e 200 µL de DCPIP 1 %, e como controle negativo, foi feito ensaios contendo, por poço, 1,65 mL de meio mineral contendo apenas 200 µL de DCPIP 1 %, 150 µL de metanol na presença da cepa BR 7411 (200 µL) ou na presença 150 µL de solução (2 g.L⁻¹) de cada HPA.

Um esquema detalhado do preparo do ensaio em placa de 24 poços contendo os respectivos controles pode ser observado na figura 16.

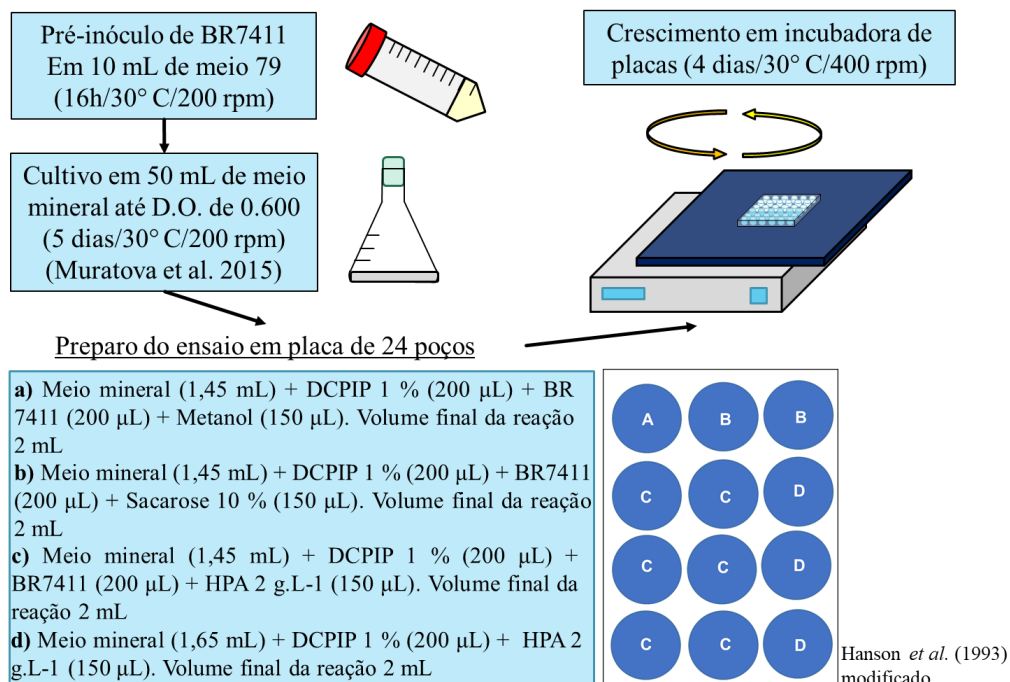


Figura 16. Etapas do ensaio de determinação do potencial de degradação de HPA pela cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*. Esquema contendo o desenho experimental do ensaio feito em placa de 24 poços, a lista de componentes representados em a e d (controles negativos), b (controle positivo) e c (tratamentos) são preparados nos poços seguindo a ordem presente ao lado da lista.

Para determinar a viabilidade da Cepa BR 7411, perante os processos de estarvação (esgotamento de reservas energeticas em cultivo por 5 dias) e cultivo em condições de estresse, em meio contendo HPA (150 ppm de pireno, antraceno e fenantreno por 4 dias), cultivos em placas de Petri foram feitos através de transferência asséptica das amostra de BR 7411, oriundas do cultivo em placa de 24 poços, utilizando alças estéreis com loop de 10 uL, seguida de semeadura por esgotamento em meio mineral sólido (ágar 1,2 %) contendo pireno, fentrantreno ou antraceno nas concentrações de 150 ppm, e postas para crescer em estufa a 30 °C por 14 dias.

4.2.6. Crescimento e resposta de *Ensifer meliloti* (BR 7411) aos HPA – Cultivos em meio mineral (MM) e 79 com 50 % de sacarose.

Para determinar se a cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* seria capaz de utilizar os HPA como fonte de carbono e averiguar um possível potencial de biorremediação desses compostos, curvas de crescimento de BR 7411 foram realizadas e em seguida, observadas as respostas da cepa BR 7411 aos HPA fenantreno, antraceno e pireno, em meio mineral (HPA como única fonte de carbono) e meio 79 modificado,

contendo apenas 50 % da concentração de sacarose (5g.L^{-1}), principal fonte de carbono do meio (onde os HPA poderiam ser co-metabolizados com a sacarose). Esses ensaios foram baseados nos estudos de González-Paredes *et al.*, (2013) e Muratova *et al.*, (2015) (Fig. 17. A - B).

Para os ensaios em meio mineral (Muratova *et al.*, 2015), foi realizado um pré-inóculo da cepa BR 7411 em 100 ml de meio 79 (YSB – Levedura/sacarose) sob agitação de 200 rpm a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ até atingir D.O. 1.04 (1×10^9 UFC.mL $^{-1}$) em seguida, as células foram centrifugadas (5000 rpm), lavadas com salina 0,85 % para a retirada de fontes de carbono presentes na biomassa celular, sendo essa etapa realizada por 2 vezes, e inoculadas em Erlenmeyer de 250 mL (triplicata) contendo 100 mL de meio mineral contaminado com 50 ppm de cada HPA (mg.L^{-1}), tendo como intuito, observar a resposta isolada dos HPA e sua influência no crescimento da cepa BR 7411. Os cultivos foram feitos sob agitação de 200 rpm a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, partindo de uma D.O inicial de 0,1, e pontos foram coletados a cada 24 horas durante 7 dias, para o monitoramento do crescimento pela D.O. (540 nm) e UFC.mL $^{-1}$, em meio 79 sólido com indicador de vermelho congo para determinar a viabilidade celular ao longo do ensaio, em resposta a presença dos HPA (Fig. 17. A).

Para ensaios em meio 79 modificado (50 % de sacarose), foi realizado um pré-inóculo da cepa BR 7411 em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio 79 (YSB – Levedura/sacarose) sob agitação de 200 rpm a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ até atingir D.O. 1.04 (1×10^9 UFC.mL $^{-1}$). Em seguida, foram inoculados 10 mL da cultura da cepa BR 7411 em Erlenmeyer de 250 mL (n=3) contendo 100 mL de meio 79 modificado (50 % de sacarose) contendo misturas de HPA (fenantreno, antraceno e pireno) nas concentrações de 0, 150, 300 e 450 ppm de HPA total (mg.L^{-1}). Os cultivos foram feitos sob agitação de 200 rpm a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, partindo de uma D.O inicial de 0,2 e pontos foram coletados a cada 4 hora durante 24 horas, para o monitoramento do crescimento pela D.O. (540 nm) e UFC.mL $^{-1}$, em meio 79 sólido com indicador de vermelho congo, avaliando assim a resposta da cepa aos HPA estudados em concentrações crescentes (Fig. 17 B).

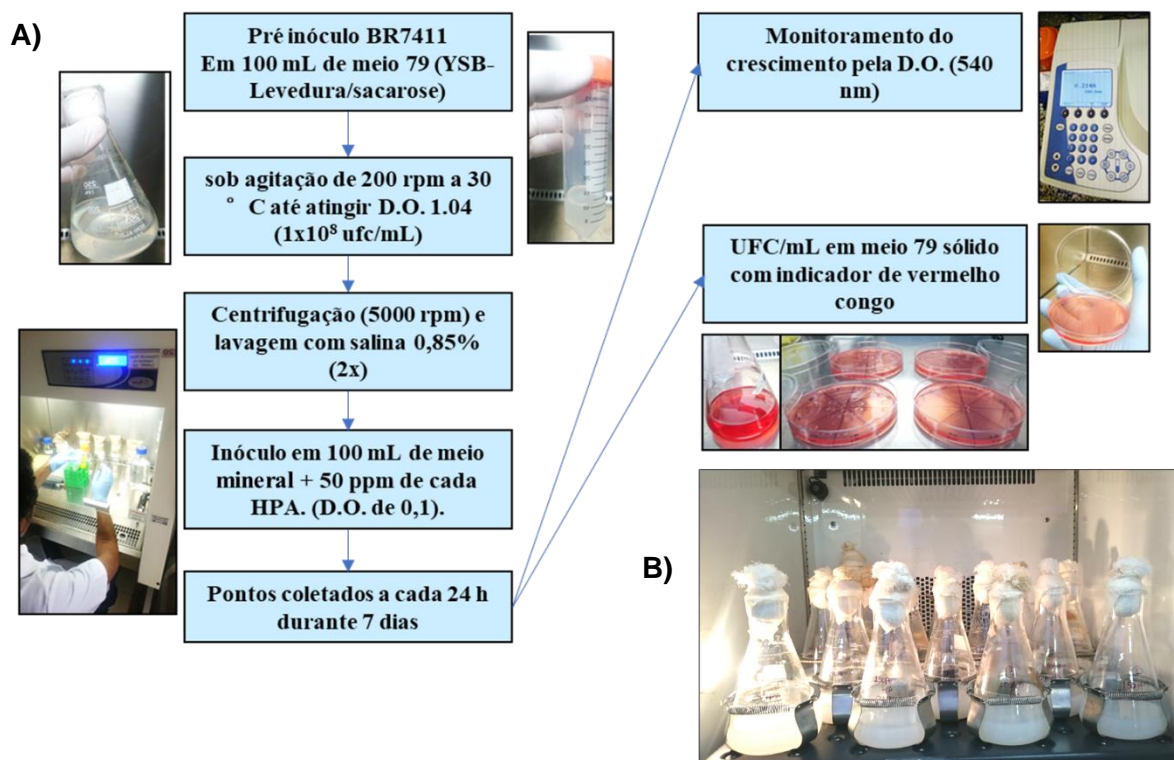


Figura 17. Esquema gráfico mostrando as etapas do cultivo da cepa BR 7411. A) preparo do ensaio em meio mineral contaminado com HPA. **B)** Cultivos em Shaker da cepa BR 7411, a cepa foi inoculada em meio de cultura (79 com 50 % de sacarose) contendo concentrações crescentes de HPA. A resposta aos contaminantes foi avaliada por D.O (540 nm) e UFC.mL⁻¹.

4.2.7. Autenticação do Inóculo da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em *Medicago sativa L.*

Para o avaliar a capacidade de infestação da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em plantas de *Medicago sativa L.* foi feito um ensaio de autenticação da cepa, seguindo a metodologia de Somasegaran P. & Hoben H. J. (1985) com modificações. 75 sementes de alfafa, (Cultivar Crioula, obtidas pela EMBRAPA) tiveram sua superfície desinfetada e germinação induzida seguindo a metodologia de Silo-Suh *et al.*, (2002) e Alves *et al.*, (2017 e 2018), as etapas desse procedimento podem ser observadas, de forma genérica, na figura 18. As sementes foram imersas e agitadas em ácido sulfúrico 95 - 97 % (aproximadamente 20 mL para 300 sementes) por 20 minutos sob gelo. Em seguida, as sementes foram lavadas com 500 mL de água destilada estéril por quatro vezes. Após as lavagens, as sementes foram cobertas com 60 mL de água destilada estéril em frasco Erlenmeyer de 125 mL e incubadas a 28 –

30 °C sob agitação de 200 rpm por 6 a 8 horas, para estimular a germinação. Posteriormente, as sementes foram lavadas com mais 60 mL de água destilada estéril duas vezes e incubadas por 16 horas em mais 60 mL de água destilada estéril nas mesmas condições de temperatura e agitação anteriores.

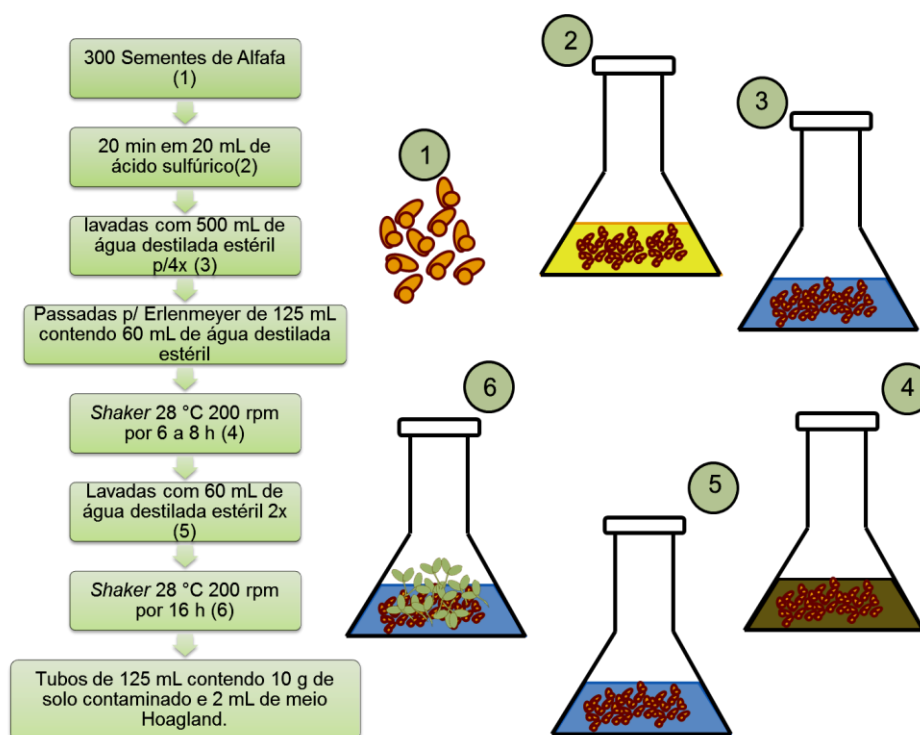


Figura 18. Etapas de esterilização e aceleração da germinação das sementes de alfafa. O número de sementes varia de acordo com a demanda de cada experimento, sendo sempre respeitada a proporção de 20 ml de ácido para cada 300 sementes. Os números (1 até 6) representam as etapas presentes no fluxograma.

Após a eclosão das plântulas, estas foram semeadas em tubos de ensaio (22 x 200 mm) estéreis com rolhas de algodão contendo 20 mL de meio Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) sólido (ágar 0,6 %), com fonte de nitrogênio (25 plântulas) e sem fonte de nitrogênio (50 plântulas), sendo um indivíduo semeado por tubo de ensaio.

Concomitantemente, foi feito um pré-inóculo da cepa BR 7411 em 10 mL de meio 79, e posto para crescer por 16 h a 30 °C sob agitação de 200 rpm, uma vez crescido o pré-inóculo, este foi passado para um Erlenmeyer estéril contendo 90 mL de meio 79, e posto para crescer por 12 h a 30 °C sob agitação de 200 rpm,

acompanhando o crescimento da cepa até alcançar a D.O. de 1,04 (equivalente a 1×10^9 células.mL⁻¹). Após alcançada a D.O. de 1,04, a biomassa de células foi lavada (4x) com 30 mL solução salina NaCl 0,85 % (para a retirada dos componentes do meio 79, que poderiam interferir no ensaio) através de centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos cada, a 4 °C. Após lavagem da biomassa celular, foi preparado o inóculo acrescentando meio Hoagland (sem fonte de nitrogênio) a biomassa lavada, até a D.O. de aproximadamente 1.

Após preparo do inóculo de BR 7411 e feita a semeadura das alfafas nos seus respectivos meios de crescimento, as 75 plantas receberam os seguintes tratamentos:

- A) 25 plântulas cultivadas em meio Hoagland sem fonte de nitrogênio, foram inoculadas com 300 µL de inóculo de BR 7411. (Tratamento)
- B) 25 plântulas cultivadas em meio Hoagland sem fonte de nitrogênio, foram inoculadas com 300 µL de Hoagland sem nitrogênio. (Controle de esterilidade)
- C) 25 plantulas cultivadas em meio Hoagland com fonte de nitrogênio, foram inoculados com 300 µL de Hoagland sem nitrogênio. (Controle positivo)

A capacidade de infestação da cepa BR 7411 em *Medicago sativa L.* foi acompanhada através da observação diária do desenvolvimento da planta, durante 40 dias. A autenticidade da cepa é confirmada quando observado o surgimento de nódulos ativos (com produção de leghemoglobina) nas raízes da alfafa. E de acordo com a metodologia de Somasegaran P. & Hoben H. J. (1985), dois controles devem ser feitos: 1º) um controle de esterilidade, onde as plantas são cultivadas em meios sem fonte de nitrogênio e na ausência de microrganismos capazes (ou não) de fixar nitrogênio, sendo o procedimento eficiente quando a planta morre ou apresenta sintomas visuais de deficiências de nitrogênio. Caso o contrário, não pode ser observado a influência da cepa em estudo (BR 7411) vide a existência de outras espécies de microrganismos que foram capazes de sobreviver a etapa de esterilização 2º) um controle positivo, onde as plantas são cultivadas em meios com fonte de nitrogênio e na ausência de microrganismos capazes (ou não) de fixar nitrogênio, sendo o procedimento eficiente quando a planta apresenta um aspecto saudável, servindo de parâmetro de comparação (condição ideal) com as plantas

cultivadas na presença de BR 7411 em meio pobre em nitrogênio, avaliando a eficiência do inóculo da cepa em estudo (BR 7411) para a fixação de nitrogênio. Um esquema gráfico das etapas de autenticação da cepa BR 7411 é apresentado na figura 19.

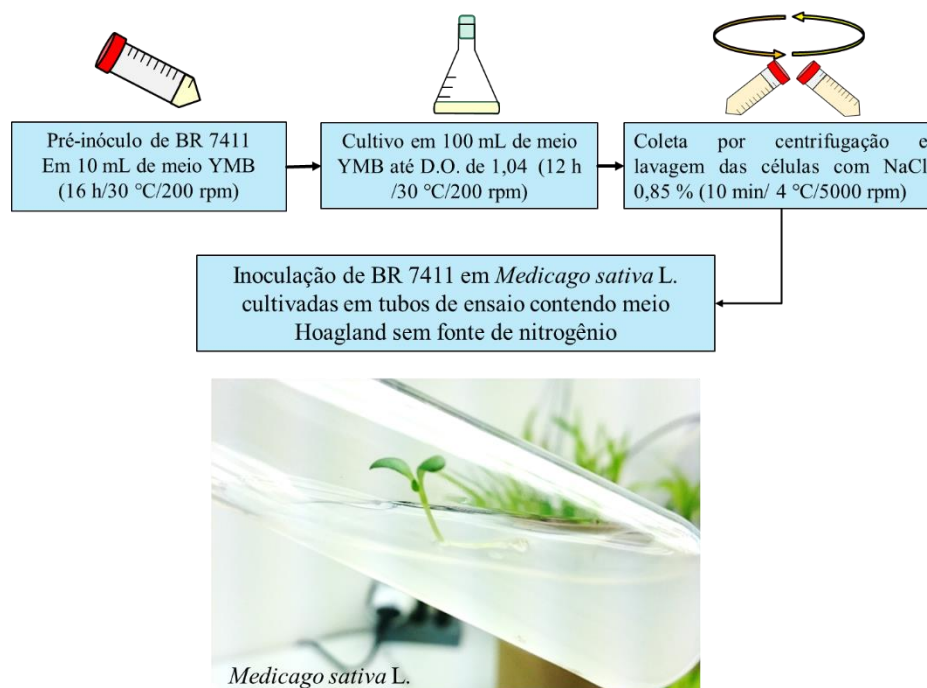


Figura 19. Etapas da autenticação do inóculo da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em plantas de *Medicago sativa* L.

4.3. Coleta e armazenamento do solo

O solo foi coletado no bairro Arsenal no município de São Gonçalo (-22.860557, 43.006833), que fica localizado na rodovia RJ-106 no estado do Rio de Janeiro em abril de 2014. O ambiente apresentava pouca influência antrópica, sendo esperado que o solo apresentasse apenas quantidades de HPA dentro da faixa considerada de origem natural desses compostos. Aproximadamente 40 kg de solo foram coletados a uma profundidade de 30 cm, depois de retirada a camada superficial do solo (contendo folhas, raízes de vegetais e pedras). O solo foi seco ao sol em temperatura ambiente (28-32 °C) durante dois dias e armazenado em galões de 5 L, previamente lavados, mantidos protegidos da luz.

4.4. Preparo dos solos para os ensaios experimentais - Metodologia de contaminação dos solos

Para o preparo do solo para os ensaios experimentais, seguiu-se a metodologia traçada por Brinch *et al.*, (2001) e Alves *et al.*, (2014, 2017 e 2018). Essa metodologia consiste na contaminação de amostras de solo através do carregamento desses contaminantes por um solvente orgânico (acetona). Uma vez solúveis no solvente orgânico, esses contaminantes podem ser misturados de forma homogênea no solo, acompanhado de uma rápida evaporação do solvente usado como carreador.

Apenas 25 % da fração total do solo a ser utilizada no ensaio experimental (para cada uma das concentrações de HPA) entram em contato com o solvente orgânico, preservando os outros 75 % do solo do ataque do solvente, já que cerca de 2,5 % de solvente (peso / volume) permanece na fração final. Após a evaporação do solvente orgânico, a fração de 25 % contendo os HPA é acrescida a fração de 75 % onde é vigorosamente homogeneizada a fim de obter a concentração final desejada (Fig. 20).

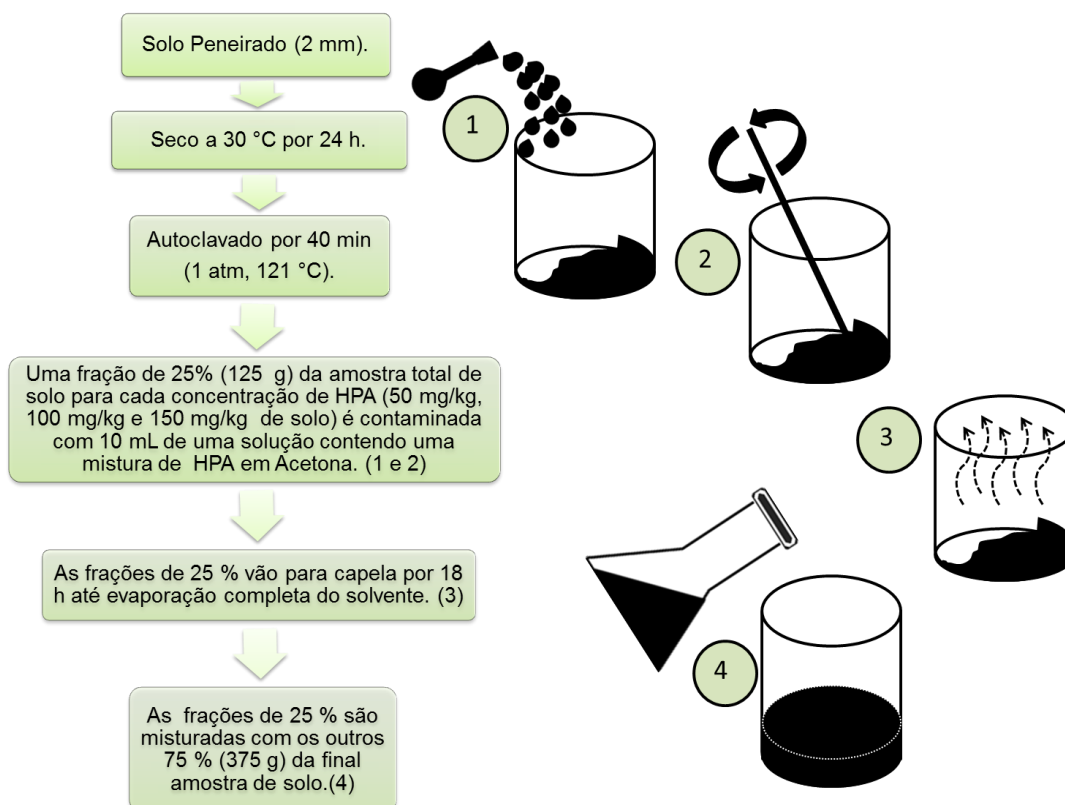


Figura 20. Ensaio de contaminação de solos com Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Adaptado de Brinch *et al.*, (2001) e Alves *et al.*, (2017, 2018), os valores em gramas de solo correspondem a um ensaio hipotético utilizando um total de 500 g de solo contaminado.

Para o preparo do solo para esse estudo, foi utilizado 6,52 Kg de substrato para cultivo, formado por solo e vermiculita, previamente tamisados em peneira de 2 mm de abertura de malha, nas proporções de 1:2 (v / v) respectivamente. Terminada essa etapa, o substrato foi levado para a estufa a 30 °C por 24 horas e após a secagem, dividido em 4 porções de 1630 g em Erlenmeyer de 2 L sendo esterilizadas em autoclave por 40 min (1 atm; 121 °C).

Após a esterilização do substrato, uma fração equivalente a 25 % de cada uma das 4 porções (407,5 g) foi passada para 4 bécher estéreis de 1000 mL, onde cada fração foi contaminada com uma solução de 50 mL de acetona contendo os HPA fenantreno, antraceno e pireno. As três soluções foram preparadas nas concentrações de 50 ppm de cada HPA (HPA total = 150 ppm), 100 ppm de cada HPA (HPA total = 300 ppm) e 150 ppm de cada HPA (HPA total = 450 ppm) respectivamente. Para a confecção do controle (0 ppm), somente acetona foi acrescida a uma das frações de 25 %. As frações contendo o solvente foram vigorosamente homogeneizadas de 2 em 2 horas com o auxílio de bastões de vidro estéreis por 8 horas, sendo posteriormente deixadas sob fluxo laminar por mais 8 horas até a total evaporação do solvente orgânico. Em seguida, cada uma das frações de 25 % contendo os contaminantes foi adicionada nas respectivas frações de 75 % (1222,5 g restantes, livres do ataque do solvente), sendo homogeneizados por agitação dentro dos Erlenmeyer totalizando 4 porções de 1630 g de substrato contendo as concentrações de HPA a serem estudadas (controle, 150, 300 e 450 ppm). Estes substratos foram reservados para a semeadura das plântulas de alfafa.

4.5. Cultivo de *Medicago sativa* L. na presença de BR 7411 para os estudos de fitorremediação

Aproximadamente 600 sementes alfafa (Cultivar Crioula, obtidas pela EMBRAPA) tiveram sua superfície desinfetada e germinação induzida seguindo a metodologia de Silo-Suh *et al.*, (2002) e Alves *et al.*, (2017 e 2018). Após a etapa de desinfecção e eclosão das sementes, as plântulas foram separadas e cultivadas em placas de Petri contendo meio sólido composto de água destilada e ágar 0,6 %. Os cultivos se deram em sistema de Demanda Biológica de Oxigênio (B.O.D.) com fotoperíodo de 14/10 horas (claro/escuro) a 28 °C.

Após 3 dias de cultivo, as plântulas de alfafa foram divididas em 2 grupos: um grupo para cultivos na presença de fonte de nitrogênio (controle – ausência da cepa BR 7411) e outro grupo para cultivos na ausência de fonte de nitrogênio (tratamento – presença da cepa BR 7411). Cada grupo foi formado transferindo as plântulas, oriundas do cultivo em placa, contendo meio ágar 0,6 % sólido, para 250 tubos de ensaio (13 x 100 mm) estéreis com rolhas de algodão, de forma asséptica, sendo cultivado 1 plântula por tubo, totalizando 500 tubos de cultivo. Para o grupo controle, os tubos continham 2 mL de meio $\frac{1}{4}$ de Hoagland sólido (contendo ágar 0,6 %) contendo fonte de nitrogênio para o cultivo das plântulas, e para o grupo tratamento (que recebera o inóculo da cepa BR 7411), os tubos continham 2 mL de meio $\frac{1}{4}$ de Hoagland sólido (contendo ágar 0,6 %) modificado, sem fonte de nitrogênio. A ausência de fontes de nitrogênio no meio de cultura se faz necessária no ensaio com a cepa BR 7411, pois a presença de fontes de nitrogênio assimiláveis para a planta inibe a formação de nódulos e a interação simbiótica entre a cepa e a planta (SOMASEGARAN P. & HOBEN H. J. 1985) (Fig. 21).

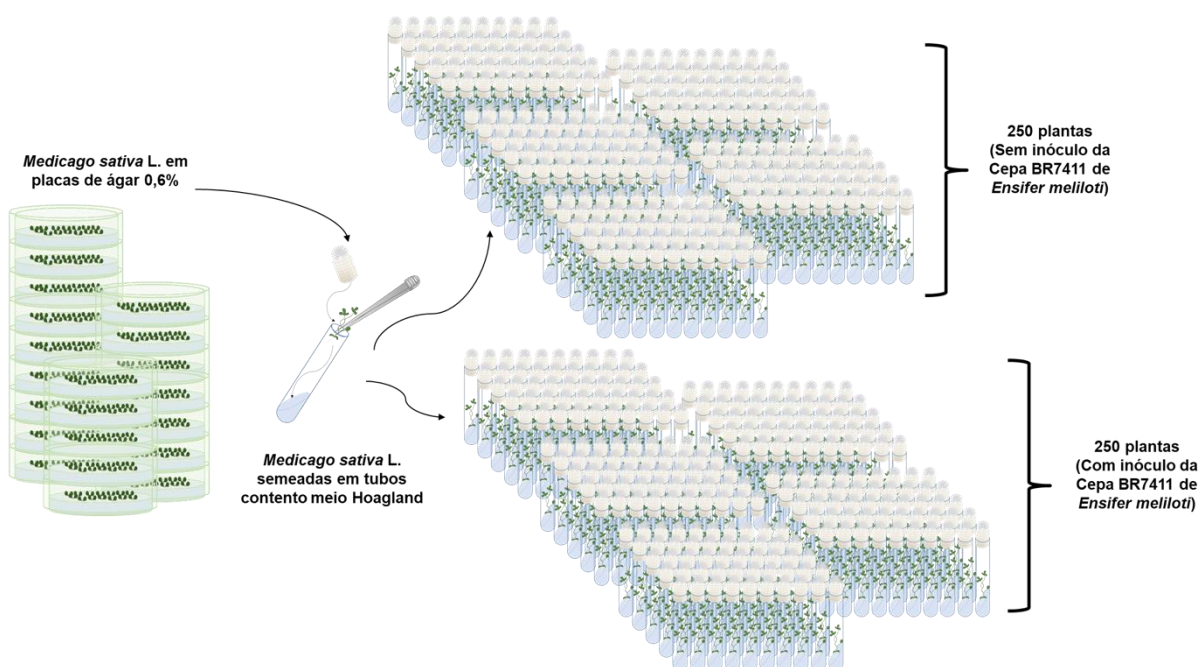


Figura 21. Etapas de cultivo de *Medicago sativa* L. e geração dos grupos experimentais contendo plantas inoculadas com BR 7411 (250 plantas) e plantas controle, sem o inóculo de BR 7411. Placas de Petri contendo ágar são utilizadas como meio de germinação das alfafas e após o término do cultivo em placa, as plântulas são transferidas para tubos de ensaio contendo meio hoagland sólido (com ou sem fonte de nitrogênio) e submetidos a inóculos de BR 7411 ou Hoagland (C/N) líquido.

Concomitantemente ao cultivo das plantas em placas de Petri e transferência das mesmas para os tubos de ensaio, foi feito um pré-inóculo da cepa BR 7411 em 10 mL de meio 79, e posto para crescer por 16 horas a 30 °C sob agitação de 200 rpm. Uma vez crescido o pré-inóculo, este foi passado para um frasco Erlenmeyer estéril contendo 90 mL de meio 79, e posto para crescer por 12 horas a 30 °C sob agitação de 200 rpm, acompanhando o crescimento da cepa até alcançar a D.O. de 1,04 (equivalente a 1×10^9 células.mL⁻¹). Após alcançada a D.O. de 1,04, a biomassa de células foi lavada (4x) com 30 mL solução NaCl (0,85 %), através de centrifugação de 10 min cada, sob as condições de 5000 rpm a 4 °C.

Após lavada a biomassa celular, foi preparado o inóculo acrescentando meio Hoagland (sem fonte de nitrogênio) a biomassa lavada, até a D.O. de aproximadamente 1 e posteriormente transferido 300 µL do inóculo para as raízes das plântulas presentes nos tubos contendo Hoagland sem fonte de nitrogênio. Para as plantas controles, fora transferido apenas 300 µL de Hoagland.

Após cerca de 20 dias, com a visualização da formação de nódulos ativos, as plantas foram utilizadas para os cultivos na presença dos HPA para os ensaios experimentais de biometria, biomassa seca, fitorremediação, microscopia de fluorescência e análise proteômica (Fig. 22). Durante o cultivo em solo, cada planta foi regada com 1,5 mL de solução de Hoagland com fonte de nitrogênio (para os ensaios sem a cepa BR 7411) e sem fonte de nitrogênio (para ensaio com a cepa BR 7411) a cada 3 dias até o término do experimento em 40 dias.

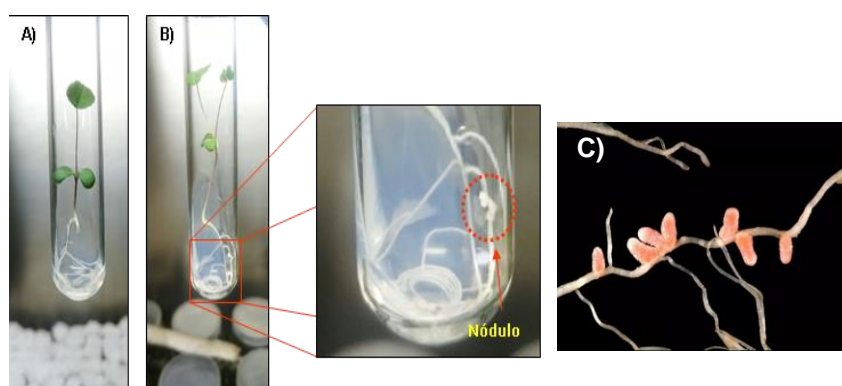


Figura 22. Plantas cultivadas em tubos de ensaio após 20 dias. A) planta cultivada em meio Hoagland com nitrogênio B) planta cultivada em meio Hoagland modificado, sem nitrogênio, detalhe para a presença de nódulos nas raízes, após infecção com a cepa BR 7411. C) Nódulos de *Medicago sativa* L. apresentando coloração vermelha típica de nódulos ativos (Fonte: <https://mindyourdirt.com/legume-root-nodules/>)

4.6. Desenho experimental

Uma vez preparado as plântulas de *Medicago sativa L.* e os solos com suas respectivas concentrações de HPA, os mesmos foram distribuídos para cada experimento como descrito no esquema do desenho experimental, para a geração das amostras a serem analisadas nos ensaios apresentados a seguir (Fig. 23).

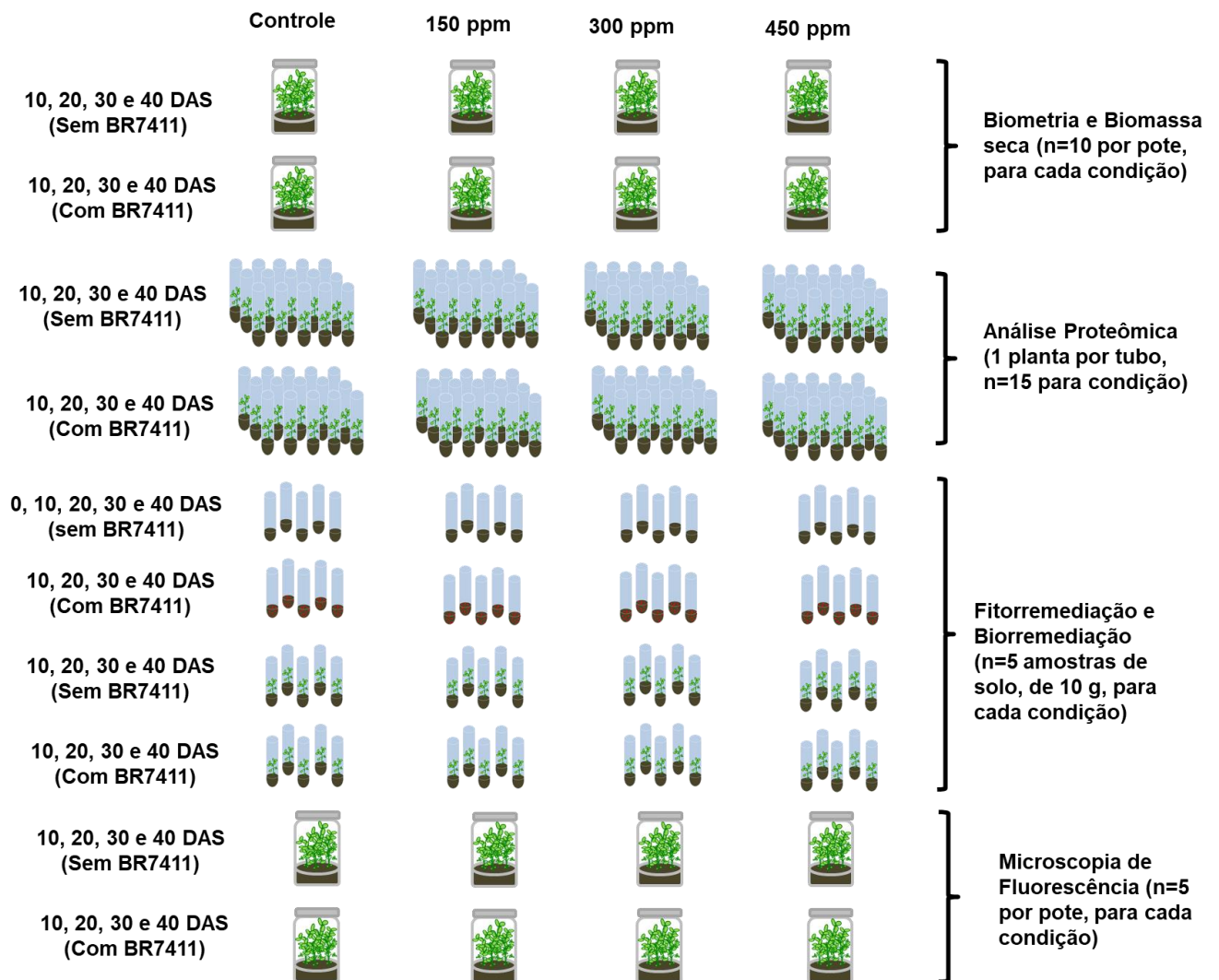


Figura 23. Desenho experimental. O esquema apresenta as amostras de solo e tecidos vegetais gerados pelos respectivos ensaios experimentais para os intervalos de tempo de 0, 10, 20, 30 e 40 Dias Após Semeadura (DAS) nos diferentes tratamentos com HPA e com a cepa BR 7411.

4.6.1. Preparo das plantas para ensaios de biometria e biomassa seca

100 g de solo foram pesados em balança analítica de 3 casas decimais e passados para 32 potes de vidro (500 mL) com tampa rosqueada estéreis, sendo 8 potes utilizados para cada condição (controle, 150, 300 e 450 ppm de HPA total). Para os ensaios biométricos, 10 plântulas de *Medicago sativa L.* foram semeadas em cada pote (n=32), sendo a metade dos potes (n=16) inoculados com 10 mL de uma cultura contendo 1×10^9 células.mL⁻¹ de *Ensifer meliloti* (biomassa celular previamente lavada 2 vezes com solução de Hoagland sem nitrogênio). Após transferência das plantas para o solo, as mesmas foram cultivadas em casa de vegetação com fotoperíodo de 14/10 horas (dia/noite) a 28 °C utilizando iluminação para cultivo “Indoor” com LED Azul e Vermelho e iluminação com lâmpadas frias fluorescentes (Fig 24. A-C).

Cada planta foi regada com 1 mL de solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) a cada 2 dias até o final do ensaio experimental (respeitando as condições iniciais, quanto a fonte de nitrogênio). Após 10, 20, 30 e 40 Dias Após Semeadura (DAS), 10 plantas de cada condição foram coletadas e tiveram suas partes aéreas e radiculares separadas para os ensaios de biometria e biomassa seca (Fig 24. D)

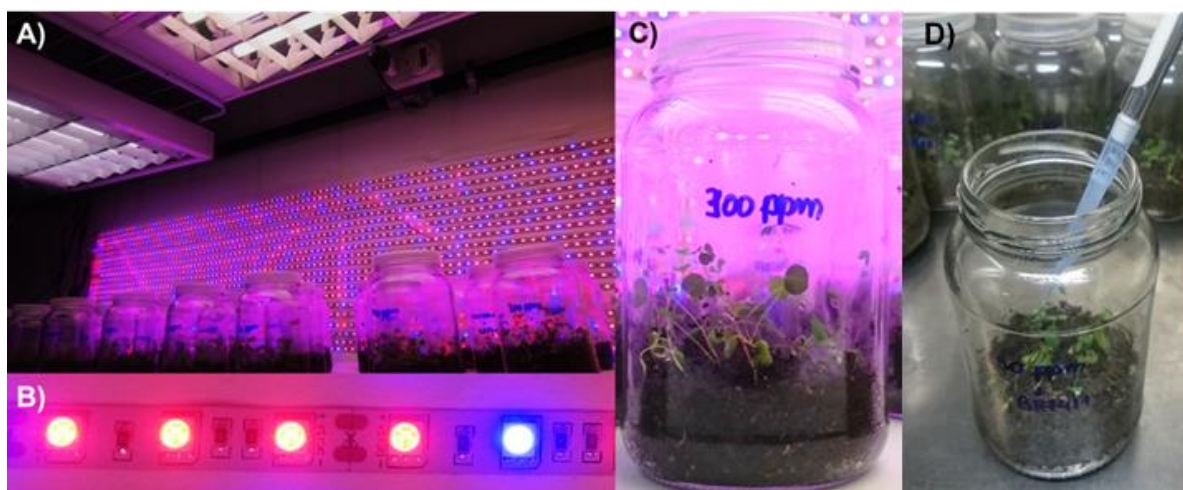


Figura 24. Estrutura da casa de vegetação. A) iluminação da casa de vegetação utilizando LEDs de cultivo *indoor* nas cores vermelha e azul (espectros de luz utilizados na fotossíntese) e lâmpadas de luz fria fluorescentes. **B)** detalhe dos LEDs, as fitas são formadas numa sequência de 4 LEDs vermelhos intercalados por um LEDs azul. **C)** exemplo de pote de cultivo contendo plantas cultivadas em solo contaminado. **D)** Rega periódica das plantas com solução de Hoagland.

4.6.2. Biometria e biomassa seca

Os dados biométricos e de biomassa seca de *Medicago sativa* L. foram obtidos de acordo com Wang *et al.*, (2012) e Alves *et al.*, (2017 e 2018). Nessa etapa, para acompanhar o desenvolvimento dos vegetais ao longo do ensaio experimental, plantas (n=10) foram coletadas de cada condição nos tempos 10, 20 30 e 40 DAS. As plantas foram cuidadosamente retiradas do solo e suas raízes foram lavadas com água destilada para retirar o solo aderido. A água excedente foi drenada com o auxílio de papel filtro limpo. Em seguida, foi medida a altura das partes aéreas e o comprimento das raízes de cada indivíduo com o auxílio de uma régua. Após a medição, os indivíduos foram divididos em partes aéreas e radiculares, sendo colocados em tubos de ensaio previamente pesados e seguiram para estufa a 50 °C para obtenção da biomassa seca. Após 24 horas, os tubos contendo os tecidos secos foram pesados em balança analítica de 4 casas decimais, até que seus pesos atingissem um valor constante, e os valores obtidos foram descontados do peso dos respectivos tubos sem o tecido, obtendo do valor da biomassa seca.

4.6.3. Monitoramento do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g⁻¹) de Solo durante 40 DAS em resposta a presença de HPA

Para monitorar a densidade populacional de bactérias presentes nos solos utilizados para os ensaios experimentais, foi feita observação da variação das UFC.g⁻¹ de solo, para a cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, como também das bactérias autóctones de *Medicago sativa* L (provenientes da flora bacteriana natural de simbiontes das alfafas), presentes em amostras de solo cultivados com alfafas, previamente inoculadas ou não com a cepa de BR 7411 durante 40 DAS, em resposta as diferentes concentrações de HPA utilizadas nesse estudo (150, 300 e 450 ppm de HPA total). Para isso, foram seguidas as metodologias de Somasegaran P. & Hoben H. J. (1985) e Pimentel *et al.*, (2016) para contagem de bactérias em amostras de solo, pelo método de semeadura em superfícies para a determinação das UFC.g⁻¹ de solo, com algumas adaptações, para que fosse possível trabalhar com quantidades menores de solo (100 mg).

Sendo assim, 100 mg de solo foram coletados nos pontos de 10, 20, 30 e 40 DAS em fluxo laminar, com auxílio de uma espátula de metal estéril, proveniente de cada pote de cultivo contendo plantas de *Medicago sativa L.* (material oriundo do ensaio de biometria e biomassa seca) de acordo com suas respectivas concentrações de HPA (0, 150, 300 e 450 ppm de HPA total) e tratamentos com e sem inóculos da cepa de BR 7411, totalizando 8 amostras. As amostras de solo foram transferidas para tubos novos de 1,5 mL estéreis, contendo 900 µL de solução de NaCl 0,85 % estéril, e promovida a extração das bactérias do solo com o auxílio de pulsos de vórtice. Após etapa de homogeneização por vórtice, as amostras de solo contendo solução de NaCl 0,85 % foram deixadas no fluxo laminar por 30 minutos, até a decantação completa das partículas de solo e em seguida, 100 µL de cada um dos 8 sobrenadantes foi transferido para tubos novos de 1,5 mL estéreis, contendo 900 µL de solução de NaCl 0,85 % para realização de uma diluição seriada (10^{-1} até 10^{-8}).

Após completada a etapa de diluição seriada das amostras, 10 µL de cada diluição (triplicada) foi transferido para placas de Petri, contendo meio 79 sólido (ágar 1,2 %) com indicador de vermelho congo, previamente seccionadas em 8 secções, sendo cada secção correspondente a uma diluição e preenchida com triplicatas. Após secagem das gotas, as placas embaladas com papel alumínio foram levadas para estufa bacteriológica termoestabilizada a 30 °C, por 24 à 48 horas. Após esse intervalo, as placas tiveram suas colônias contadas e procedeu-se com o cálculo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g⁻¹ de solo), segundo Somasegaran P. & Hoben H. J. (1985) e Pimentel *et al.*, (2016).

4.6.4. Preparo das plantas para avaliação do potencial de fitorremediação de *Medicago sativa L.*

Para essa etapa, 10 g de solo foram pesados em balança analítica de 3 casa decimais e passados para 480 tubos de ensaio de 125 mL estéreis com rolhas de algodão, sendo 15 tubos utilizados para cada concentração testada (controle, 150, 300 e 450 ppm de HPA total) na presença e ausência da cepa BR 7411. Cada tubo foi semeado com uma plântula de *Medicago sativa L.* sendo a metade dos tubos (n=240) inoculados com 1 mL de uma cultura contendo 1×10^9 células.mL⁻¹ de *Ensifer*

meliloti (biomassa celular previamente lavada 2 vezes com solução de Hoagland sem nitrogênio) e cultivadas em sistemas B.O.D. com fotoperíodo de 14/10 horas (claro/escuro) a 28 °C. Cada planta foi regada com 0,5 mL de solução de Hoagland a cada 3 dias até o final do ensaio experimental.

Para os ensaios de avaliação do potencial de fitorremediação de *Medicago sativa L.*, foram coletados 10 g de solo cultivado e não cultivado na presença e ausência de BR 7411, para cada concentração estudada (controle, 150, 300 e 450 ppm de HPA total), nos tempos 10, 20, 30 e 40 DAS em quintuplicatas. Amostras de solo não cultivado também foram colhidas no tempo zero para determinar as concentrações de HPA iniciais, imediatamente após ser efetuado o protocolo de contaminação, amostras estas, chamadas de tempo 0 DAS (sem adição da cepa BR 7411 e/ou *Medicago sativa L.*).

Essas amostras foram guardadas no freezer -20 °C para as etapas posteriores de extração e purificação de HPA e análise quantitativa em CLAE-FR.

4.7. Análise do potencial de fitorremediação de plantas de *Medicago sativa L.* na presença e ausência de BR 7411 e potencial de biorremediação de *Ensifer meliloti* (BR 7411).

Foi acompanhada pelo monitoramento das concentrações de HPA em solos contaminados cultivados e não cultivados (na presença e ausência da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*) nos intervalos de tempo de 0, 10, 20, 30 e 40 DAS. Para isso, técnicas de extração, purificação e quantificação desses compostos foram efetuadas. O procedimento de extração foi otimizado nos trabalhos de Alves *et al.*, (2014 e 2018), a partir dos estudos de Sun *et al.*, (1998), Berset *et al.*, (1998), Kipopoulou *et al.*, (1999), Pérez *et al.*, (2001) Baran & Oleszczuk, (2002 e 2003), Gao & Zhu, (2005), Banjoo & Nelson, (2005) Helaleh *et al.*, (2005), Souza, (2008) Lau *et al.*, (2010) e Wang *et al.*, (2012).

4.7.1. Extração e purificação dos extratos de HPA por cromatografia de adsorção em sílica (“Clean-Up”)

As amostras de solo (10 g) cultivado e não cultivado com *Medicago sativa L.* na presença e ausência de *Ensifer meliloti* (BR 7411) e coletadas nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 40 DAS, foram secas com o auxílio de sulfato de sódio anidro (10 g) em estufa a 30 °C durante 16 horas. Uma vez secas, as amostras de solo foram transferidas para tubos de ensaio de 25 mL fabricados em vidro neutro e com fechamento hermético (tampa rosqueável) e acrescidos de 10 mL de uma solução (1:1 v/v) de Diclorometano e n-Hexano. Em seguida, as amostras foram submetidas a extração por banho de ultrassom por 30 minutos. Transcorridos o tempo da primeira extração, os extratos foram coletados em tubos de ensaios de 15 mL, limpos e o processo de extração e coleta foi repetido mais duas vezes.

Após a etapa de coleta dos extratos, os mesmos foram centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm para retirar impurezas e material particulado de solução, e o sobrenadante foi recuperado em frascos de penicilina (15 mL) e levados a capela para evaporação do solvente. Feito isso, as amostras foram armazenadas no freezer -20° C para posterior etapa de cromatografia de adsorção em sílica para purificação dos extratos ou “*Clean-up*”.

Para etapa de “*Clean-up*” foi adotada a técnica de cromatografia em coluna de adsorção em sílica (70-230 *mesh*) com modificações (BANJOO & NELSON, 2005, SOUZA, 2008) e otimizado nos trabalhos de Alves *et al.*, (2014 e 2018). Extratos contendo HPA, previamente secos, foram solubilizados em 1 mL de n-hexano e aplicados no topo da coluna com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Os analitos concentrados foram eluídos com 14 mL da fase móvel n-hexano-diclorometano (8:2 v / v). Os eluatos foram recolhidos diretamente em frascos previamente pesados que, foram levados a capela para evaporação do solvente (Fig. 25).

Em seguida, as amostras foram armazenadas no freezer -20 °C para análise e quantificação dos HPA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR). A validação da eficiência do método de contaminação, extração e “*clean-up*” das amostras de solo, como também a análise qualitativa do potencial de fitorremediação, pode ser avaliada e os dados confirmados por métodos analíticos e quantitativos (CLAE-FR) por Alves *et al.*, (2018) (Anexo B e *Supplemental data A*)

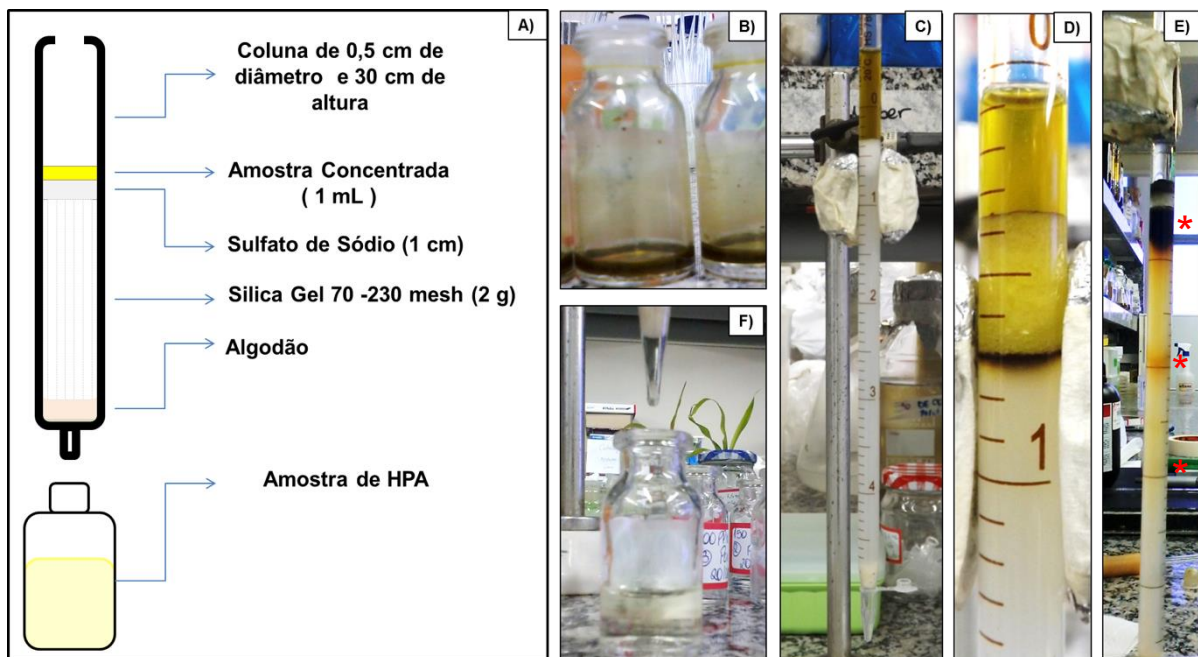


Figura 25. Cromatografia de adsorção em sílica. Ilustração mostrando a montagem da coluna de *clean-up* (A). Para a cromatografia de adsorção em sílica, os 30 mL de extrato secos foram solubilizados em 1 mL de n-hexano (B), aplicados ao topo da coluna (C) e eluídos com fase móvel de n-hexano-diclorometano (8:2) (D). Destaque (estrelas vermelhas) para as impurezas retidas na sílica (E) e o aspecto do eluato coletado, contendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos purificados (F).

4.7.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

A análise da concentração de HPA em solos cultivados e não cultivados foi otimizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu com programa específico para a aquisição de dados e integração dos picos obtidos (Shimadzu LCsolution). A metodologia se baseou nos estudos de Souza, (2008) e otimizada nos trabalhos de Alves *et al.*, (2014 e 2018).

Para a separação dos HPA foi empregada uma coluna de fase reversa empacotada com octadecilsilano, C-18 (Kromasil-C18), bomba Shimadzu LC-20AT, fase móvel acetonitrila:água (60:40) com velocidade de fluxo de $1,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e coluna termostaticada a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ com forno CTO-20A. Foi utilizado o detector UV/Visível de comprimento de onda variável Shimadzu SPD-M20A. O comprimento de 254 nm foi utilizado para a detecção de fenantreno e antraceno e o comprimento de 235 nm foi utilizado para a detecção de pireno.

O t_r (tempo de retenção) de cada HPA foi determinado por uma corrida cromatográfica de uma mistura padrão contendo $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada HPA com tempo

de duração de 20 min, sendo os t_r obtidos para o fenantreno, antraceno e pireno respectivamente, 10,331 min, 11,299 min e 15,248 min (Anexo B *figure 4*).

4.7.3. Confeção das curvas analíticas de fenantreno, antraceno e pireno

Para a quantificação dos HPA, curvas analíticas foram feitas para os três contaminantes estudados. Para a confeção das curvas analíticas foram injetados 20 μL de cada diluição dos HPA estudados, solubilizados em fase móvel de acetonitrila:água 60 % com uma faixa de concentração de 30 à 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ partindo de uma solução mãe de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Após o término das corridas, foi feito a integração das áreas dos picos correspondentes as diluições empregadas, para a confeção das curvas apresentadas, as curvas podem ser observadas no Anexo B (*Supplemental data B*).

4.7.4. Preparo das amostras de HPA purificadas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

Quintuplicatas biológicas das amostras de HPA purificadas na etapa de *Clean-up* foram solubilizadas com 1 mL de fase móvel de acetonitrila:água 60 % e imediatamente filtradas em membrana de 0,22 μm . Após isso, as amostras concentradas foram diluídas, dentro do limite de detecção das curvas padrão, e foram feitas triplicatas analíticas (com volume de injeção de 20 μL) para a obtenção dos perfis cromatográficos. Após as corridas, foi feita a integração dos picos para obtenção das suas áreas, e com o auxílio das curvas analíticas, foi determinado a concentração de HPA em cada amostra de solo cultivado e não cultivado, na presença e ausência de inóculo bacteriano, durante 0, 10, 20, 30 e 40 DAS. Um resumo das etapas para a análise do potencial de fitorremediação de plantas de *Medicago sativa L.* na presença e ausência de BR 7411, e potencial de biorremediação de *Ensifer meliloti* (BR 7411) pode ser observado do esquema gráfico a seguir (Fig. 26).

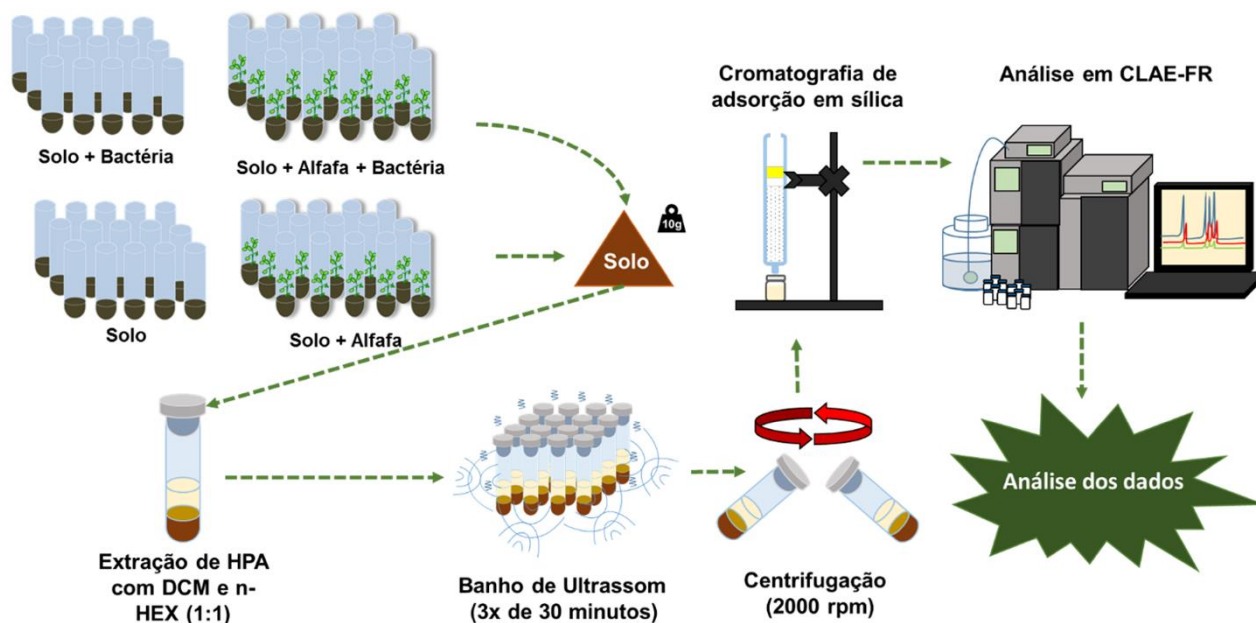


Figura 26. Resumo das etapas de extração e análise quantitativa dos HPA em amostras de solo. Esquema gráfico das etapas de coleta dos extratos de HPA do solo seguidos das etapas de cromatografia de adsorção em sílica e análise quantitativa dos HPA por CLAE-FR. Adaptado de Alves *et al.*, (2018).

4.8. Preparo das plantas para ensaio proteômico

Para essa etapa, 10 g de solo foram pesados em balança analítica de 3 casa decimais e passados para 480 tubos de ensaio de 125 mL estéreis com rolhas de algodão, sendo 15 tubos utilizados para cada concentração testada (controle, 150, 300 e 450 ppm de HPA total) na presença e ausência da cepa BR 7411. Cada tubo foi semeado com uma plântula de *Medicago sativa L.* sendo a metade dos tubos ($n = 240$) inoculados com 1 mL de uma cultura contendo 1×10^9 células.mL⁻¹ de *Ensifer meliloti* (biomassa celular previamente lavada 2 vezes com solução de Hoagland sem nitrogênio) e cultivadas em sistemas B.O.D. com fotoperíodo de 14/10 horas (claro/escuro) a 28 °C . Cada planta foi regada com 0,5 mL de solução de Hoagland a cada 3 dias até o final do ensaio experimental. Durante 40 dias de ensaio, 15 plantas de cada condição foram coletadas nos tempos de 10, 20, 30 e 40 DAS, tendo suas partes aéreas e radiculares separadas em tubos contendo até 5 indivíduos

(totalizando 3 “pools” de replicas biológicas) e armazenadas em freezer - 80 °C para extração de proteínas seguida de análise proteômica.

4.8.1. Ensaio proteômico

Para a análise proteômica, foram processados apenas as amostras da parte aérea de *Medicago sativa L.* coletadas no tempo de 20 DAS para a concentração de 300 ppm de HPA total, na presença e ausência da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*. Os demais tecidos vegetais seguiram guardados em freezer - 80 °C para futuros estudos.

4.8.2. Extração de proteínas com Tris-Mg/NP-40 e depleção de RuBisCO com sulfato de protamina - Identificação de proteínas pouco abundantes (Low Abundant Proteins – LAPs)

Para extração das proteínas pouco abundantes (LAPs) e depleção de RuBisCO foram utilizadas as metodologias de Kim *et al.*, (2013) e Gupta *et al.*, (2015). Para cada condição, foram pesados 200 mg de tecido vegetal e transferidos para um almofariz, previamente gelado a - 20 °C. Após a transferência dos tecidos vegetais, os mesmos foram macerados com 1,5 ~ 2 ml de tampão de extração Tris-Mg/NP-40 e os extratos coletados para um tubo de microcentrifuga de 2 mL e imediatamente acondicionado em gelo picado. Após coleta dos extratos, as amostras foram submetidas a centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, em centrífuga previamente refrigerada a 4 °C. Após centrifugação, foi coletado 1,8 mL do sobrenadante para um novo tubo de 2 mL e acrescentado 200 µL de solução estoque de sulfato de protamina 1 % (para uma concentração final de sulfato de protamina na solução equivalente a 0,1 %). As amostras foram agitadas em vórtice e deixadas precipitando no gelo por 30 minutos. Após a precipitação de proteínas, as amostras foram novamente submetidas a centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C. Após essa etapa, foi efetuada uma separação das amostras em duas frações: 1ª) o sobrenadante (rico em LAPs) para um tubo de 5 ml e 2ª) o precipitado (rico em

RuBisCo) presente no próprio tubo e deixado no gelo picado até o final da coleta das réplicas.

Para precipitação das proteínas pouco abundantes (LAPs), foi feita uma precipitação acrescentando aos tubos contendo o sobrenadante rico em LAPs, aproximadamente, quatro volumes de TCA/Acetona 10 % em β -mercaptoetanol 0,07 % e acondicionadas a - 20 °C por 60 minutos. Após a precipitação de proteínas, as amostras foram submetidas a etapa de centrifugação a 12.000 x g por 5 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C. Em seguida, fora descartado o sobrenadante e as proteínas precipitadas foram lavadas com solução de acetona 80 %, gelada sendo esta etapa repetida por 3 vezes, submetendo as amostras a agitação por vórtice seguida de centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Após efetuada a lavagem das proteínas LAPs, os precipitados foram secos (em capela de exaustão) e solubilizados com 200 μ L de tampão ureia 7M, tiourea 2M, em 50 mM de bicarbonato de amônio pH 8, com o auxílio de ultrassom em banho de gelo. Estas amostras foram quantificadas através do método de Bradford (1976) e aliqüotadas (50 μ L) em tubos de 500 μ L e armazenadas em freezer - 80 °C.

Para o preparo das amostras ricas em RuBisCO depletada, os produtos da precipitação com sulfato de protamina foram solubilizados novamente com 2 mL de tampão Tris-Mg/NP-40, por ultrassom em banho de gelo, e transfira o extrato para um tubo de 5 mL. Em seguida, as amostras foram precipitadas com aproximadamente, quatro volumes de de TCA/Acetona 10 % em β -mercaptoetanol 0,07 % a - 20 °C por 60 minutos. Após a precipitação de proteínas, as amostras foram submetidas a etapa de centrifugação à 12.000 x g por 5 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C. Em seguida, fora descartado o sobrenadante e as proteínas precipitadas foram lavadas com solução de acetona 80 % gelada sendo esta etapa repetida por 3 vezes, submetendo as amostras a agitação por vórtice seguida de centrifugação nas mesmas condições anteriores. Após efetuada a lavagem da RuBisCO depletada, os precipitados foram secos (em capela de exaustão) e solubilizados com 200 μ L de tampão ureia 7M, tiourea 2M, em 50 mM de bicarbonato de amônio pH 8, com o auxílio de ultrassom em banho de gelo. Estas amostras foram quantificadas através do método de Bradford (1976) e aliqüotadas (50 μ L) em tubos de 500 μ L e armazenadas em freezer - 80 °C.

4.8.3. Análise do perfil protéico por eletroforese unidimensional (1-DE)

Foram aplicados 30 µg de proteínas por poço no gel SDS-PAGE 15 % de acrilamida / N,N' – metil – bisacrilamida em Tris base 1,5 M pH 8,8 SDS 10 % (LAEMMLI, 1970). As amostras resuspensas em tampão de ressolubilização foram aplicadas no gel adicionando-se tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 100 mM, glicerol 20 %, SDS 4 % e azul de bromofenol 0,2 %) na proporção de 1:1 v/v. A separação de proteínas no gel ocorreu seguindo os parâmetros: 40 mA, 1 hora e 200 V em tampão Tris-Glicina. Os padrões de peso molecular utilizados foram o *BenchMark™ Ladder* (Invitrogen) e *Prestained SDS-PAGE Standards #161-0305* (BIO-RAD). A visualização das proteínas, após a separação em gel, foi realizada através da coloração por *comassie blue silver G-250* (CBB-G250) (CANDIANO *et al.*, 2004). O gel foi imerso em uma solução corante (CBB-G250 0,12 %, sulfato de amônio 10 %, H₃PO₄ 10 % metanol 20 %) permanecendo sob agitação branda por 24 h. No dia seguinte, o corante foi retirado e o gel descorado em água destilada até visualização completa das bandas. A aquisição das imagens dos géis foi feita com foto documentador da marca *DNR Bio-imaging Systems* com o programa *GelCapture Acquisition Software*.

7.8.4. Hidrólise tríptica (*in gel*), extração e dessalinização das amostras de peptídeos

Para a etapa de hidrólise (*in gel*) de proteínas foi utilizado a metodologia de Shevchenko *et al.*, (1996 e 2006). As bandas protéicas foram cortadas sob negatoscópio previamente limpo com álcool 70 %, sendo um pedaço de gel sem o corante e uma banda do padrão de peso molecular, coletados para serem utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

Uma vez cortadas, as bandas foram picadas em pequenos pedaços e descoradas em solução de acetonitrila 50 % / bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0. Após descorados os pedaços de gel, a solução foi retirada e os géis foram completamente secos em *speed-vac* por 30 min. Uma vez desidratados, as pontes dissulfeto foram reduzidas adicionando 100 µL de DTT 10 mM em tampão de

bicarbonato de amônio 25 mM pH 8, por 60 min, à 56 °C. Então, a solução de DTT foi descartada e os géis lavados com 300 µL de tampão de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8. Em seguida, os resíduos de cisteína foram alquilados com 100 µL de iodacetamida 50 mM em solução de bicarbonato de amônio 25 mM por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após alquilação, a solução foi descartada e os géis lavados com 200 µL de bicarbonato de amônio 25 mM, homogeneizados em vórtice e a solução de lavagem removida. Os géis foram desidratados em speed-vac por 30 min e adicionado 10 ng/µL de tripsina (Promega) em tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH 8, de forma a cobrir os pedaços de gel mantendo-os no gelo durante 10 min.

Passado o tempo de absorção da solução de tripsina, os géis foram completamente reidratados com 25 µL de tampão de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8, permanecendo a 37 °C por 14 - 24 horas para a digestão das proteínas. No dia seguinte a reação de hidrólise foi interrompida com 5 µL de ácido fórmico 0,1 % e a solução rica em peptídeos recuperada em tubos limpos. Após coleta, os géis foram submetidos a duas extrações de 30 min com 50 µL de solução de acetonitrila 50 % em ácido fórmico 0,1 %, sendo os extratos de peptídeos coletados e somados. Uma vez terminada a etapa de extração dos peptídeos, os extratos foram totalmente secos em *speed-vac* e solubilizados em 20 µL de água para serem passados por microcolunas de C18 (Zip Tip) de acordo com o protocolo de Rappsilber *et al.*, (2007).

7.8.5. Análise dos peptídeos por Nano-LC-ESI-Q/TOF

Os peptídeos provenientes das bandas dos géis unidimensionais foram analisados no espectrômetro de massas do tipo ESI-Q/TOF (WatersCorp.) acoplado a um sistema de cromatografia nanoACQUITYUPLC® (Waters Corp.). Foram injetados 7,5 µL da amostra na coluna 2G trap Symmetry C18 (Waters Corp.). A cromatografia líquida foi feita usando uma coluna BEH C18 100 mm x 100 µm (WatersCorp.) com fluxo constante de 0,5 µL / min sob um gradiente linear (10 a 50 %) de acetonitrila contendo 0,1 % ácido fórmico associado a um espectrômetro de massas do tipo Q/TOF (Quadrupólo por tempo de voo) com fonte de ionização

eletrospray (ESI) (Waters Corp.) da Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, CCS da UFRJ.

As análises feitas no espectrômetro de massas foram realizadas no modo positivo. Os parâmetros de aquisição do espectrômetro de massas foram: voltagem do cone 30 V, voltagem capilar 3500 V, temperatura da fonte 80 °C, varredura (modo MS) 400 – 2000 (m/z) e varredura (modo MS/MS) 50 – 2000 (m/z). O equipamento foi operado no modo DDA (*Data Dependent Analysis or Acquisition*) selecionando automaticamente os peptídeos de acordo com a intensidade (os três íons mais intensos) e as cargas +2, +3 e +4, para a fragmentação do tipo MS/MS. A fragmentação dos íons foi realizada pelo processo de dissociação induzida por colisão (CID) através da utilização do argônio, gás inerte, para colisão. Aquisição dos dados foi realizada utilizando o programa MassLynx 4.0 (Micromass/Waters) e todos os dados foram processados usando o servidor ProteinLynx Global (PLGS - versão 2.5.1, Waters).

Após a etapa de espectrometria de massas, as proteínas foram identificadas a partir dos espectros dos fragmentos (MS/MS) de seus peptídeos utilizando a ferramenta de busca *Mascot Search – MS/MS ion search* ([Website: www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) no banco de dados do NCBI nr (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia não redundante). Os parâmetros de busca utilizados foram: Tipo de pesquisa: *MS/MS Ion Search*; Enzima: tripsina; Taxonomia: Outros vegetais verdes; modificações fixas: carbamidometilação das cisteínas; modificações variáveis: oxidação das metioninas; valores de massa: monoisotópico; Massa de proteína: Irrestrito; Tolerância de massa dos peptídeos: $\pm 0,2$ Da (Daltons); Tolerância de massa do fragmento: $\pm 0,2$ Da (Daltons); máximo de clivagens esquecidas: 1; tipo de Instrumento: ESI-QUAD-TOF.

7.8.6. Análise proteômica quantitativa (*Label-free* 1D NanoUPLC/MS^E)

Amostras de proteínas de baixa abundância (100 µg) provenientes da parte aérea (plantas cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA total) foram solubilizados em bicarbonato de amônio 50 mM para um volume final de 35 µL, em

tubos de microcentrífuga de 500 µL. A seguir, 50 µL de RapiGEST™ (0,2 % v / v) foi adicionado as amostras, sendo homogeneizados em vórtice e incubadas em banho seco termostatizado a 80 °C por 15 min. Passados os 15 minutos, as amostras foram centrifugadas (5.000 rpm – 2 min), e 2,5 mL de DTT 100 mM foram adicionados, homogeneizados em vórtice suavemente e incubado novamente em banho seco termostatizado a 60 °C por 30 min, seguido por centrifugação (5.000 rpm – 2 min). Após etapa de centrifugação, 2,5 µL de uma solução 300 mM de Iodoacetamida (IAA) foi adicionado as amostras, e as mesmas foram levemente homogeneizadas em vórtice e incubados no escuro a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, 10 µL de tripsina (com 400 µL de 50 mM bicarbonato amônia adicionado por frasco de 20 mg de tripsina) foi adicionado, e a amostra foi levemente homogeneizada em vórtice. As amostras foram digeridas a 37 °C em banho seco durante a noite. Para precipitar o RapiGEST™, 10 mL de uma solução de 5 % de TFA foram adicionados e a amostra foi agitada em vórtice, incubada por 90 min a 37 °C em banho seco, e centrifugado a 14.000 rpm a 4 °C durante 30 min. O sobrenadante foi transferido para um Vial de “Recuperação Total” (Waters) para as análises no Synapt.

A análise foi realizada num espectrometro de massa Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) com uma geometria formada por um quadrupolo híbrido / mobilidade iônica / aceleração ortogonal e tempo de voo (ao-TOF), acoplado a um sistema nanoACQUITY™ (Waters) equipado com uma pré-coluna Symmetry C18 5 mm, 5 mm 300 mm e uma coluna de fase reversa analítica (nanoEase BEH 130 Coluna C18 de 1,7 mm, 100 µm e 100 mm - Waters). As amostras foram inicialmente transferidas para a pré-coluna usando uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1 % com um fluxo de 15 µL / min durante 1 min. A fase móvel A foi de 0,1 % ácido fórmico em água, e a fase móvel B foi 0,1 % ácido fórmico em acetonitrila. Os peptídeos foram separados usando um gradiente de 3 a 40 % da fase móvel B por 200 min com um fluxo de de 600 nL / min, seguido por uma rinsagem de 10 min com 90 % de fase móvel B. A coluna foi re-equilibrada para a condições iniciais por 20 min e a temperatura da coluna mantida em 35 °C. No geral, foram realizados 5 ensaios independentes de 1D LC-MSE para cada grupo de amostra. Todas as análises foram solicitadas na aquisição do MS^E em modo iônico positivo (SANDIM *et al.*, 2015).

Para efetuar as medições, o espectrômetro de massas foi operado no " *Vmode* " de análise com um poder de resolução de pelo menos 10.000 " *full-half half-maximum* " (FWHM). O analisador de tempo de voo do espectrômetro de massas foi calibrado externamente com os íons GFP b⁺ e y⁺ de m / z 50 a 1990 com dados corrigidos de bloqueio de massa pós-aquisição, usando o íon precursor de dupla carga GFP [M+2H]²⁺ 5.785,8426. O pulverizador de referência foi amostrado a uma frequência de 30 s. Os dados de nanoLC-MS de tempo de retenção de massa exato (EMRT) foram coletados em modo de aquisição alternada de baixa e alta energia. O tempo de aquisição do espectro contínuo, em cada modo, foi de 1,5 s com um *interscan delay* de 0,1 s. No modo MS de baixa energia, os dados foram coletados em energia de colisão constante de 3 eV. No modo MS de alta energia, a energia de colisão foi aumentada de 12 para 45 eV durante cada espectro de 1,5 s. A radiofrequência que foi aplicada ao analisador de massa do quadrupolo foi ajustada de modo que os íons de m/z 50 a 2000 foram eficientemente transmitidos, o que assegurou que quaisquer íons menores que m/z 50 que foram observados nos dados LC-MS sofressem dissociações na célula de colisão. Os dados MS que foram obtidos da LC-MS^E foram processados e pesquisados usando o *ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.4 (Waters) (SANDIM *et al.*, 2015).

Para a análise dos dados de MSe, feita no Progenesis Q1 for proteomics, e posterior identificação das proteínas, os arquivos brutos (.Raw) foram importados para o software e em seguida, efetuado o processamento automático dos arquivos, gerando os mapas de alta e baixa energia dos peptídeos como uma representação em duas dimensões (2D) dessas corridas. Após essa etapa, foi feita a escolha das corridas de referência de alinhamento, optando pelo método "avaliar todas as corridas no experimento para adequação", onde todas as corridas (n = 5) de cada condição (controle e 300 ppm), são comparadas entre si, de acordo com suas semelhanças e, em seguida, selecionada a corrida com a maior semelhança dentre todas as outras corridas efetuadas, como a referência de alinhamento a ser utilizada. Esse método se torna indicado quando não se tem um conhecimento prévio de quais das corridas seriam uma boa referência, sendo assim, essa escolha normalmente produz uma boa referência de alinhamento, tendo como ponto negativo o longo tempo de análise, vide o número de corridas a serem alinhadas (Waters, 2018).

Após etapa de processamento automático, os cálculos das métricas de controle de qualidade (Métricas QC) são efetuados e o Progenesis Q1 inicia a revisão de alinhamento, exibindo o alinhamento das demais corridas com a corrida de referência. Após o alinhamento automático, o número de vetores e os índices de qualidade foram atualizados no painel de execuções do software, onde os vetores aparecem (em azul) na exibição (Fig. 27).

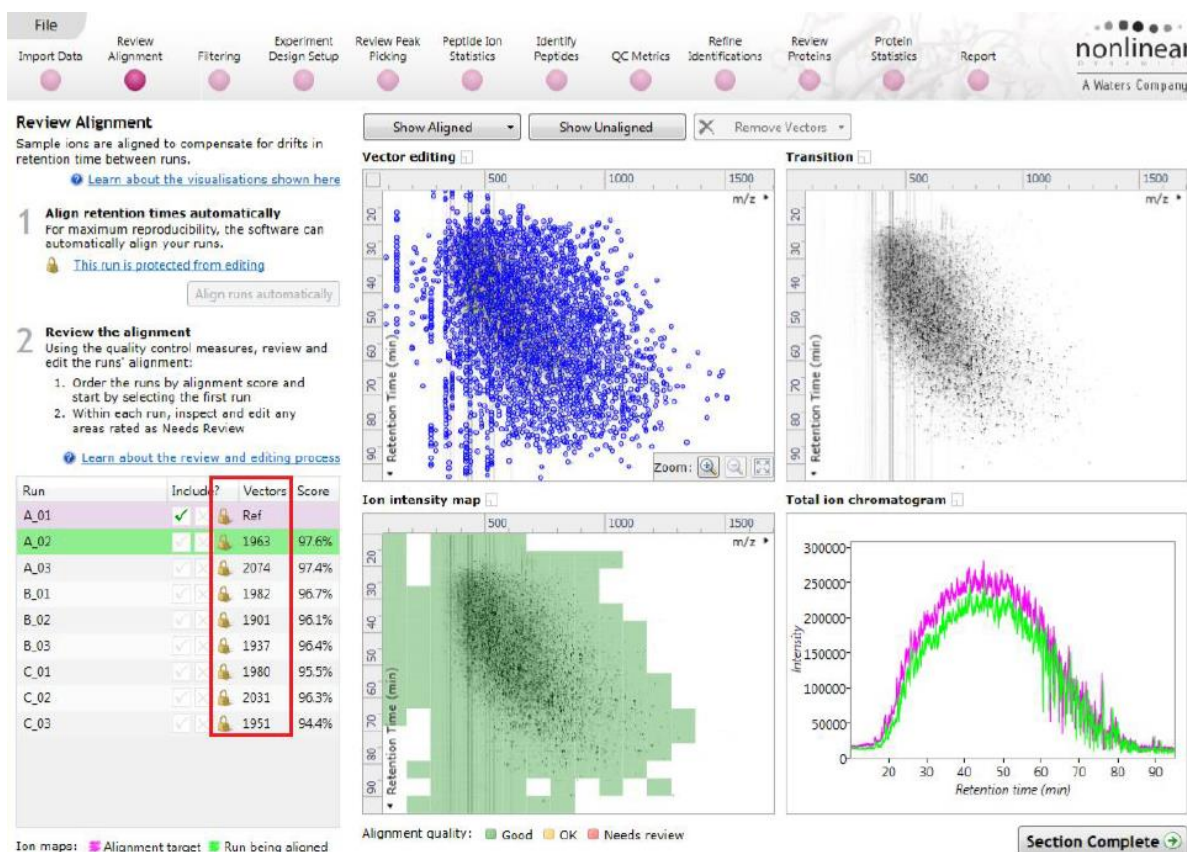


Figura 27. Interface do programa Progenesis Q1 for proteomics, mostrando a aba de revisão dos alinhamentos. Na figura, pode ser observado as janelas de edição dos vetores, o mapa de intensidade dos íons, transição e o cromatograma total dos íons. Na tabela de corrida, os dados marcados em magenta representam a aquisição (corrida) utilizada como referência de alinhamento, enquanto os verdes representam as demais corridas (Waters, 2018).

Quando o alinhamento apresenta um bom funcionamento, os setores de visualização do mapa de peptídeos apresentam-se na cor verde no mapa de intensidade de íons, indicando alinhamento de boa qualidade e a visualização de transição, apresentando os íons dos peptídeos pulsando levemente, como esperado. Neste ponto, a métrica de qualidade, sobreposta no mapa de Intensidade de Íons como quadrados coloridos, atua como um guia chamando a atenção para as áreas do

alinhamento. Estes variam de “bom” (Verde), “OK” (Amarelo) e aqueles com “necessidade de revisão” (vermelho) (Fig. 28). Como os Alinhamentos apresentaram boa qualidade, após a revisão dos alinhamentos, as etapas de aplicação de filtros, utilizando os parâmetros de coleta de picos (*Peak Picking*), revisão de coleta de picos e revisão de normalização dos dados, foram puladas e deixadas para atividades futuras (Waters, 2018).

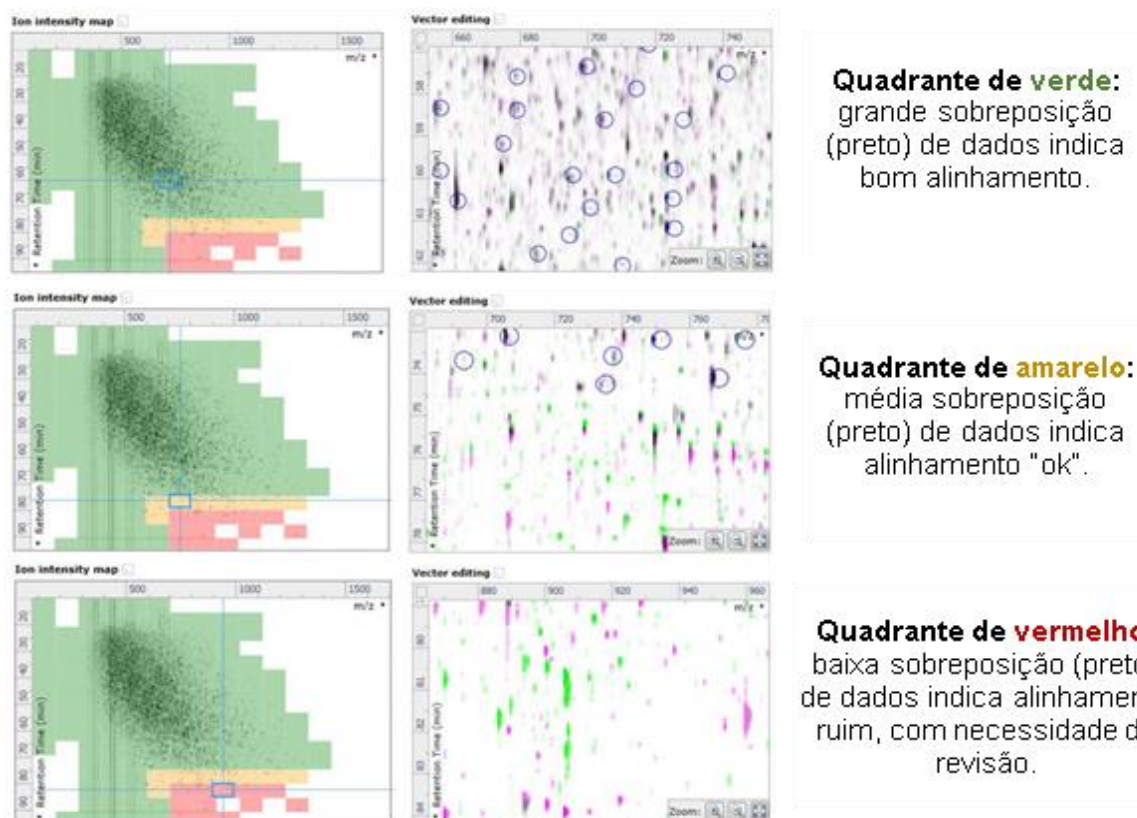


Figura 28. Diferentes tipos de graus de qualidade de alinhamento separados por cores. Nos mapas de intensidade de íons, é possível observar com detalhes as sobreposições dos íons marcados em preto, nas janelas de edição de vetores. Quanto maior for a sobreposição, maior a qualidade dos alinhamentos e quanto menor a sobreposição mais baixa é a qualidade dos alinhamentos, onde é possível ver apenas os íons obtidos nos mapas contendo o alinhamento de referência (em magenta) e os íons dos mapas contendo as demais corridas (em verde), como também a diminuição dos sinais em preto (Waters, 2018).

Em seguida, foi configurado o design experimental para análise dos dados utilizando a modalidade de “*Design* entre indivíduos”, onde as amostras de qualquer indivíduo podem aparecer em apenas uma condição, ou seja, parte aérea controle 20 DAS *versus* parte aérea 300 ppm de HPA 20 DAS, utilizando o cálculo de ANOVA, assumindo que as condições são independentes. Como teste estatístico multivariado aplicado aos íons dos peptídeos, os mesmos foram obtidos com a Análise de Componentes Principais (PCA) (Waters, 2018).

Após essa etapa, foram realizadas as identificações dos peptídeos, a partir do do arquivo brutos (.Raw) das corridas, utilizando o banco de dados *T-R Medicago* obtido pelo Uniprote e contendo 71.000 sequências (R) e 244 sequências (UR). Como reagente de digestão foi definido o padrão como tripsina, já as clivagens perdidas, definido como 1 e massa máxima de proteínas, 250 kDa. Como modificações, foram definidas a carbamidometilação (fixa) e oxidação das metioninas (variável). Após a identificação, foi observada a qualidade geral das análises usando as várias métricas de controle de qualidade (CQ). Essas métricas visam examinar a confiança e identificar problemas presentes no conjunto de dados. Ao configurar agrupamentos experimentais que correspondem aos metadados, pode-se investigar se há algum efeito sistemático associado ao processamento, dando a certeza de que as conclusões obtidas após a identificação não são afetadas por vieses técnicos no decorrer do experimento (Waters, 2018).

Existem dois conjuntos de métricas. Em primeiro lugar, a página de visão geral fornece nove medidas resumidas que cobrem o experimento como um todo. Em seguida, o restante das páginas fornece informações mais detalhadas e traz os detalhes do lote por lote, alguns dos quais se baseiam nos gráficos de visão geral:

Métricas de preparação de amostras - destacando problemas com a preparação de suas amostras: clivagens perdidas, modificações e alcance dinâmico de abundância.

Métrica do instrumento - destacando se a coluna de cromatografia e o espectrômetro de massas estão configurados e funcionando corretamente: precisão em massa, faixa dinâmica de abundância (*again*), cargas precursoras, taxas de varredura MS1.

Métricas de experimentos - referentes às proteínas e peptídeos identificados no experimento, permitindo identificar quaisquer ocorrências ou condições distantes: Proteínas, peptídeos, peptídeos por proteína, percentual de íons peptídicos identificados, proteínas por condição.

Após identificação das proteínas, foi executada a etapa de quantificação utilizando o método de “quantificação relativa usando peptídeos não conflitantes”. As proteínas foram quantificadas usando apenas peptídeos que não fazem parte de outro *hit* de proteína; isto é, a abundância de proteína numa corrida é calculada a partir da

soma de todas as abundâncias únicas de íons peptídicos normalizados correspondentes a essa proteína (Fig. 29).

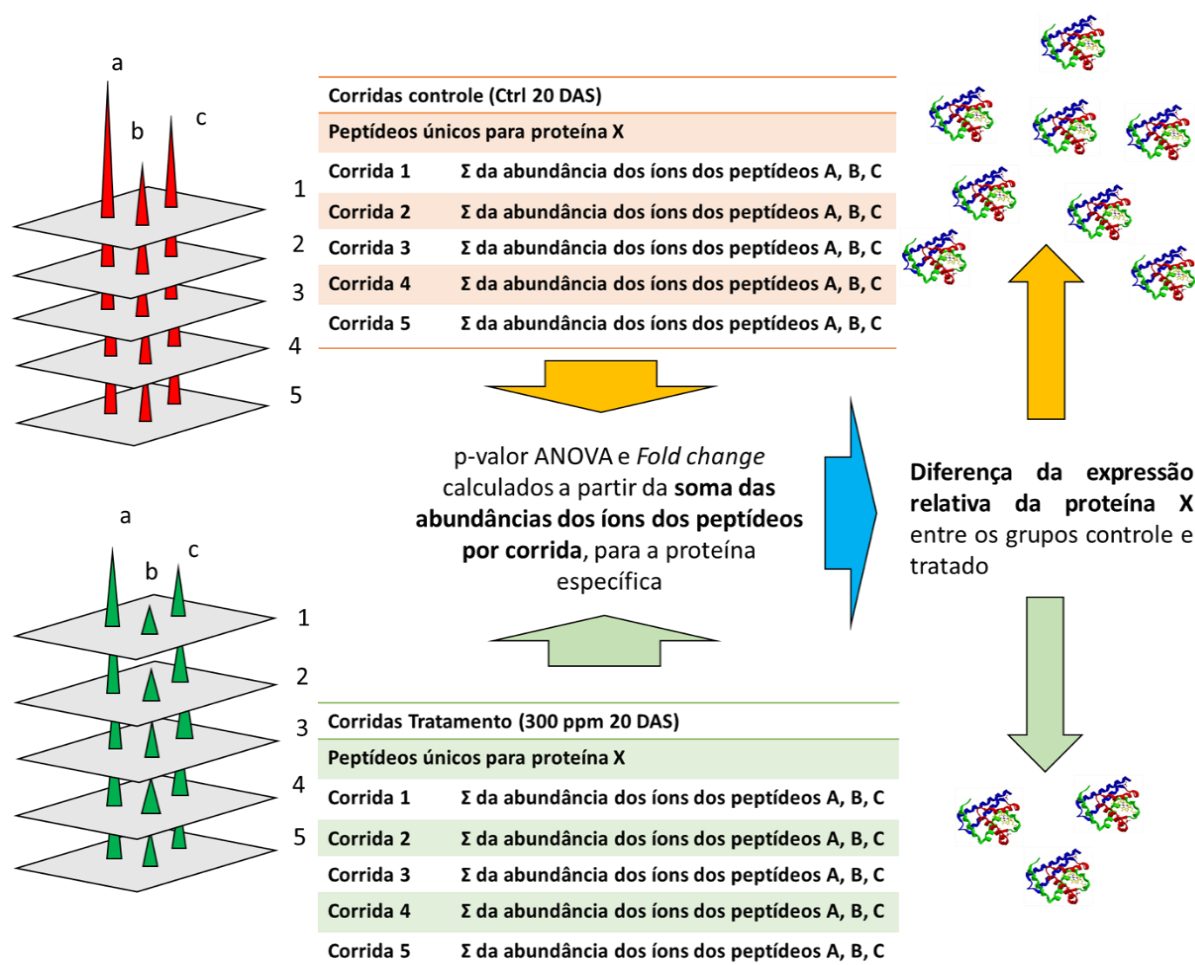


Figura 29. Esquema gráfico ilustrando a técnica de quantificação relativa usando peptídeos não conflitantes para uma proteína hipotética x. Os íons da proteína X em cada condição (controle e tratado) são alinhados e suas abundâncias relativas obtidas. Através desses valores é calculado o *fold change* e p-valor ANOVA dos peptídeos analisados em cada corrida. Uma vez obtido os dados, é avaliada a diferença relativa da expressão de uma proteína hipotética (X) onde no exemplo acima, a proteína controle apresenta uma abundância relativa maior que nas amostras tratadas. (adaptado de: http://www.nonlinear.com/progenesis/qi-for-proteomics/v3.0/faq/images/protein_quantification.png)

A quantificação é relativa e sobre a mesma espécie em todos os casos (auxiliada pelo alinhamento preciso e co-deteção, empregados pelo Progenesis). Com efeito, presume-se que, se a proteína X está na razão A:B entre duas amostras, então qualquer um dos seus peptídeos constituintes também está nessa razão A:B, e nem todos os peptídeos são essenciais para determinar essa relação - e mais especificamente, que apenas os peptídeos que refletem inequivocamente a proporção dessa proteína devem ser usados. No entanto, quanto mais peptídeos são medidos, mais precisa é a leitura.

7.8.7. Caracterização funcional das proteínas

Após a identificação das proteínas e etapa de quantificação relativa das proteínas, os resultados foram exportados (.CVS) e as proteínas organizadas em grupos de acordo com seu valor de *fold change* e p-valor (ANOVA) e suas funções biológicas determinadas utilizando as ferramentas KEGG Orthology (KO) (Website: <http://www.genome.jp/kegg>) Protein Knowledgebase (UniProtKB) (Website: <http://www.uniprot.org/>) e Gene Ontology Database (AmiGO) (Website: <http://www.geneontology.org/>).

A análise das interações entre as proteínas também foi realizada com a ferramenta STRING 10.5 (site:<https://string-db.org/>), para as candidatas a proteínas relacionadas a fitorremediação (PRF). Algumas proteínas assinadas como "*Unknown*" foram identificadas a partir do banco de dados do NCBI nr, usando a ferramenta Blastp (BLAST proteína-proteína) e pela presença de domínios conservados.

7.9. Preparo das plantas para ensaios de microscopia de fluorescência

Para este ensaio, 50 g de solo foram pesados em balança analítica de 3 casas decimais e passados para 32 potes de vidro com tampa rosqueada estéreis, sendo 16 potes para plantas sem BR 7411 cultivadas na presença de 0, 150, 300 e 450 ppm de HPA total e 16 potes contendo plantas inoculadas com BR 7411 (contendo nódulos ativos) nas mesmas concentrações de HPA total previamente citadas. 5 plântulas de *Medicago sativa L.* foram semeadas em cada pote e cultivadas em sistemas B.O.D com fotoperíodo de 14/10 horas (claro/escuro) a 28 °C. Cada planta foi regada com 1,5 mL de solução de Hoagland a cada 2 dias até o final do ensaio experimental. Após 10, 20, 30 e 40 dias de ensaio, as plantas foram coletadas e tiveram suas partes aéreas e radiculares separadas para os ensaios de microscopia de fluorescência.

7.9.1. Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada de acordo com o método descrito por Alves *et al.*, (2017) e as etapas de microscopia efetuadas nas dependências do

Laboratório de Biotecnologia Estrutural do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), em Xerém-RJ. Para detectar a presença e localização dos HPA nas plantas de alfafa, folhas e raízes previamente inoculadas com a cepa BR 7411 (apresentando nódulos ativos) assim como plantas não inoculadas, cultivadas na presença ou ausência de 150, 300 e 450 ppm de HPA total durante 40 DAS, foram gentilmente coletadas e suas partes aéreas (pecíolos) e radiculares (raízes presente após a coroa radicular) foram separadas suavemente do resto das plantas, com uma pinça de aço inoxidável. Após este passo, as amostras de tecido foram lavadas em água destilada, secas suavemente usando papel de filtro e imersas em n-hexano por 30 segundos para remover quaisquer HPA presentes na superfície da planta. Subsequentemente, as folhas e raízes foram montadas em lâminas de vidro, contendo 50 % de glicerol (50 µL) e vistas sob um microscópio de fluorescência LEICA DM 5000 B com o Cubo Filtrante LEICA (gama de excitação UV, filtro de excitação BP 340-380 nm, espelho dicromático 400 nm e filtro de supressão LP 425 nm). A aquisição das imagens se deu por uma câmera digital LEICA DFC 500 sob campos de luz UV e visível.

7.9.2. Determinação do espectro de emissão de fluorescência de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e extração de HPA de tecidos de *Medicago sativa L.* e análise espectrofluorométrica.

Para análise do espectro de emissão de fluorescência de cada HPA, foi utilizado o leitor de microplacas multiponto SpectraMax M2e (Molecular Devices), com as seguintes especificações de desempenho fotométrico de fluorescência: Monocromáticos duplos com incrementos de 1 nm, com λ_{exc} 250-850 nm, com λ_{em} 250- 850 nm e largura de banda (λ_{exc} e λ) de 9,9 nm. O espectro foi obtido através do Software de Análise e Aquisição de Dados SoftMax® Pro (Molecular Devices). O ensaio foi realizado de acordo com o método de Alkio *et al.*, (2005) e Wang *et al.*, (2010) e descrito nos trabalhos de Alves *et al.*, (2017). Soluções padrão com concentração final de 150µg.mL⁻¹ (ppm) foram preparadas em balões volumétricos de 5 mL para cada HPA estudado, em acetonitrila. A solubilização dos HPA foi auxiliada por banho ultrassônico termostatizado a 30 graus por 15 min. Para Obtenção do

espectro de emissão de HPA, 400 µl de cada solução de HPA foi excitado a λ 254 nm e então, o espectro de emissão foi varrido a λ 340-500 nm.

Para averiguar se a fluorescência presente nos tecidos vegetais era proveniente dos HPA, foi feita a extração dos HPA presentes em folhas de tecido e raízes de plantas de alfafa, crescidas na presença ou ausência de 150 ppm de PAH total por 40 DAS. 150 mg de tecido vegetal foi coletado em tubos de vidro com uma pinça de aço inoxidável e congelado em nitrogênio líquido, moído a pó fino com esferas de vidro em pulso de vórtice, extraído por 30 minutos com 2 mL de solução de n-hexano-diclorometano (1:1, v/v) e coletado em frascos de vidro de penicilina (15 mL). Os extratos de HPA foram purificados em cromatografia em coluna utilizando adsorção de sílica (*Clean-up*) (BANJOO E NELSON 2005 e ALVES *et al.*, 2018).

Após a eluição do analito, com 14 mL da fase móvel de n-hexano-diclorometano (8:2, v/v) em frascos de penicilina de 15 mL, as amostras de HPA foram completamente secas em estufa (com volatilização do solvente) e solubilizadas em 400 µL de acetonitrila, auxiliado por banho ultrassônico termostaticado a 30 graus durante 15 min, e imediatamente filtrado através de uma membrana de PTFE com poros de 0,22 µm em frascos de vidro (2 mL) e armazenado a - 20 °C para análise espectrofluorométrica.

Para análise espectrofluorométrica, 400 µL das amostras de HPA purificadas, provenientes de folhas e raízes de *Medicago sativa L.* foram excitados a λ 254 nm, em um Leitor de Microplacas Multi-Modo SpectraMax M2e (*Molecular Devices*) e em seguida, submetidos a escaneamento de espectro de emissão a 340-500 nm, a aquisição de dados foi feita através do SoftMax® Pro Software de Análise e Aquisição de Dados (*Molecular Devices*). Como controle, extratos de folhas e raízes pretencentes a amostras de *Medicago sativa L.* cultivadas na ausência de HPA foram analisados e comparados com uma solução contendo apenas acetonitrila e uma solução contendo uma mistura de cada HPA (Fig. 30).

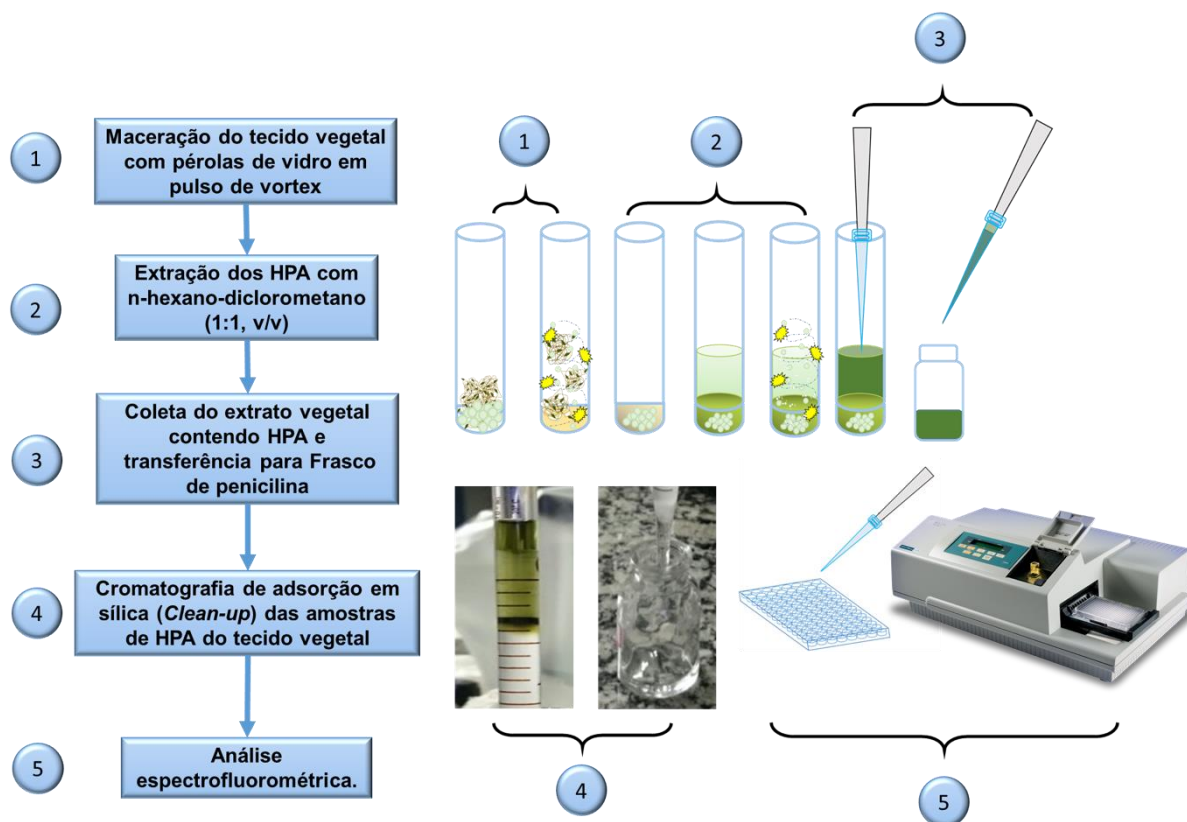


Figura 30. Extração de HPA de tecidos de *Medicago sativa L.* para análise espectrofluorométrica. Esquema gráfico apresentando as etapas necessárias para a extração dos HPA dos tecidos vegetais, seguido de etapa de purificação dos extratos e análise espectrofluorométrica.

7.10. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism 6*. Para a análise dos dados de biometria e biomassa seca foi utilizado análise de varância por duas vias (ANOVA *two way*) seguido de Tukey ($p < 0.0001$) e Holm-Sidak. Para a análise dos dados de fitorremediação de HPA foi utilizado o teste análise de varância por duas vias (ANOVA *two way*) seguido de Tukey ($p < 0.0001$). Para a análise de proteômica quantitativa foi utilizado análise de variância por uma via (ANOVA *one way*) seguido do teste t de student ($p < 0.0001$).

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Controle de contaminação em culturas da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*

Para averiguar o controle da pureza do estoque da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, foi feito o cultivo da cepa em três meios seletivos: Meio 79 + vermelho congo 25 ppm, meio 79 + azul de bromotimol 25 ppm e meio glicose e peptona + púrpura de bromocressol 100 ppm.

Como resultado, o estoque não apresentou contaminação, vide a formação colônias do mesmo tipo e com características compatíveis a cepa BR 7411, espécie pertencente ao grupo de proteobactérias da família Rhizobiaceae, como baixa absorção de corante vermelho do congo (evidenciado pelas colônias com coloração branca e/ou rosa claro), rápido crescimento em meio 79 com marcador de azul de bromotimol, indicando metabolismo ácido (evidenciado pela mudança da coloração de verde para amarelo), e intenso crescimento na presença de sacarose, observado nos cultivos em meio 79 quando comparado com o crescimento em meio Glicose Peptona, onde a cepa cresce formando colônias pouco volumosas e sem produção de exopolissacarídeos (que dão a consistência limosa para a cultura em meio 79), e sem acidificar o meio, mantendo a coloração púrpura (Fig. 31).

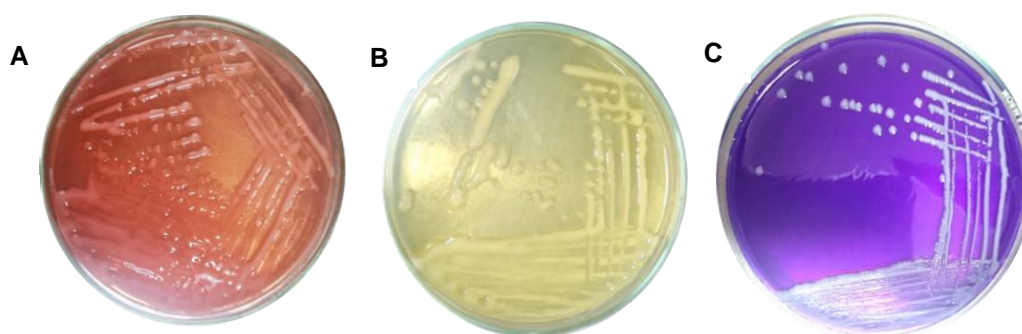


Figura 31. Culturas em placa da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em diferentes meios de cultivo. A) Meio 79 com marcador de vermelho congo – Colônias aparecem com coloração branca a rosada. **B)** Meio 79 com marcador de azul de bromotimol – Colônias aparecem com intenso crescimento, mudanças na coloração indicam metabolismo ácido da cepa. **C)** Meio glicose e peptona com marcador de púrpura de bromocressol – pouco crescimento, e ausência na mudança da coloração do meio. Todas as características citadas indicam ausência de contaminação e afirmam a identidade da cepa como sendo uma espécie pertencente a família Rhizobiaceae de crescimento rápido, característica de *Ensifer meliloti*.

5.2. Capacidade de oxidação dos HPA pela cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*

A capacidade de oxidação de pireno, antraceno e fenantreno pela cepa BR 7411 foi determinada, de forma qualitativa, pela metodologia de Hanson *et al.*, (1993) sendo positiva pela ocorrência da mudança na coloração do meio de mínimo contendo o indicador REDOX 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) de azul escuro para transparente (Fig. 32 A - B).

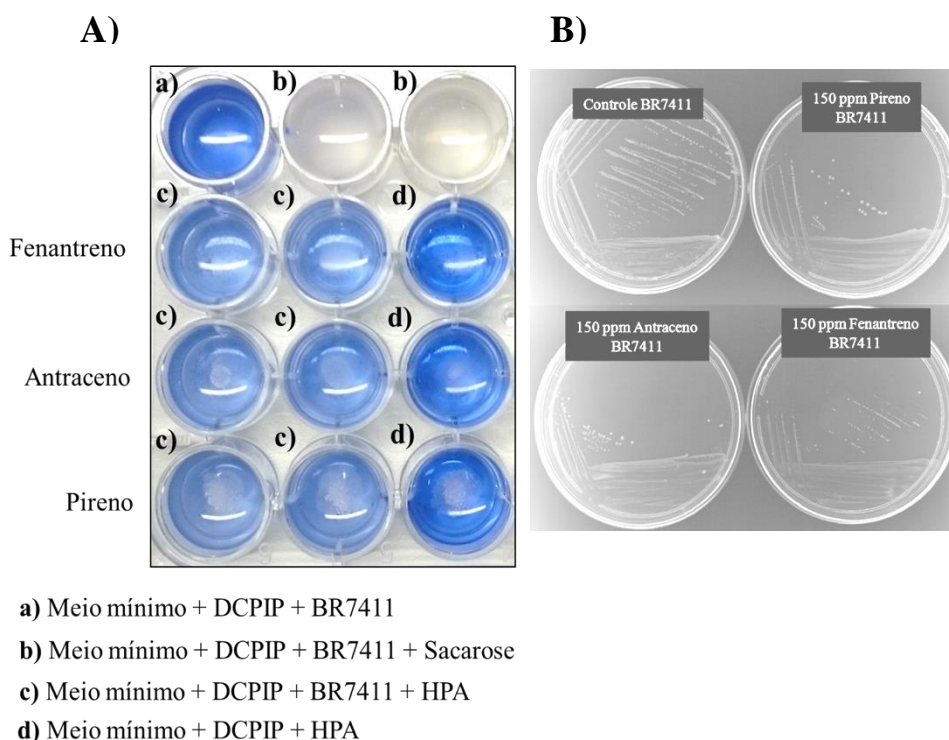


Figura 32. Capacidade de oxidação dos HPA pela cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em ensaio de Hanson (1993). A) Ensaio de O de HPA por BR 7411 em placa de 24 poços, a lista de componentes representados em a, b, c e d, são preparados nos poços seguindo a marcação de letras presente na placa. B) perfil de crescimento de BR 7411 em meio com taminado com 150 ppm de HPA.

Como resultados, houve diminuição da intensidade da cor azul do DCPIP presente nos poços contendo HPA, quando comparado ao poço controle (contendo apenas a Cepa BR 7411 e o DCPIP) indicando oxidação dos HPA e uma possível degradação e/ou uso dos HPA como fonte de carbono. O método foi validado utilizando meios contendo sacarose 10 % como fonte de carbono utilizada pela cepa BR 7411, apresentando completa descoloração após 4 dias de cultivo, indicando a oxidação e uso da sacarose como fonte de carbono. Como controle negativo, o indicador redox DCPIP não é degradado pela cepa BR 7411, como observado no

controle, evidenciando que a diminuição na coloração do meio se dá exclusivamente pela oxidação das fontes de carbonos acrescidas aos meios, ou seja, a oxidação dos HPA e da sacarose (Fig. 32 A). A Cepa BR 7411 permaneceu viva após o ensaio, sendo esse resultado avaliado em cultivos em placas de Petri contendo meio mineral complementado com 150 ppm de cada HPA por 14 dias. Como resultado, podemos observar que a cepa sobreviveu ao experimento, evidenciado pelo crescimento da cepa em todos os tratamentos (Fig. 32 B).

5.3. Crescimento e resposta de *Ensifer meliloti* (BR 7411) aos HPA – Cultivos em meio mineral (MM)

Para confirmar a utilização dos HPA como fonte de carbono pela cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* e possível utilização da mesma como uma ferramenta de biorremediação, curvas de crescimento de BR 7411 foram realizadas e observadas a resposta da cepa a fenantreno, antraceno e pireno complementados em meio mineral.

Como resultado, podemos observar que a cepa BR 7411 foi tolerante a presença dos três HPA estudados, sendo capaz de crescer em meio mineral contendo HPA como única fonte de carbono durante todo o experimento. Comparado com o controle, a cepa BR 7411 apresentou aumento significativo (Tukey $p < 0.0001$) da D.O. em cultivos contendo HPA como única fonte de carbono a partir das primeiras 24 horas de ensaio, mantendo essa diferença em relação ao controle até o final do ensaio, no tempo de 96 h. Os crescimentos máximos da cepa BR 7411, quando na presença dos HPA, puderam ser observados nos tempos de 72 horas. Após as 72 horas, a cepa já apresentou uma tendência a atingir a fase estacionária. As D.O. da cepa BR 7411 obtiveram valores de 31,09 %, 33,96 % e 34,51 %, acima dos valores de D.O. indicados para o controle, sendo os percentuais correspondentes aos meios contendo antraceno, pireno e fenantreno respectivamente, para o tempo de 72 horas (Fig. 33).

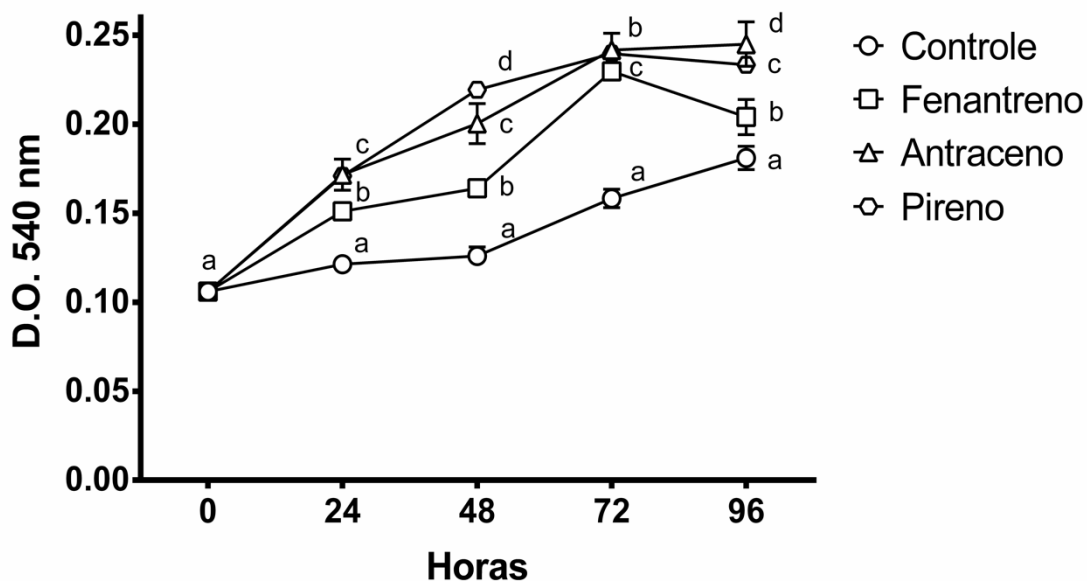


Figura 33) crescimento de *Ensifer meliloti* na presença do HPA fenantreno, antraceno e pireno. O cultivo foi feito em meio mineral complementado com 50 ppm de HPA total, como única fonte de carbono, e o crescimento da cepa foi acompanhado por leitura de D.O. a 540 nm. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores médios ($n=3$) das UFC.mL⁻¹ das condições experimentais (Controle, 150, 300 e 450 ppm) por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$).

Ao analisar os resultados de UFC.mL⁻¹, a sobrevivência da cepa BR 7411 fora acompanhada durante o transcorrer das 72 horas e estendida durante mais 4 dias. Como resultados, os cultivos feitos na presença de fenantreno mostraram uma queda significativa (Tukey $p < 0.0001$) no número de células de aproximadamente 60 % em 3 dias de cultivo.

Após 3 dias a cepa BR 7411 voltou a crescer, indicando uma tendência a seleção de células mais resistentes ao contaminante. A cepa BR 7411 apresentou o maior crescimento na presença de pireno, atingindo em 6 dias um número de células 1,8 vezes maior que o controle (Tukey $p < 0.0001$). Não foi possível observar diferença significativa no número de células em resposta a presença de antraceno (Tukey $p < 0.0001$) (Fig. 34).

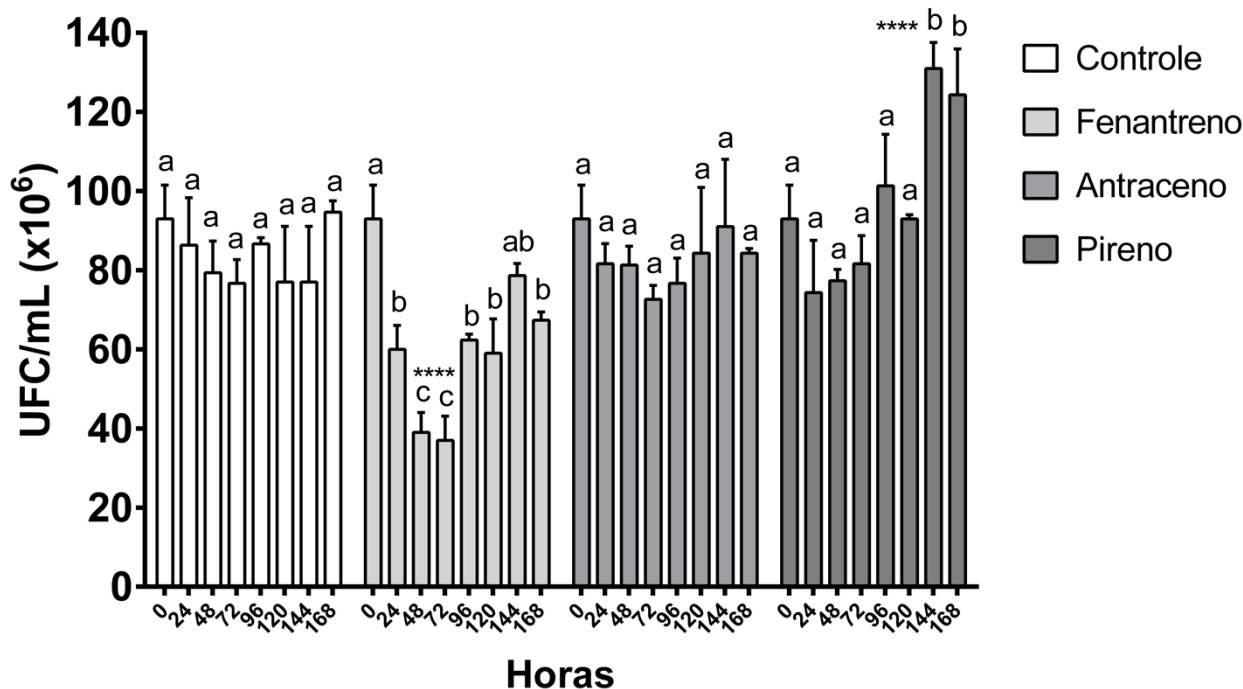


Figura 34) Unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) de *Ensifer meliloti* (BR 7411) na presença de HPA. Neste gráfico é possível observar o efeito tóxico do HPA fenantreno até as primeiras 96 horas e a recuperação do número de células ao final do experimento, indicando a seleção das cepas mais resistente ao fenantreno. Destaque para o ensaio na presença com pireno, indicando um aumento no número de células viáveis de 1,8 vezes em relação ao controle, no período de 144 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores médios (n=3) das UFC.mL⁻¹ das condições experimentais (Controle, 150, 300 e 450 ppm) por ANOVA two way seguido de Tukey (p < 0.0001) as estrelas indicam intervalos de confiança: **** = 99,9 %.

5.4. Crescimento e resposta de *Ensifer meliloti* (BR 7411) aos HPA – Cultivos em meio 79 (50 % de sacarose)

Para avaliar o co-metabolismo de diferentes HPA pela cepa BR 7411 quando na presença de uma fonte de carbono osmoticamente ativa em plantas (Sacarose), cultivos de BR 7411 foram realizados em meios 79 (50 % de sacarose) complementados com fenantreno antraceno e pireno. Dados de UFC.mL⁻¹ foram coletados de 4 em 4 horas durante 24 horas para observação das respostas de *Ensifer meliloti* a presença misturas de HPA contendo concentrações crescentes variando de 0 ppm (controle) até 450 ppm de HPA total.

Como resultados, observamos que a cepa BR 7411 foi tolerante a presença de HPA em todas as concentrações utilizadas. Durante 12 horas, é possível observar um crescimento exponencial da cepa em todas as condições, havendo poucas diferenças significativas entre os tratamentos com HPA e o controle.

Ao final de 12 horas é possível observar que a cepa BR 7411 cessa o crescimento em meio controle contendo somente 50 % de sacarose, mantendo esse perfil estacionário até o final do ensaio (24 horas). Em contrapartida, as cepas cultivadas na presença de 150 ppm de HPA total, apresentaram um aumento significativo quando comparado ao controle (Tukey $p < 0.0001$) mantendo esse perfil até o final do ensaio experimental (24 horas).

Culturas de BR 7411 em meios contendo concentrações maiores de HPA total (300 ppm e 450 ppm) também apresentaram uma tendência sutil ao aumento das suas UFC.mL⁻¹ quando comparadas ao controle no tempo de 16 horas, porém essa diferença tornou-se evidente após as 20 horas, onde cultivos complementados com 300 ppm de HPA ultrapassaram valores de 16×10^8 UFC.mL⁻¹, indicando uma diferença de 59,41 % em relação ao controle, com um número de células 2,5 vezes maior quando comparado ao meio contendo apenas sacarose como fonte de carbono. Ensaio contendo 150 e 450 ppm apresentaram diferenças de 43,82 % e 38,69 %, respectivamente, quando comparados ao controle, indicando um número de células de BR 7411 cerca de 1,8 e 1,6 vezes maior que o controle, respectivamente.

Para as concentrações de 300 ppm e 450 ppm, o perfil de crescimento foi similar ao controle até as primeiras 16 horas, seguido de uma ausência de crescimento até as 20 horas onde o crescimento passa a ser significativamente diferente do controle após as 20 horas. Este perfil de crescimento diáuxico típico, indica possivelmente o uso da sacarose majoritariamente até as 16 horas e mudança de metabolismo para consumo dos HPA, sendo esse perfil dependente da concentração dos HPA (Fig. 35).

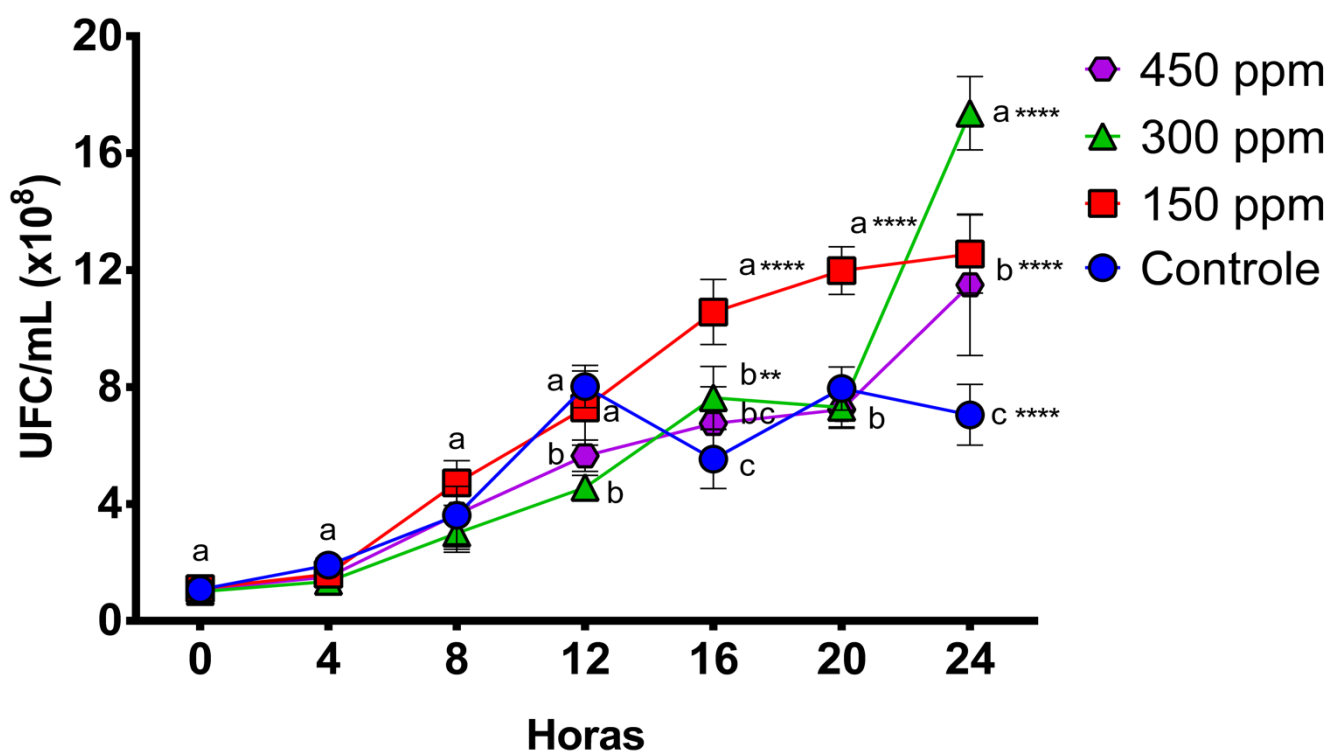


Figura 35. UFC.mL⁻¹ de BR 7411 em meio 79 (50 % de sacarose) complementado com 150, 300 e 450 ppm de HPA. Destaque para crescimento das cepas em meios complementados com 150 ppm a partir das 16 horas, e em 24 horas para todas as concentrações em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores médios (n=3) das UFC.mL⁻¹ das condições experimentais (Controle, 150, 300 e 450 ppm) por ANOVA two way seguido de Tukey (p < 0.0001) as estrelas indicam intervalos de confiança: **** = 99,9 % e ** = 95 %.

Quanto a aparência das culturas em meio líquido, observou-se diminuição na quantidade da “nata” formada na superfície do meio de cultura, (pela precipitação dos HPA hidrofóbicos) quando na presença da cepa BR 7411 após 24 horas, sendo uma diminuição significativa quando comparada com culturas contaminadas, mas sem o inóculo bacteriano, onde é possível observar a nata presente. Após terminado o cultivo, no tempo de 24 horas, o aspecto das culturas contendo HPA com o inóculo de BR 7411 apresentou-se muito similar as culturas controle, sem acrescentar os HPA, demonstrando de forma qualitativa que os HPA foram metabolizados em moléculas mais hidrossolúveis, indicando um possível consumo dos HPA como fonte de carbono em 24 horas quando na presença de uma fonte de carbono co-metabolizada (sacarose) (Fig. 36 A).

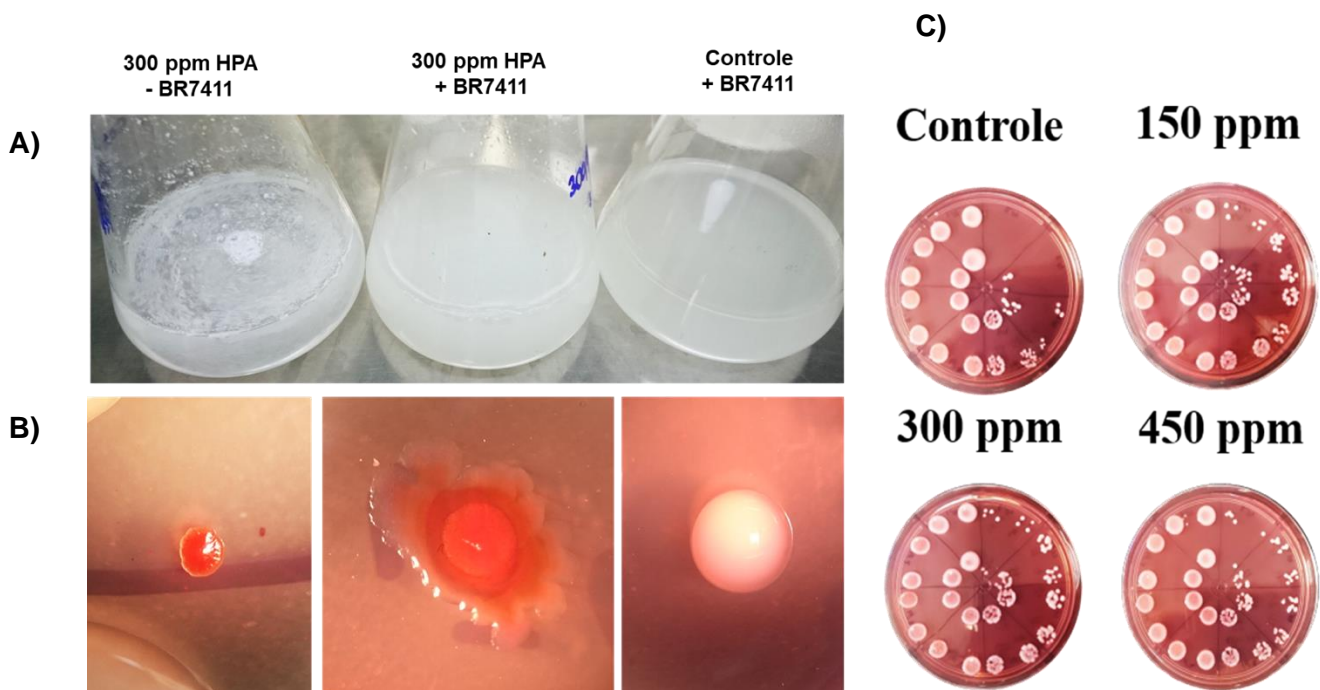


Figura 36. Aspecto das culturas de BR 7411 na presença de HPA em meios líquido e sólido. A) Análise qualitativa da degradação dos HPA, mostrando a ausência da “nata” de HPA em cultivos de BR 7411 na presença de 300 ppm de HPA após 24 horas de cultivo. **B)** controle de contaminação, destacando células marcadas de vermelho (contaminação externa) e células brancas de BR 7411, incapazes de metabolizar vermelho congo. **C)** aspecto das culturas em ensaio de UFC.mL⁻¹, destacando o aumento do número de colônias na presença dos HPA após 24 horas de cultivo.

Quanto a aparência das culturas em meio sólido, em placas de petri contendo meio 79 com indicador de vermelho do congo, foi possível observar o grande aumento do número de colônias em amostras oriundas de cultivos contaminados (Fig. 36 C). Em todas as culturas, as contaminações externas foram identificadas graças ao indicador de vermelho congo. As colônias de BR 7411 apresentaram-se pequenas e bem circulares, com coloração branca brilhante, característica da espécie de *Ensifer meliloti* (Fig. 36 B).

Como controle de contaminação, é possível observar as placas utilizadas para o ensaio de unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹), para determinação do crescimento e resposta de *Ensifer meliloti* (BR 7411) aos HPA. Destacando assim, a ausência de contaminantes externos durante a manipulação das culturas e coleta de

pontos dutante as 24 horas de ensaio, como também a evolução do crescimento das colônias ao longo das diluições (Fig. 37).

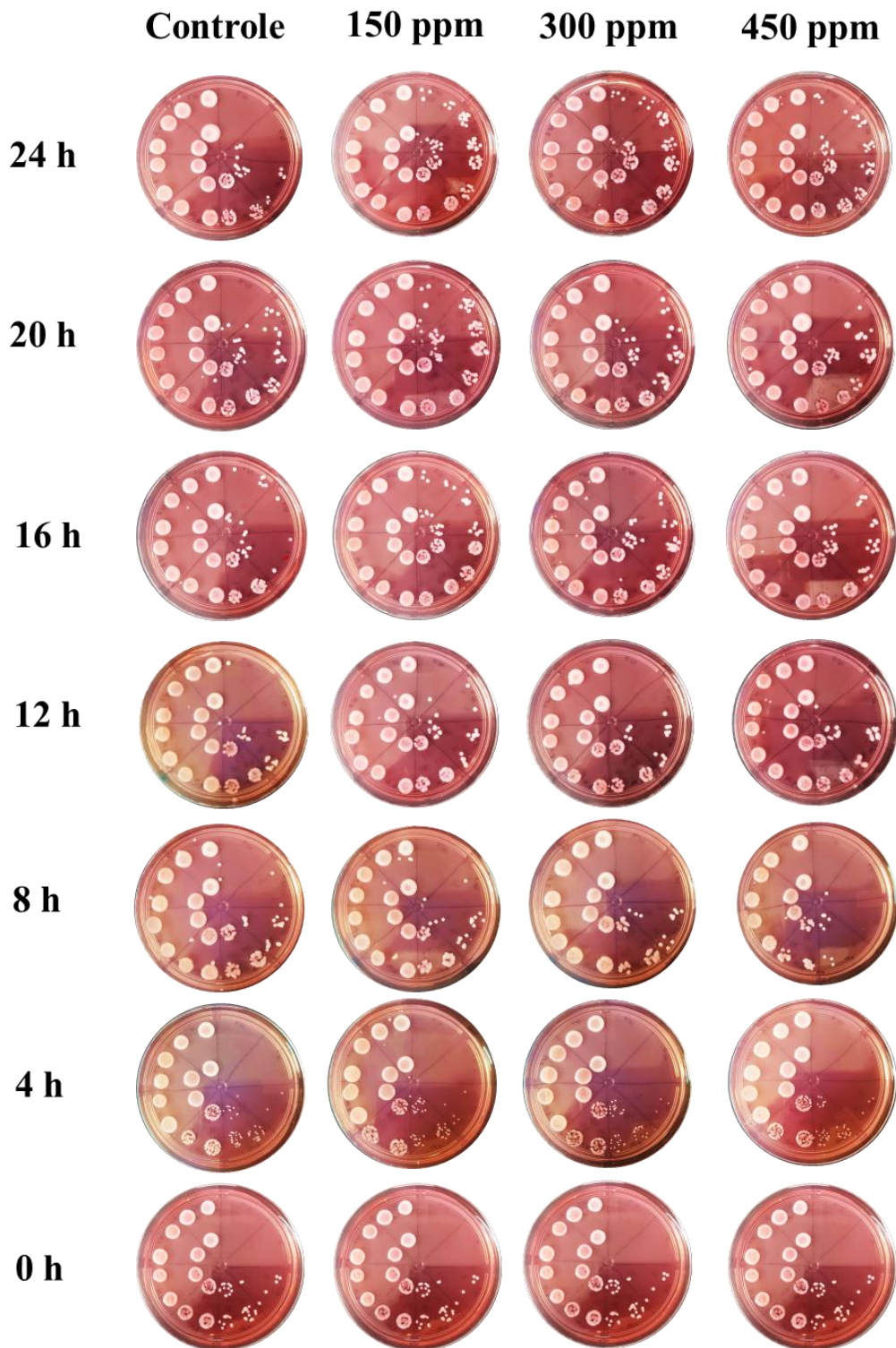


Figura 37. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹) para determinação do crescimento e resposta de *Ensifer meliloti* (BR 7411) aos HPA. Destaque para a ausência de contaminantes externos (indicado pela presença em sua totalidade de colônias com coloração branca brilhante, típica de *Ensifer meliloti*) durante a manipulação das culturas e coleta de pontos dutante as 24 horas de ensaio, como também a evolução do crescimento das colônias ao longo das diluições (no sentido anti-horário, iniciando em 10⁻¹ e finalizando em 10⁻⁸).

5.5. Autenticação do Inóculo da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em *Medicago sativa* L.

Para a autenticação da cepa BR 7411, foi monitorado durante 40 dias o crescimento de *Medicago sativa* L. e desenvolvimento de nódulos maduros ativos após inóculo de 300 μ L (1×10^9 células.mL⁻¹) de BR 7411. Como resultados, os dois controles apresentaram resultados esperados segundo Somasegaran P. & Hoben H. J. (1985). Como controle positivo, plantas cultivadas na presença de nitrogênio apresentaram ótimo crescimento, com presença de folhas com coloração verde escura e sem sinais de stress aparentes, e ausência de nódulos (Fig. 38 A). Quanto ao controle de esterilidade, plantas cultivadas na ausência de nitrogênio e sem o inóculo bacteriano, não foram capazes de sobreviver até o final do ensaio, apresentando severos sinais de deficiência de nitrogênio, como folhas amareladas (clorose), indicando a ausência de microrganismos endofíticos diazotróficos, mostrando que a etapa de desinfecção das sementes foi bem-sucedida (Fig. 38 C).

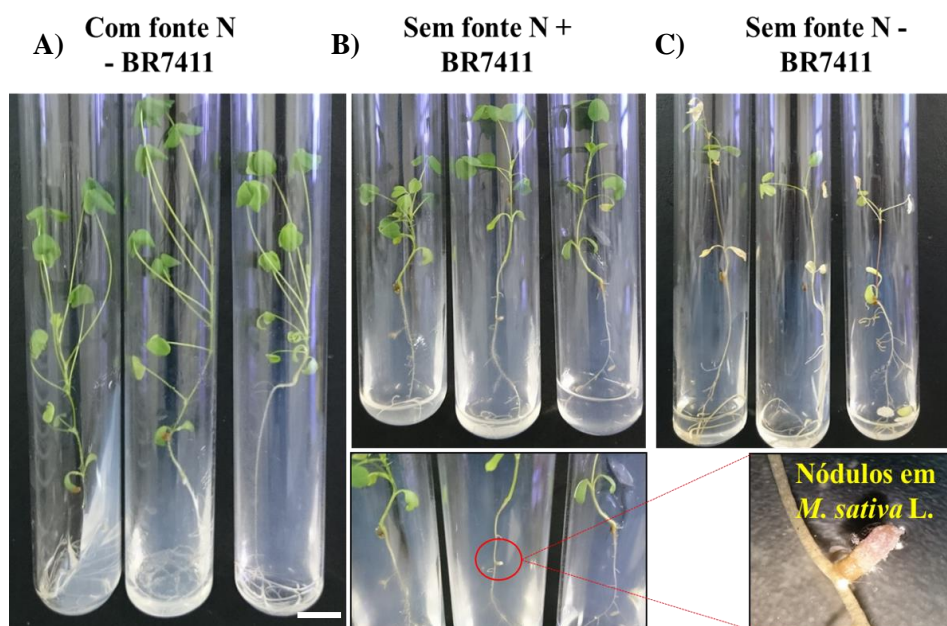
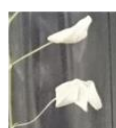
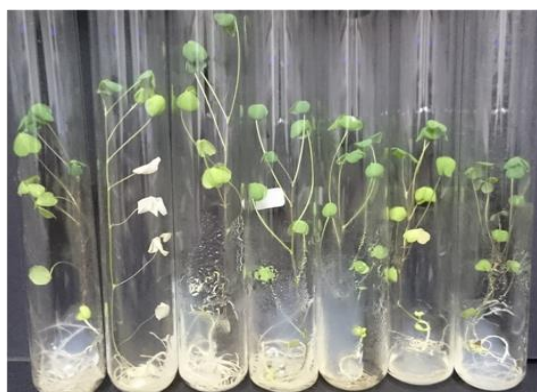


Figura 38. Ensaio de autenticação da cepa BR 7411 em plantas de *Medicago sativa* L. **A)** Cultivo com nitrogênio, desenvolvimento saudável, folhagem verde escura e raízes sem nódulos. **B)** Cultivo com BR 7411 na ausência de nitrogênio, menor tamanho, porém saudáveis e com folhas verdes escuras, fixação de nitrogênio advindo do metabolismo bacteriano da cepa BR 7411 (Detalhe para um nódulo ativo). **C)** Cultivo sem nitrogênio e na ausência de BR741, baixo desenvolvimento, sintomas de estresse como senescência, clorose, morte da planta antes do final do experimento. A ausência de nódulos e bactérias diazotróficas. (Barra = 1 cm)

Foi confirmada a autenticidade do inóculo da Cepa BR 7411 em plantas de *Medicago sativa* L. cultivadas na ausência de fonte de nitrogênio. A cepa foi capaz de infectar a planta gerando nódulos em 10 dias, e estes atingindo a maturidade com a produção de leghemoglobina em torno de 20 dias, as plantas apresentaram desenvolvimento de folhas com coloração verde escura, indicando aporte de nitrogênio fixado pela bactéria. (Fig. 38 B).

Para confirmar a eficiência da cepa BR 7411, as plantas foram deixadas crescendo na presença e ausência de fontes de nitrogênio até completar 90 dias de cultivo (50 dias além do intervalo de tempo estipulado para este estudo). Plantas cultivadas na presença de fonte de nitrogênio começaram a apresentar sinais de deficiência de nitrogênio, vide a exaustão dessas fontes presentes no meio de cultivo, contudo, as plantas cultivadas na ausência de nitrogênio e administradas com a cepa BR 7411 apresentaram ótimo desenvolvimento, graças a fixação de nitrogênio proporcionada pela interação da cepa BR 7411 com as raízes de alfafa (Fig. 39).

Com fonte N - BR7411



Morte foliar

Verde claro



Raízes maiores

Sem fonte N + BR7411



Baixa estatura

Verde escuro

Desenvolvimento de novos brotos

Nódulos

Raízes mais curtas

Fig 39. Ensaio de autenticação da cepa BR 7411 em plantas de *Medicago sativa* L. após 90 Dias. As plantas cultivadas na presença de nitrogênio por 90 dias começaram a apresentar sinais de deficiência de nitrogênio, porém, o tratamento com a cepa BR 7411 permitiu a o desenvolvimento saudável da planta durante todo o ensaio, vide a formação de nódulos propiciando a fixação de nitrogênio e com isso o desenvolvimento de novos brotos. (Barra = 1 cm)

Tendo em vista que os resultados da autenticação da cepa BR 7411 em plantas de *Medicago sativa* L. as condições de estudo escolhidas para o ensaio de fitorremediação em solo contaminado com HPA foram as condições: 1) *Medicago sativa* L. com BR 7411 (regado com Hoagland sem nitrogênio) e 2) *Medicago sativa* L sem BR 7411 (regado com Hoagland com nitrogênio), os ensaios sem a administração de fontes de nitrogênio (rega com Hoagland sem nitrogênio) e a ausência da cepa BR 7411 não foram estudados vide que a ausência de nitrogênio levaria a morte das plantas independentemente da existência de HPA no meio (Fig. 39 C).

5.6. Influência do inóculo da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* no fenótipo de *Medicago sativa* L. em diferentes concentrações de HPA

As plantas de alfafa foram tolerantes a todas as concentrações de HPA utilizadas, sendo capazes de desenvolver-se e sobreviver até o final do ensaio experimental aos 40 DAS (Fig. 40 e 41). Embora capazes de tolerar os contaminantes, mudanças na morfologia das alfafas cultivadas na presença de HPA, como a diminuição do comprimento dos entrenós e a presença de folhas reduzidas foi claramente observada, sendo essas características mais evidentes em plantas cultivadas em solos com elevada concentração de HPA. Plantas cultivadas em solo controle comparadas com plantas cultivadas em solo contaminado com 450 ppm total apresentaram diferenças significativas quanto ao desenvolvimento das partes aéreas ao final de 40 DAS, onde foi possível observar um retardo no crescimento, acompanhados do surgimento de folhas de tamanho reduzido, encurtamento dos entrenós quando cultivadas na presença dos contaminantes, além de sintomas visuais de clorose (amarelamento das folhas) e pontos brancos no limbo de folíolos e cotilédones senescentes também foram observados em plantas, cultivadas em solo contaminado (Fig. 40 e Anexo A *figure 2*). Contudo, quando as plantas foram administradas com o inóculo da cepa BR 7411, esses sintomas de estresse diminuíram significativamente, tornando-se mais tolerantes a presença dos HPA e apresentando diminuição dos sintomas de clorose, e regiões de necrose, como também o aumento da área foliar para todas as concentrações estudadas (Fig. 41).

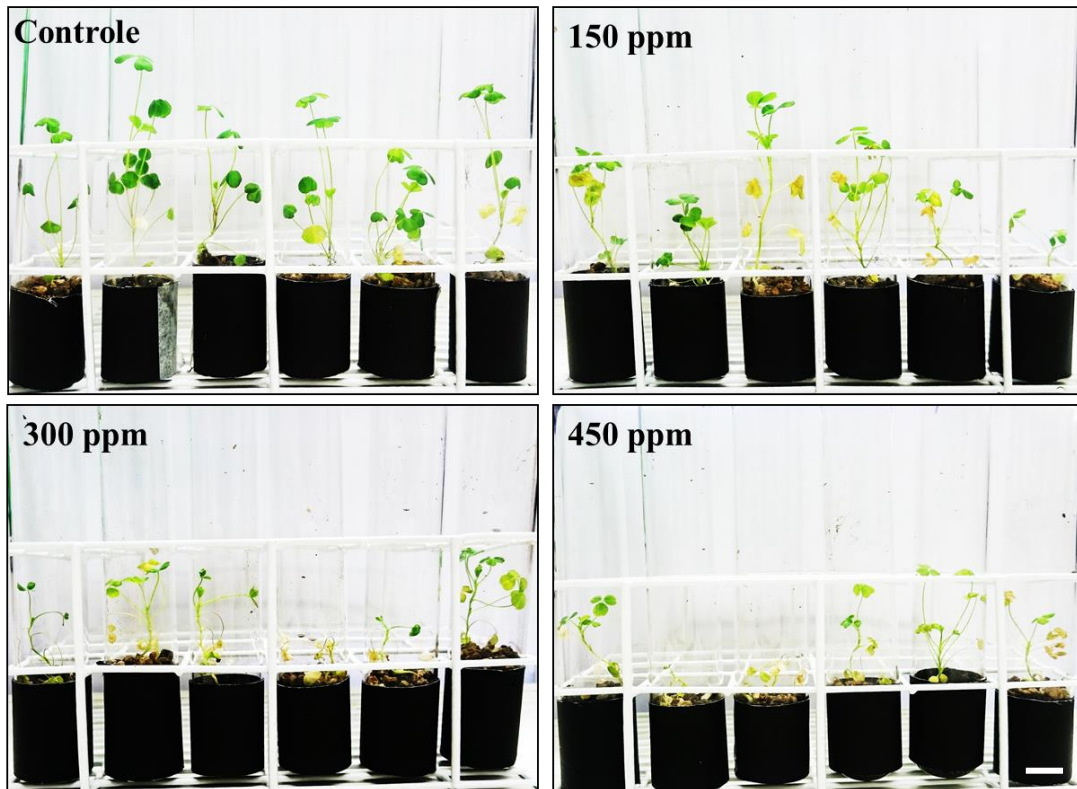


Figura 40. Plantas cultivadas em diferentes concentrações de HPA na ausência do inóculo da cepa BR 7411. Destaque para a presença de sinais de estresse, como clorose e diminuição das folhas e regiões de necrose foliar. (barra = 1 cm).

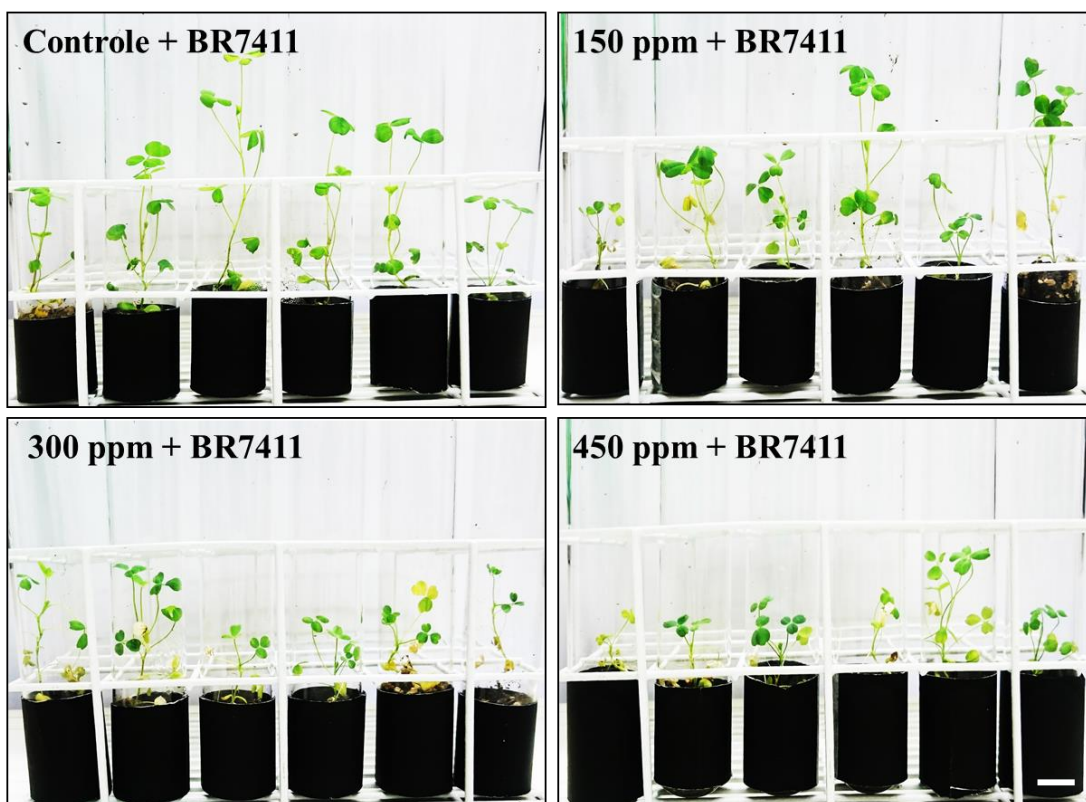


Figura 41. plantas cultivadas em diferentes concentrações de HPA na presença do inóculo da cepa BR 7411. Destaque para a melhora no fenótipo das plantas cultivadas na presença da cepa BR 7411. (barra = 1 cm).

5.7. Influência da cepa BR 7411 no comprimento médio das partes aéreas de *Medicago sativa* L. cultivada em diferentes concentrações de HPA

Medicago sativa L. foi capaz de crescer em solo contaminado nas três concentrações de estudo durante todo o ensaio. Quanto a resposta as diferentes concentrações de HPA, o comprimento médio das partes aéreas de *Medicago sativa* L. apresentou diminuição significativa (Tukey $p < 0.0001$), principalmente na região dos entre nós, conforme aumento da concentração dos contaminantes, sendo esse perfil observado em plantas cultivadas na ausência de BR 7411 (Fig. 42 A-D). Já em plantas onde o inóculo bacteriano foi administrado, a diminuição foi atenuada em todas as concentrações, destacando as diferenças significativas dos comprimentos das partes aéreas de *Medicago sativa* L. no tempo de 20 DAS em plantas cultivadas na presença de 150, 300 e 450 ppm (Tukey $p < 0.0001$) e no tempo de 40 DAS em plantas cultivadas na presença de 150 e 300, como também no controle, indicando um efeito benéfico as plantas, revertendo os sintomas de estresse causados pelos contaminantes (Fig. 42 A - D). A influência do inóculo de BR 7411, foi avaliado durante os 40 dias de ensaio, onde pode ser observado com mais detalhes o impacto positivo da sinergia entre *Medicago sativa* L. e a cepa BR 7411, como ferramenta de remediação de HPA (Fig. 43 A-D) (Holm-Sidak $p < 0.0001$). Em todos as concentrações estudadas, é possível observar que o tratamento com a cepa BR 7411 proporcionou aumento no comprimento das partes aéreas quando comparadas com plantas cultivadas na ausência de BR 7411, sendo este aumento significativo ao final do experimento para todos os tratamentos (controle, 150, 300 e 450 ppm) (Fig. 43 A-D) e significativo a partir dos 20 DAS para as concentrações de 150 ppm e 300 ppm (Fig. 43 B e C) (Holm-Sidak $p < 0.0001$).

Sendo assim, o consórcio alfafa/bactéria proporcionou o surgimento de plantas maiores e visualmente mais saudáveis em solos contaminados, quando comparadas com plantas cultivadas na ausência da cepa BR 7411. Os resultados foram obtidos sem a incorporação de fertilizantes externos ao sistema, vide que as plantas inoculadas com a cepa BR 7411 foram regadas com Hoagland desprovido de fontes de nitrogênio, cabendo a planta obter o nitrogênio necessário exclusivamente da fixação biológica de nitrogênio. A Cepa BR 7411, além de fornecer maior resistência aos contaminantes, substituiu totalmente a necessidade do uso de fertilizantes (Holm-Sidak $p < 0.0001$).

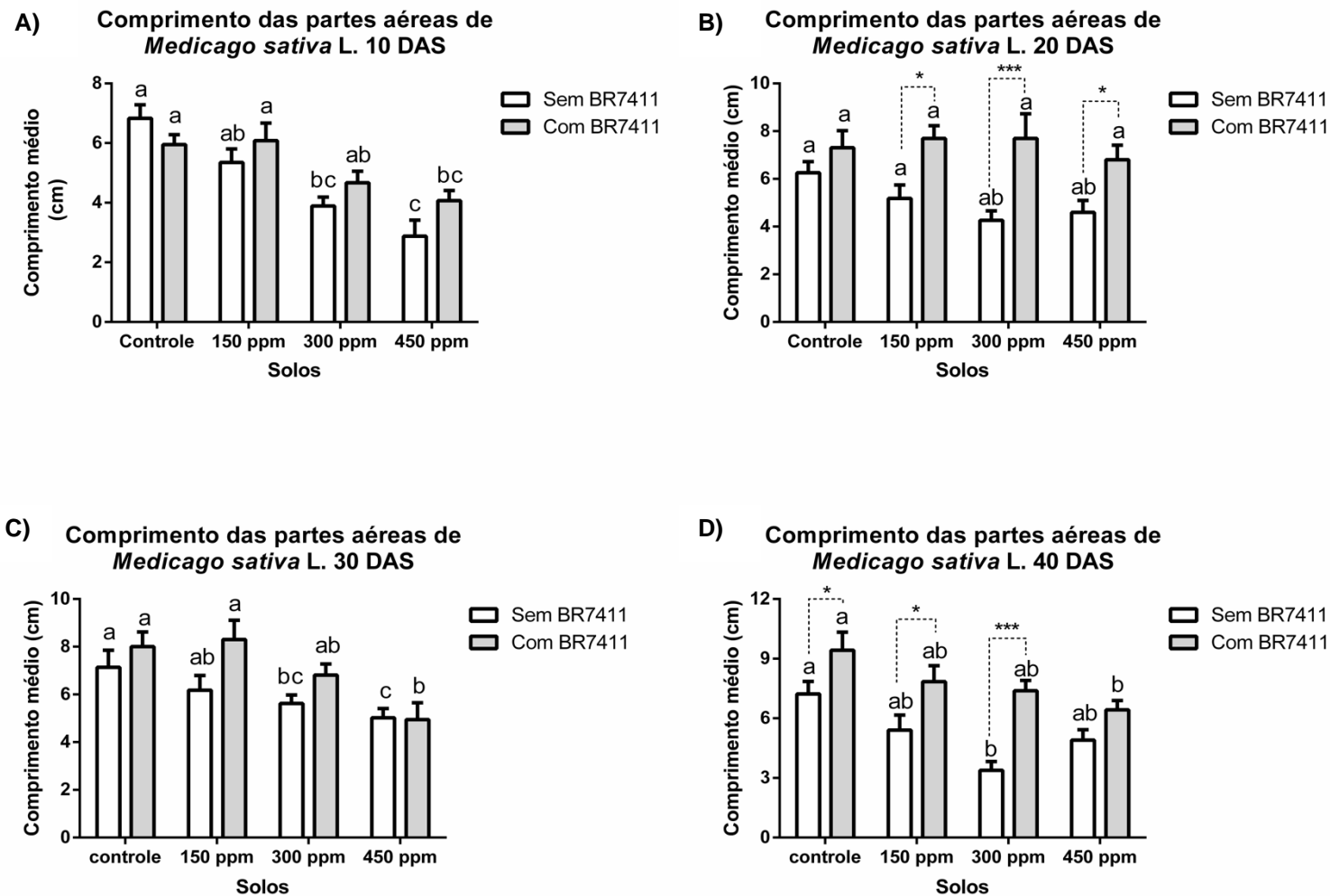


Figura 42. Comprimento das partes aéreas (dados biométricos) de *Medicago sativa* L. cultivadas na presença de HPA durante 40 DAS. O gráfico apresenta a variação do comprimento médio das partes aéreas (cm) de plantas na presença das três concentrações de contaminantes estudadas. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de 10 plantas coletadas em 10 (A) 20 (B) 30 (C) e 40 DAS (D). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as plantas cultivadas na presença de solos contaminados (controle, 150, 300 e 450 ppm de HPA total) durante 40 DAS por ANOVA *two way* seguido de Tukey ($p < 0.0001$). A avaliação da influencia do inóculo da cepa BR 7411 no comprimento das partes aéreas, foi obtida por ANOVA *two way* seguido de Holm-Sidak ($p < 0.0001$) onde as estrelas indicam diferença significativa para as mesmas condições de solo contaminado nos tempos de 10 a 40 DAS (intervalos de confiança: *** = 99 % e * = 90 %).

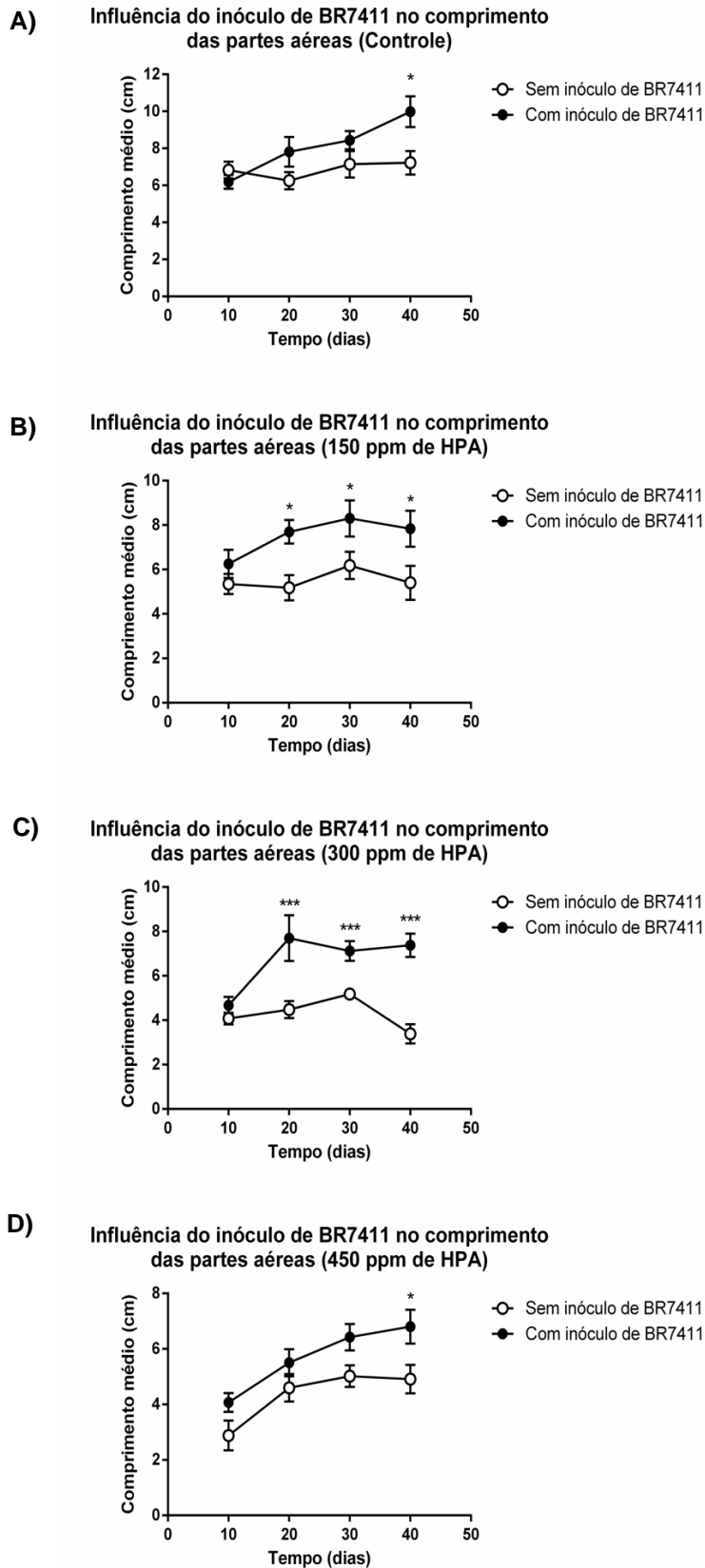


Figura 43. Influência do inóculo de BR 7411 no comprimento das partes aéreas (Biometria) de *Medicago sativa L.* Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 10 plantas ao longo de 40 DAS para as seguintes condições: **A)** Controle **B)** 150 ppm **C)** 300 ppm e **D)** 450 ppm. As estrelas (*) indicam diferença significativa entre os tratamentos por análise de variância por duas vias (ANOVA two way) seguido de teste de comparação múltipla de Holm-Sidak ($p < 0.0001$) (intervalos de confiança: *** = 99 % e * = 90 %).

5.8. Influência da cepa BR 7411 no comprimento médio das partes radiculares de *Medicago sativa* L. cultivada em diferentes concentrações de HPA.

As plantas de *Medicago sativa* L. foram capazes de crescer em solo contaminado nas três concentrações de estudo (150, 300 e 450 ppm de HPA total) por todo o período de tempo do experimento (40 DAS) (Fig. 44 A - D).

Quanto a resposta as diferentes concentrações de HPA, as partes radiculares de *Medicago sativa* L. apresentaram uma diminuição significativa em seu comprimento médio (Holm Sidak, $p < 0.0001$), conforme aumento da concentração dos contaminantes, sendo esse perfil observado em plantas cultivadas na ausência da cepa BR 7411 para todas as concentrações até os primeiros 30 dias (Fig. 44 A – C).

Contudo, em plantas onde o inóculo bacteriano fora administrado, o perfil de diminuição do comprimento médio das raízes foi detectado durante os primeiros 10 dias após semeadura, onde plantas cultivadas em solo contaminado com 150 ppm de HPA total apresentaram raízes com comprimento muito similar ao controle (Fig. 44 A), evidenciando a ausência de diferenças significativas, sendo essas observadas apenas com o aumento das concentrações de HPA total (em 300 e 450 ppm de HPA) (Fig. 44 A).

Já após 20 e 30 dias, é possível observar que nas raízes inoculadas com a cepa BR 7411 (Fig. 44 B e C), o perfil de diminuição do comprimento médio das raízes das plantas cultivadas na ausência de BR 7411, em resposta ao aumento da concentração de HPA, não é mais encontrado. Ao contrário, as raízes inoculadas tendem a ser maiores que as raízes não inoculadas, e quando comparadas ao controle, o comprimento médio das raízes cultivadas na presença dos HPA não apresenta diferenças significativas entre si. (Tukey $p < 0.0001$) (Fig. 44 A – D).

Ao final do experimento, em 40 dias após a semeadura, a administração do inóculo bacteriano reverte os sintomas de estresse das raízes, como a diminuição do crescimento das mesmas, para uma tendência a aumentar o comprimento médio das raízes conforme aumenta a concentração dos contaminantes, onde todas as plantas cultivadas em solos contaminados com HPA apresentaram um aumento significativo

(Tukey $p < 0.0001$) dos comprimentos médios de suas raízes, quando comparadas com o controle (Fig. 44 D).

Também é destacado as diferenças significativas dos comprimentos radiculares de *Medicago sativa L.*, inoculadas com a cepa BR 7411 no tempo de 20 DAS, para plantas cultivadas em solo contaminado com 300 ppm de HPA total (Fig. 44 B) (Holm-Sidak $p < 0.0001$), e no tempo de 30 DAS, para plantas cultivadas em solo contaminado com 300 e 450 ppm de HPA total (Fig. 44 C), quando comparados com plantas não inoculadas com a cepa BR 7411, para as mesmas condições de concentração de contaminante e tempo de cultivo. Indicando um efeito benéfico para as plantas de *Medicago sativa L.*, revertendo os sintomas estresse causados pelos contaminantes presentes no solo, permitindo que as raízes se desenvolvam na presença dos contaminantes.

A influência do inóculo da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* para o comprimento das raízes de *Medicago sativa L.* foi avaliado durante os 40 dias de ensaio. Pode ser observado com mais detalhes o impacto positivo da sinergia entre *Medicago sativa L.* e a cepa BR 7411, como ferramenta de remediação de HPA, principalmente nas concentrações mais elevadas de HPA total (Fig. 45 A - D) (Holm-Sidak $p < 0.0001$). Foi possível observar que o tratamento com a cepa BR 7411 proporcionou aumento no comprimento das partes radiculares quando comparadas com plantas cultivadas na ausência de BR 7411, onde este aumento significativo é observado nos primeiros 30 dias para todas as plantas cultivadas em solos contaminados (Fig. 45 B - D). Outro destaque pode ser observado nos primeiros 20 dias, para a concentração de 300 ppm de HPA total, onde o comprimento médio das raízes de plantas inoculadas com a cepa BR 7411 atingiu um valor 33,7 % maior no comprimento médio das raízes, se comparado as plantas cultivadas na ausência da bactéria, para o mesmo tempo de estudo, sendo esse aumento significativo (Fig. 45 C) (Holm-Sidak $p < 0.0001$).

Sendo assim, o consórcio alfafa / bactéria proporcionou o surgimento de raízes maiores e visualmente mais saudáveis em solos contaminados com altas concentrações de HPA (maiores que 300 ppm de HPA total) quando comparadas com plantas cultivadas na ausência da cepa BR 7411 (Fig. 44 e 45 C e D).

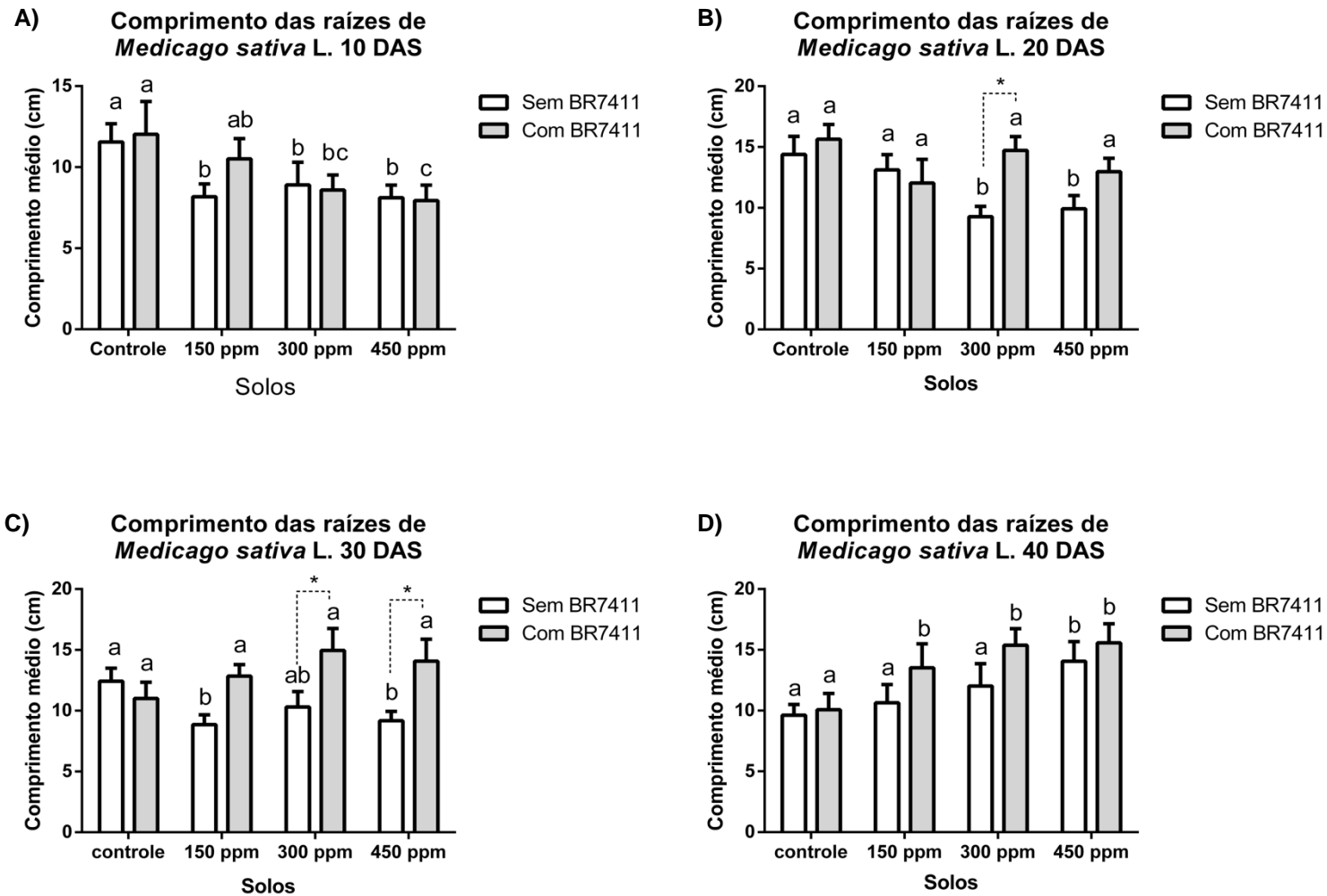


Figura 44. Comprimento (cm) das raízes (dados biométricos) de *Medicago sativa* L. cultivadas na presença de HPA durante 40 DAS. O gráfico apresenta a variação do comprimento médio das raízes (cm) de plantas na presença das três concentrações de contaminantes estudadas. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de 10 plantas coletadas em 10 (A) 20 (B) 30 (C) e 40 DAS (D). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as plantas cultivadas na presença de solos contaminados (controle, 150, 300 e 450 ppm de HPA total) durante 40 DAS por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$). A avaliação da influencia do inóculo da cepa BR 7411 no comprimento das raízes, foi obtida por ANOVA two way seguido de Holm-Sidak ($p < 0.0001$) onde as estrelas indicam diferença significativa para as mesmas condições de solo contaminado nos tempos de 10 à 40 DAS (intervalos de confiança: *** = 99 % e * = 90 %).

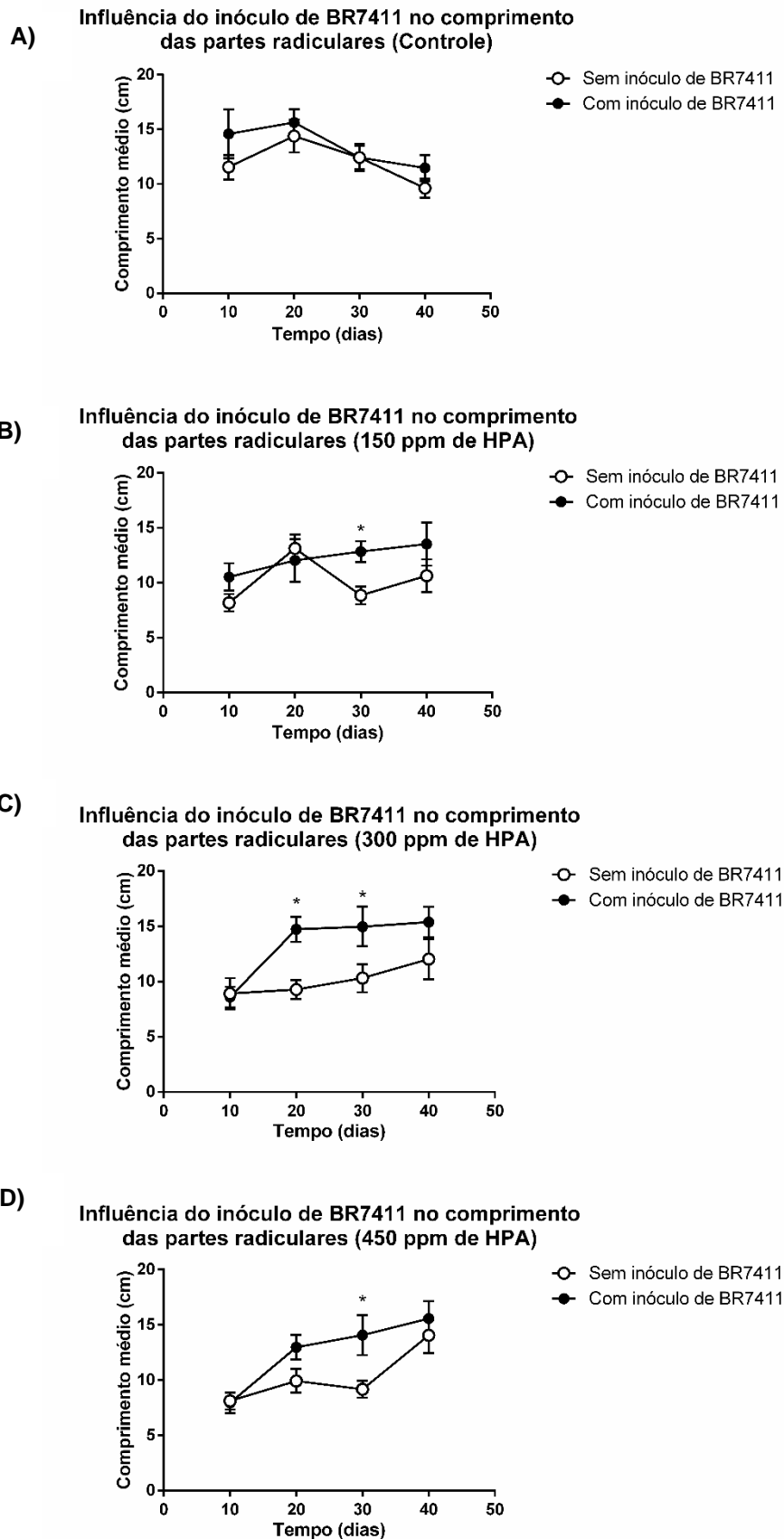


Figura 45. Influência do inóculo de BR 7411 no comprimento (cm) das partes radiculares (dados biométricos) de *Medicago sativa* L.. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 10 plantas ao longo de 40 DAS para as seguintes condições: **A)** Controle **B)** 150 ppm **C)** 300 ppm e **D)** 450 ppm. As estrelas (*) indicam diferença significativa entre os tratamentos (presença ou ausência de BR 7411) por análise de variância por duas vias (ANOVA *two-way*) seguido de teste de comparação múltipla de Holm-Sidak ($p < 0.0001$) (intervalos de confiança: * = 90 %).

5.9. Influência da cepa BR 7411 na Biomassa das partes aéreas de *Medicago sativa* L. cultivada em diferentes concentrações de HPA

Medicago sativa L. foi capaz de aumentar a sua biomassa em solo contaminado nas três concentrações de estudo (150, 300 e 450 ppm de HPA total) por todo o período de tempo do experimento (40 DAS) (Fig. 46 A-D). A Biomassa das partes aéreas de *Medicago sativa* L., em resposta a presença dos HPA, apresentou um perfil de diminuição da biomassa, conforme aumento da concentração dos contaminantes estudados, apenas nos primeiros 10 dias de ensaio para tratamentos com a cepa BR 7411 (Fig. 46 A). Este perfil é estabilizado nos tempos de 20 e 30 DAS e nos tratamentos controle, 300 e 450 ppm de 40 DAS, não apresentando diferenças significativas entre os valores de biomassa e entres os tratamentos (solos contaminados) (Tukey $p < 0.0001$) (Fig. 46 B-D).

Como resultado, também é destacado o aumento da biomassa das partes aéreas de *Medicago sativa* L., cultivadas em solo contaminado com 150 ppm de HPA total e administrados com inóculo bacteriano nos tempos de 20 e 40 DAS, quando comparados com plantas não inoculadas com a cepa BR 7411 (Fig. 46 C e D). E também no tempo de 10 DAS, onde o tratamento com a cepa BR 7411 favoreceu um incremento significativo de biomassa as plantas cultivadas na maior concentração de HPA estudada (Holm-Sidak $p < 0.0001$) (Fig. 46 A).

A influência do inóculo da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, foi avaliado durante os 40 dias de ensaio, onde pode ser observado com mais detalhes uma tendência a um impacto positivo da sinergia entre *Medicago sativa* L. e a cepa BR 7411 como ferramenta de remediação de HPA (Fig. 47 A-D). Em média, as plantas que receberam o inóculo bacteriano apresentaram valores maiores de biomassa, porém somente as plantas cultivadas na presença de 150 ppm de HPA total, para o tempo de 40 DAS, apresentaram um incremento da biomassa significativo (Holm-Sidak $p < 0.0001$), se comparada aos tratamentos, onde não foi utilizado a cepa BR 7411 (Fig. 47 B).

Sendo assim, a cepa BR 7411 contribuiu de forma positiva para o aumento da biomassa das plantas, substituindo a necessidade do uso de fertilizantes, vide que não houve diferença significativa em sua maioria, entre as plantas não inoculadas com

BR 7411 e regadas periodicamente com fonte de nitrogênio externa (Hoagland), com as plantas administradas somente com a cepa BR 7411 e regadas com solução sem fonte de nitrogênio, vide similaridade entre os perfis de crescimento e incorporação de biomassa durante os 40 DAS para todas as concentrações estudadas (Holm-Sidak < 0.0001) (Fig. 47 A – D).

Esse perfil também pode ser observado de forma qualitativa nas imagens das coberturas vegetais dos potes de cultivo, comparando as plantas tratadas com a cepa BR 7411 com as plantas cultivadas em sua ausência (Fig. 48 A-B)

Ao observar as plantas cultivadas durante 20 DAS, as plantas que receberam o inóculo de BR 7411 apresentam não só maior cobertura vegetal, como também, são mais verdes visualmente, apresentando menores sinais de estresse causado pela presença dos HPA, ou deficiências na obtenção de macro e micronutrientes (caracterizado pela presença de necroses foliares e cloroses), quando comparadas com plantas cultivadas na ausência da cepa BR 7411 (Fig. 48 A-B)

Ao final do experimento, no tempo de 40 DAS, fica evidente o impacto positivo da utilização do consórcio planta / bactéria, ao observar o aumento da biomassa nos potes de 150, 300 e 450 ppm de HPA total nas plantas inoculadas, em comparação as plantas cultivadas na ausência de BR 7411 (Fig. 48 A-B).

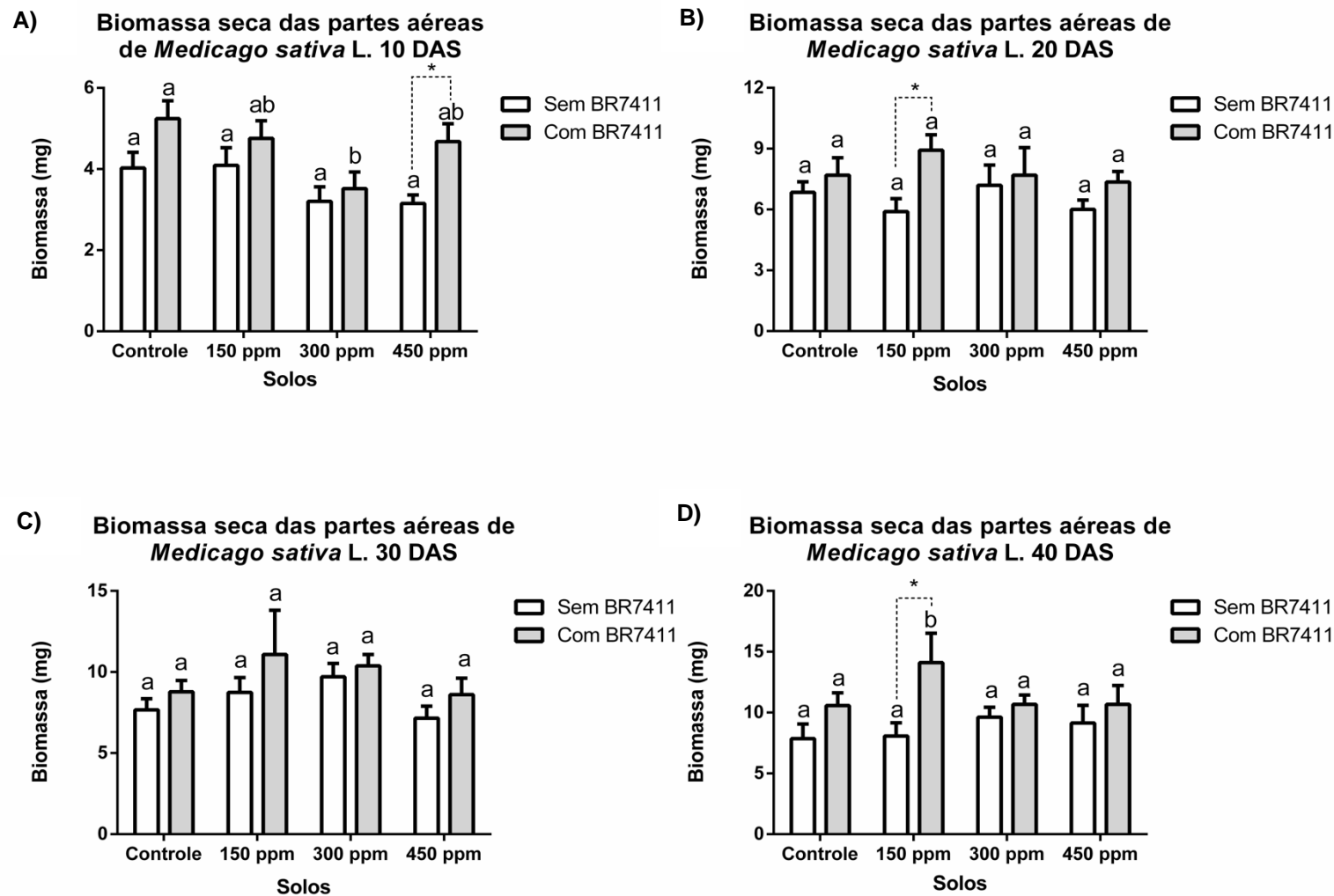


Figura 46. Biomassa (mg) das partes aéreas de *Medicago sativa* L. cultivadas na presença de HPA durante 40 DAS. O gráfico apresenta a variação da biomassa seca das partes aéreas (cm) de plantas na presença das três concentrações de contaminantes estudadas. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de 10 plantas coletadas em 10 (A) 20 (B) 30 (C) e 40 DAS (D). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as plantas cultivadas na presença de solos contaminados (controle, 150, 300 e 450 ppm de HPA total) durante 40 DAS por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$). A avaliação da influência do inóculo da cepa BR 7411 na biomassa das partes aéreas, foi obtida por ANOVA two way seguido de Holm-Sidak ($p < 0.0001$) onde as estrelas indicam diferença significativa para as mesmas condições de solo contaminado nos tempos de 10 a 40 DAS (intervalos de confiança: * = 90 %).

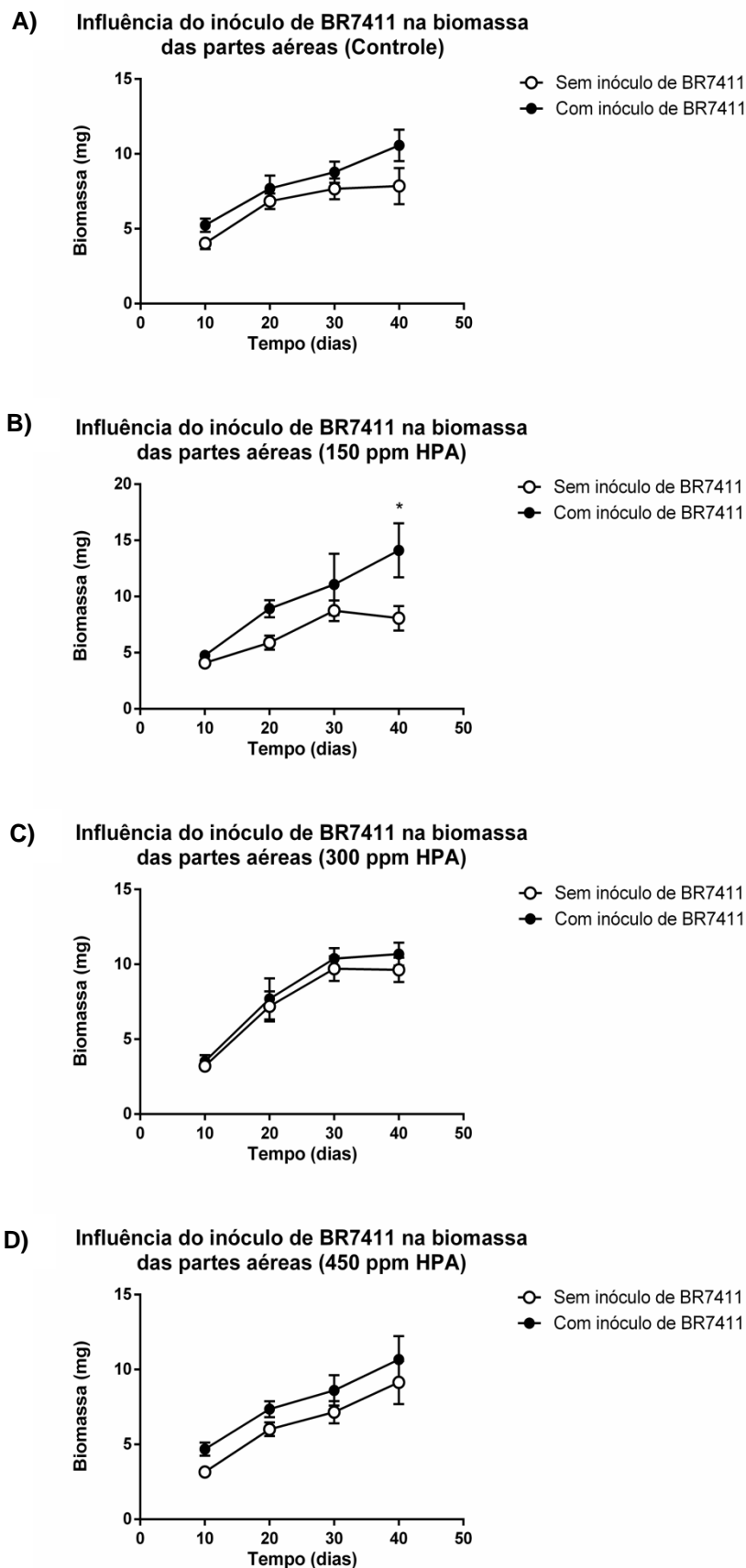
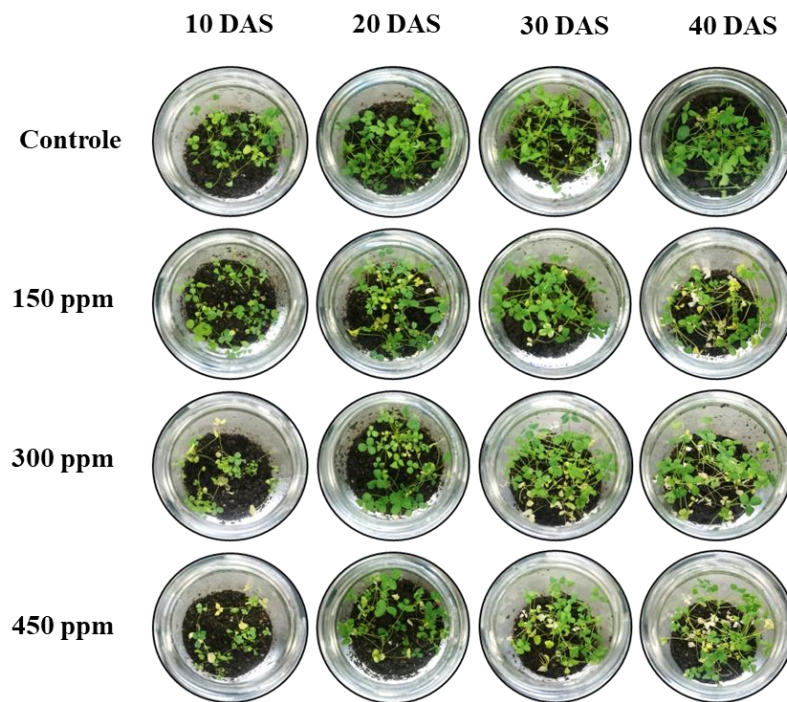


Figura 47. Influência do inóculo de BR 7411 na biomassa seca (mg) das partes aéreas de *Medicago sativa* L.. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 10 plantas ao longo de 40 DAS para as seguintes condições: **A)** Controle **B)** 150 ppm **C)** 300 ppm e **D)** 450 ppm. As estrelas (*) indicam diferença significativa entre os tratamentos (presença ou ausência de BR 7411) por análise de variância por duas vias (ANOVA *two way*) seguido de teste de comparação múltipla de Holm-Sidak ($p < 0.0001$) (intervalo de confiança: * = 90 %).

A) Plantas cultivadas na ausência do inóculo da cepa BR7411 de *Ensifer meliloti*



B) Plantas cultivadas na presença do inóculo da cepa BR7411 de *Ensifer meliloti*

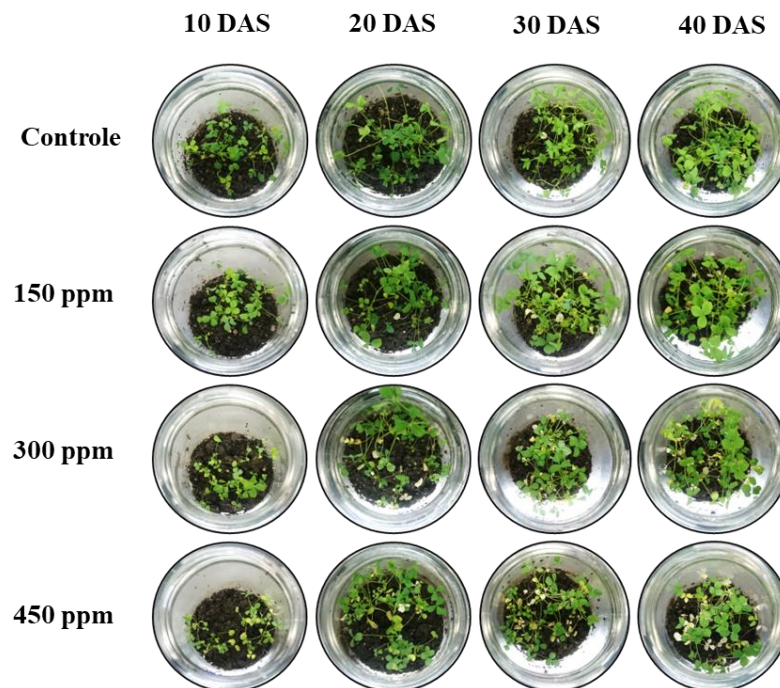


Figura 48. Desenvolvimento de *Medicago sativa* L. nas diferentes concentrações de HPA durante 40 DAS, na presença (A) e ausência (B) da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*.

5.10. Influência da cepa BR 7411 na Biomassa das partes radiculares de *Medicago sativa L.* cultivada em diferentes concentrações de HPA.

As plantas de *Medicago sativa L.* foram capazes de aumentar a sua biomassa radicular em solo contaminado nas três concentrações de estudo (150, 300 e 450 ppm de HPA total) por todo o período de tempo do experimento (40 DAS).

Quanto a resposta as diferentes concentrações de HPA, a partes radiculares de *Medicago sativa L.* apresentaram um aumento da sua biomassa seca (Tukey $p < 0.0001$), conforme aumento da concentração dos contaminantes, sendo esse perfil observado em plantas cultivadas na ausência da cepa BR 7411 para todas as concentrações sendo mais evidente nos tempos de 10 e 40 dias (Fig. 49 A e D).

Para plantas cultivadas na presença da cepa BR 7411, este aumento da biomassa conforme aumento da concentração dos contaminantes fora observado majoritariamente ao final do experimento em 40 DAS (Fig. 49 D), e isoladamente no tempo de 30 dias para a concentração de 300 ppm de HPA total (Fig. 49 C). As demais condições não apresentaram diferenças significativas na biomassa radicular, indicando que a presença dos HPA não influenciou no aumento ou diminuição das biomassas radiculares, quando comparadas ao controle.

Um destaque importante, foi o aumento da biomassa radicular em resposta a presença dos HPA ao final de 40 dias, sendo este perfil observado tanto para plantas cultivadas na presença como na ausência de BR 7411, nesses dados é possível observar um investimento majoritário das plantas na produção de raízes em resposta a presença dos contaminantes, sendo o crescimento médio de aproximadamente 50 % na biomassa dessas raízes se comparada as raízes controle (Fig. 49 D) (Tukey $p < 0.0001$).

A influência do inóculo da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* para a biomassa das raízes de *Medicago sativa L.*, foi avaliado durante os 40 dias de ensaio, onde podemos observar um impacto positivo na utilização do consorcio “*Medicago sativa L.* + cepa BR 7411” para os cultivos na ausência de HPA (Fig. 50 A), mas significativo apenas em concentrações mais baixas das HPA (150 ppm de HPA total; Holm Sidak < 0.0001), onde conforme ocorre o aumento das concentrações, a biomassa radicular

tende a se assemelhar ao tratamento sem a presença da cepa BR 7411 (Fig. 50 B) (Holm-Sidak $p < 0.0001$).

O tratamento com a cepa BR 7411 proporcionou aumento na biomassa radicular, quando comparadas com plantas cultivadas na ausência de BR 7411, em plantas cultivadas em solo não contaminado nos intervalos de 10 e 30 dias, destacando um ganho significativo da biomassa radicular nesses dias (Fig. 50 A). A biomassa radicular de plantas cultivadas na presença de BR 7411, avaliada nos intervalos de tempo de 20 e 40 dias, também se apresentaram, em média, maiores do que as biomassas de plantas cultivadas no mesmo intervalo de tempo, mas sem o inóculo bacteriano, contudo, esta diferença não foi significativa (Holm-Sidak < 0.0001) (Fig. 50 A).

Quanto observamos a influência da cepa BR 7411 em plantas submetidas ao estresse dos contaminantes, plantas cultivadas em solo contaminado com 150 ppm de HPA total receberam um ganho significativo em sua biomassa radicular em 20 DAS, quando administradas com a cepa BR 7411, sendo esse perfil mantido até o final do experimento (Fig. 50 B). Outro destaque pode ser observado nos primeiros 30 dias, para a concentração de 300 ppm de HPA total, onde a biomassa seca das raízes de plantas inoculadas com a cepa BR 7411 atingiu um valor 60 % maior na biomassa das raízes, se comparado as plantas cultivadas na ausência da bactéria, para o mesmo tempo de estudo, sendo esse aumento significativo (Holm-Sidak < 0.0001) (Fig. 50 C). Em plantas cultivadas na presença de 450 ppm, embora apresentando um sutil ganho na produção de biomassa radicular, não houve diferença significativa entre os tratamentos com ou sem a cepa BR 7411 (Holm-Sidak < 0.0001) (Fig. 50 D).

Sendo assim, o consórcio alfafa/bactéria proporcionou o aumento da biomassa e visualmente apresentou-se mais saudáveis em solos contaminados com baixas concentrações de HPA (até 150 ppm HPA total) quando comparadas com plantas cultivadas na ausência da cepa BR 7411 (Fig. 50 B).

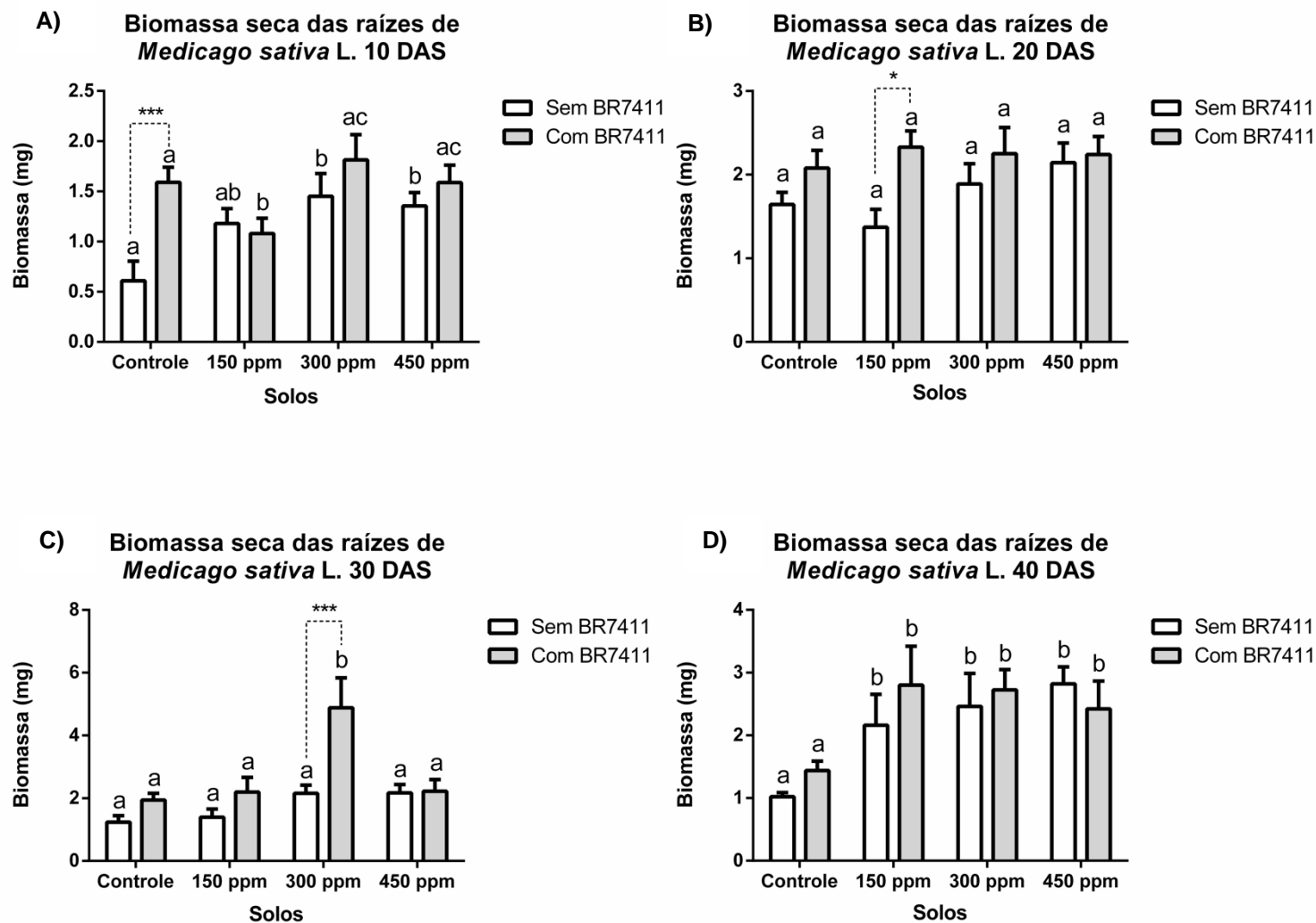


Figura 49. Biomassa (mg) das raízes de *Medicago sativa* L. cultivadas na presença de HPA durante 40 DAS. O gráfico apresenta a variação da biomassa seca das raízes (mg) de plantas na presença das três concentrações de contaminantes estudadas. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de 10 plantas coletadas em 10 (A) 20 (B) 30 (C) e 40 DAS (D). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as plantas cultivadas na presença de solos contaminados (controle, 150, 300 e 450 ppm de HPA total) durante 40 DAS por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$). A avaliação da influência do inóculo da cepa BR 7411 na biomassa seca das raízes, foi obtida por ANOVA two way seguido de Holm-Sidak ($p < 0.0001$) onde as estrelas indicam diferença significativa para as mesmas condições de solo contaminado nos tempos de 10 à 40 DAS (intervalos de confiança: *** = 99 % e * = 90 %)

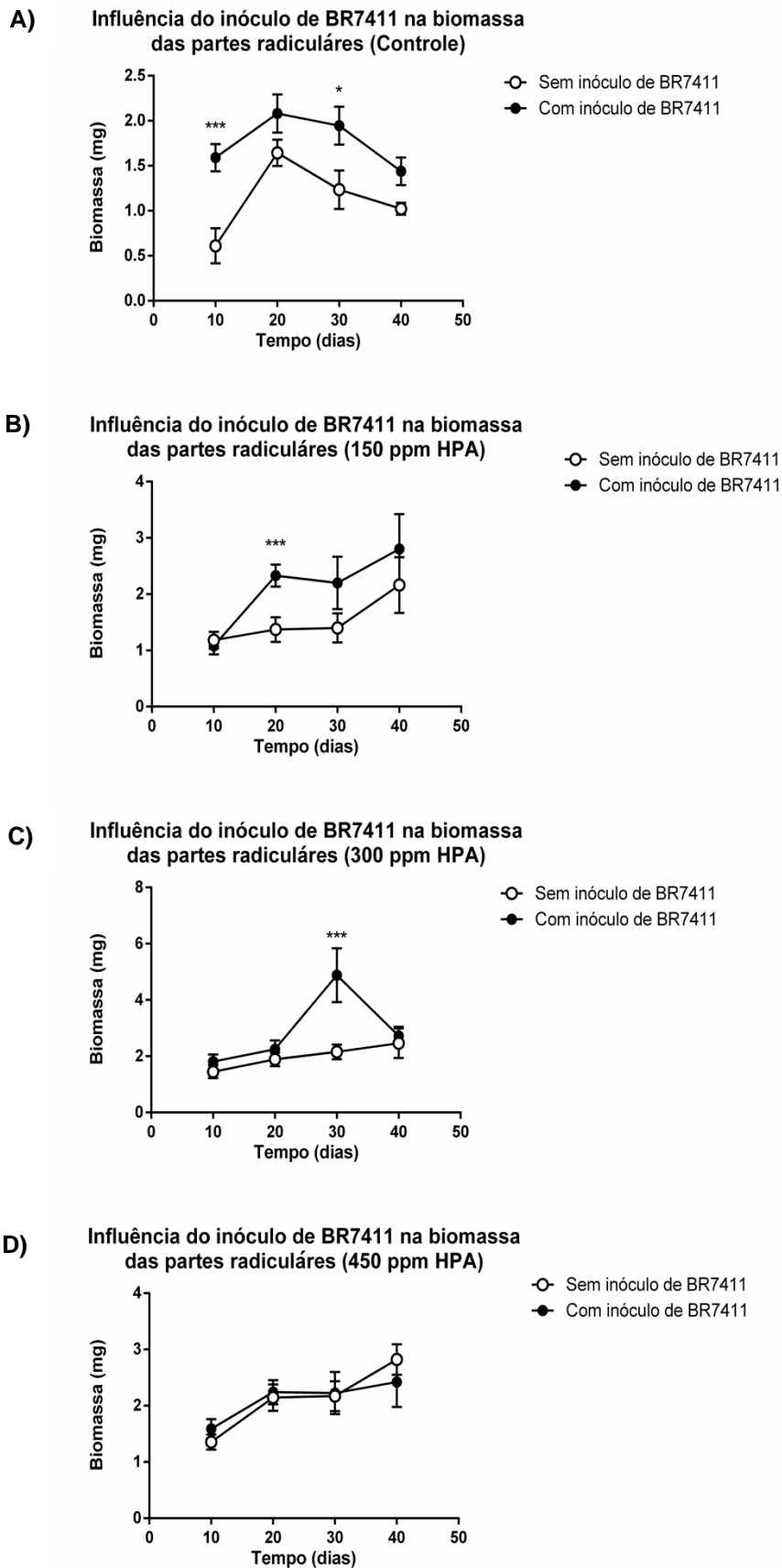


Figura 50. Influência do inóculo de BR 7411 na biomassa seca (mg) das partes radiculares de *Medicago sativa L.* Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 10 plantas ao longo de 40 DAS para as seguintes condições: **A)** Controle **B)** 150 ppm **C)** 300 ppm e **D)** 450 ppm. As estrelas (*) indicam diferença significativa entre os tratamentos (presença ou ausência de BR 7411) por análise de variância por duas vias (ANOVA two-way) seguido de teste de comparação múltipla de Holm-Sidak ($p < 0.0001$) (intervalo de confiança: ***= 99 % * = 90 %).

5.11. Monitoramento do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g⁻¹) de Solo durante 40 DAS em resposta a presença de HPA

Para monitorar a densidade populacional de bactérias presentes nos solos utilizados para os ensaios experimentais, foi feita observação da variação das UFC.g⁻¹ de solo, da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, como também das bactérias autóctones de *Medicago sativa* L (provenientes da flora bacteriana natural de simbiontes das alfafas), presentes em amostras de solo cultivados com alfafas, previamente inoculadas ou não com a cepa de BR 7411 durante 40 DAS, em resposta as diferentes concentrações de HPA utilizadas nesse estudo (150, 300 e 450 ppm de HPA total).

Como resultado, observamos que os solos cultivados com *Medicago sativa* L. inoculadas com a cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, apresentaram um aumento no número de unidades formadoras de colônias de BR 7411 conforme passados os primeiros 10 dias (em torno de 20x10⁵ UFC.g⁻¹ de solo) até os 30 dias (em torno de 40 a 80x10⁵ UFC.g⁻¹ de solo), seguido de queda no número de unidades formadoras de colônias ao final do experimento, em 40 dias (Fig. 51).

De forma geral, em todos os intervalos de tempo, pode ser observado um aumento significativo das UFC.g⁻¹ de solo em solos contaminados com concentrações de 150 a 300 ppm de HPA total (Tukey p < 0.0001). Em 10 dias, a presença de 300 ppm de HPA proporcionou um aumento de cerca de 40 % no número de bactérias, sendo esse aumento significativo, presente em 20 dias e atingindo os 50 % em 30 dias (Tukey p < 0.0001) (Fig. 51)

Como destaque, podemos observar o tempo de 20 dias, onde é possível observar um aumento significativo das UFC tanto para a concentração de 150 ppm como para a concentração de 300 ppm (Tukey p < 0.001), sendo que entre a concentração de 150 e 300 ppm, também pode ser observado diferenças significativas no número de bactérias, indicando que, para o tempo de 20 dias, a concentração de bactérias torna-se elevada em concentrações de HPA menores, mas tende a diminuir conforme o aumento da concentração dos contaminantes (Fig. 51).

Dentre todos os tempos estudados, o tempo de 30 dias apresenta-se como o intervalo de tempo onde foi possível encontrar o maior número de bactérias, sendo

um indicativo de que a planta possa estar modulando o número de indivíduos na rizosfera ou promovendo melhores condições para o desenvolvimento da cepa nesse intervalo de tempo (como liberação de fontes de carbono assimiláveis pela cepa BR 7411) (Fig. 51).

De maneira geral, a presença dos HPA favoreceu o aumento do número de indivíduos de *Ensifer meliloti* no solo, permanecendo presentes no ambiente por todo o tempo de estudo.

Como controle da esterilidade do solo, foi observado o número de bactérias autóctones cultivadas na presença de HPA em ensaios com potes cultivados com alfafas não inoculadas com BR 7411, sendo essas identificadas pela mudança na coloração das colônias cultivadas em meio 79 complementado com vermelho congo, onde essas bactérias diferentes de *Ensifer meliloti* apresentam colorações que vão do rosa intenso, passando pelo laranja, vermelho, marrom e roxo (Fig. 52 B).

Em todos os tempos estudados, o número de bactérias apresentou-se muito baixo, atingindo os valores mais elevados também nos 30 dias, mas com valores de UFC de apenas 1.5×10^5 UFC.g⁻¹ de solo, o que corresponderia a aproximadamente menos de 2 % se comparado com os valores de UFC.g⁻¹ de solo de amostras inoculadas com *Ensifer meliloti*. Demonstrando que a presença de bactérias autóctones não é influenciada pela presença dos HPA e que possivelmente, o aumento do número de indivíduos em 30 dias se dá pela interação planta x bactéria (Fig. 52 A).

Em ensaios de 10, 20 e 40 dias, o número de bactérias autóctones apresentou-se muito próximo de zero, sendo um valor considerado não natural para amostras ambientais de solo, garantindo assim as condições assépticas de cultivo, como também a ausência da resposta dessas bactérias a presença dos HPA, se comparado com a resposta obtida em solos cultivados na presença de *Ensifer meliloti* (Fig 52 A).

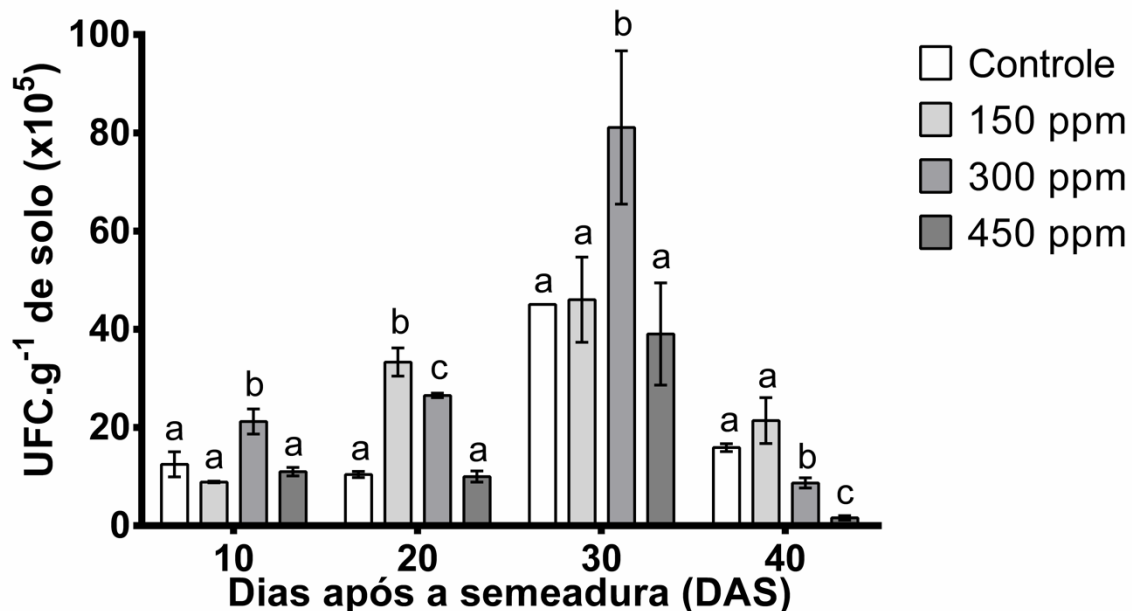


Figura 51. Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g⁻¹ de Solo) durante 40 DAS em resposta a presença de HPA, em cultivos de *Medicago sativa* L. na presença da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*. Aumento do nº de bactérias em 30 dias, e aumento significativo quando na presença de 300 ppm de HPA total, sendo esse perfil de aumento (40 a 50 %) presente desde os primeiros 10 dias. Em 20 dias, comparados ao controle, as bactérias atingem crescimento significativo nas concentrações de 150 e 300 ppm. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$)

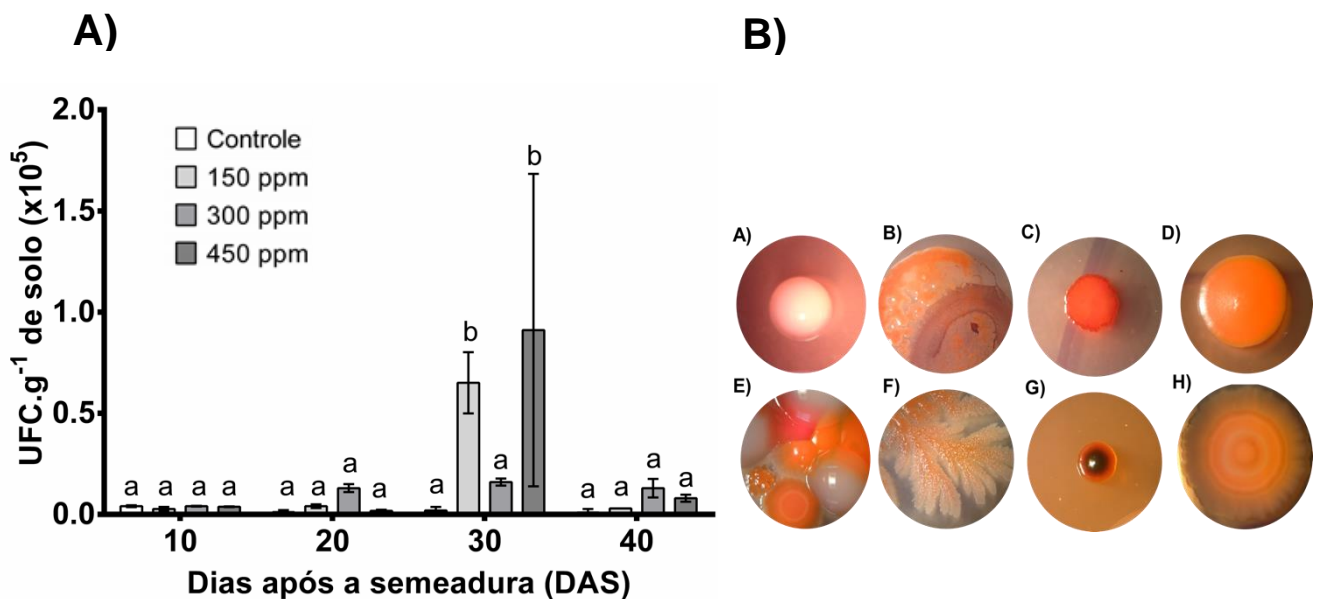


Figura 52. Unidades Formadoras de Colônias (UFC.g⁻¹ de solo) durante 40 DAS em resposta a presença de HPA, em cultivos de *Medicago sativa* L. na ausência da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*. **A)** Baixo nº de bactérias em amostras de solo oriundas de cultivos contendo apenas plantas de *Medicago sativa* L. (sem inóculo bacteriano). Valores apresentam-se muito próximos de zero. Aumentos significativo apenas na presença dos HPA no tempo de 30 DAS. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras (controle, 150, 300 e 450 ppm de HPA total) durante 40 DAS por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$) **B)** Aspecto das colônias encontradas no ensaio de UFC para bactérias autóctones. **Imagem (A)** - exemplo da morfologia da colônia de *Ensifer meliloti* (ausente no ensaio – citada apenas para comparação). **Imagens de (B) a (H)** – diferentes colônias de microorganismos autóctones detectados pelo marcador de vermelho do congo, evidenciando colônias com tonalidades de rosa intenso **(E)**, passando pelo laranja **(B,D,E,F e H)**, vermelho **(C e H)**, vermelho escuro **(G)** e roxo **(B)**.

5.12. Potencial de fitorremediação e biorremediação em solos contaminados com 150 ppm de HPA total.

Os dados foram obtidos pelo monitoramento das concentrações de HPA em solos contaminados com 150 ppm de HPA total, cultivados e não cultivados com *Medicago sativa L.*, na presença e ausência da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, nos intervalos de tempo de 0, 10, 20, 30 e 40 DAS.

Como resultado, para o monitoramento das concentrações de fenantreno (Fig. 53 A) antraceno (Fig. 53 B) e pireno (Fig. 53 C) em solos contaminados com 150 ppm de HPA total, temos que todos os tratamentos, seja a utilização isolada de *Medicago sativa L.* e a bactéria *Ensifer meliloti*, ou o consórcio entre eles, foi eficiente na diminuição da concentração nos primeiros 10 DAS. Para resultados referentes a concentração de fenantreno (Fig. 53 A) a utilização do tratamento de fitorremediação na ausência de BR 7411 (ou seja, somente utilizando a planta *Medicago sativa L.*) promoveu a maior redução na concentração deste HPA para os primeiros 10 DAS, atingindo valores abaixo de 10 mg.kg⁻¹ de fenantreno no solo, sendo uma queda significativa (Tukey $p < 0.0001$), quando comparada com o solo sem tratamento (IC = 99,9 %) e quando comparado com os tratamentos contendo a cepa BR 7411, na ausência ou presença de *Medicago sativa L.* (IC = 99 %), atingindo percentuais de remoção de fenantreno acima de 80 % para os primeiros 10 DAS e acima de 90 % a partir dos 30 DAS (Fig. 54 A). Para o monitoramento das concentrações de fenantreno em tratamentos contendo o inóculo da cepa BR 7411, podemos observar que durante os primeiros 10 DAS tanto o tratamento “*M. sativa L.* + BR 7411” quanto o tratamento “BR 7411” não apresentaram diferenças significativas entre si, sendo essas diferenças presentes apenas a partir de 20 DAS, onde a ação isolada da cepa BR 7411 contribuiu para a queda da concentração de fenantreno para valores próximos de zero em 30 DAS e percentuais de remoção de fenantreno superiores a 90 % (Tukey $p < 0.0001$) (Fig. 54 A).

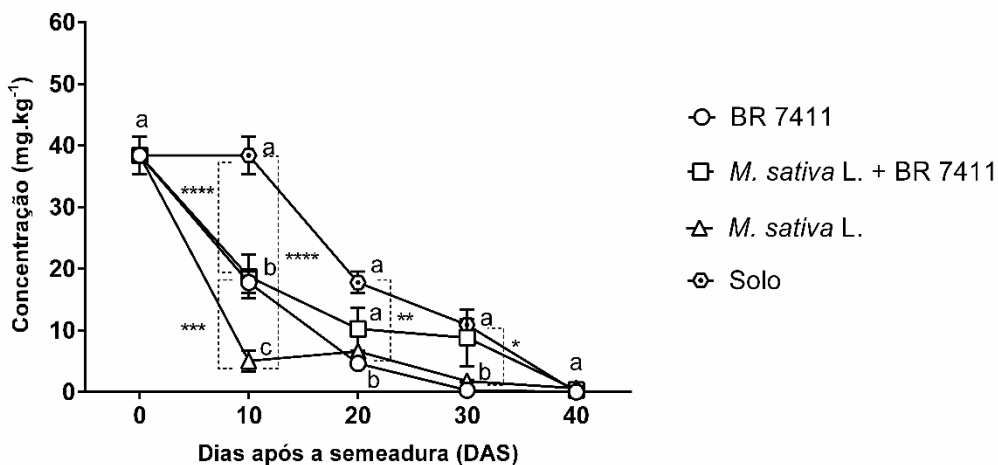
Desta forma, o HPA fenantreno apresentou uma tendência a ser eliminado mais rápido do ambiente, em tratamentos cujo uso isolado da planta *Medicago sativa L.*, como ferramenta de remediação, fora adotado. Para os resultados referentes ao monitoramento da concentração de antraceno em solos contaminados com 150 ppm de HPA total, a influência da planta *Medicago sativa L.* apresentou-se majoritária em

relação a ação isolada da bactéria *Ensifer meliloti*, vide o decréscimo das concentrações de antraceno logo nos primeiros 10 DAS para todos os tratamentos que envolvem a participação de *Medicago sativa L.* (seja na ausência ou presença de BR 7411) (Fig. 53 B), onde nesse intervalo de tempo, atinge percentuais de remoção médios entre 70 % a 80 % para o tempo de 10 DAS (Fig. 54 B). Já os tratamentos feitos com a cepa BR 7411 de forma isolada, o potencial de biorremediação da mesma apresenta-se de forma similar a atenuação natural do antraceno no ambiente, não apresentando diferença significativa (Tukey $p < 0.0001$) quando comparado com o a ausência de tratamento (Solo) (Fig. 53 B), onde os valores do percentual de remoção de antraceno apresentam-se menores que 20 % (Fig. 54 B). Somente após 20 DAS a ação individual da bactéria conseguiu diminuir a concentração de antraceno a valores abaixo de 10 mg.kg^{-1} , sendo essa queda significativa (Tukey $p < 0.0001$) quando comparada ao solo sem tratamento (IC = 99 %) atingindo valores de percentual de remoção superiores a 80 % (Fig. 54 B). Desta forma, o HPA antraceno apresentou uma tendência a ser eliminado mais rápido do ambiente, em tratamentos utilizando apenas a planta *Medicago sativa L.* como ferramenta de remediação.

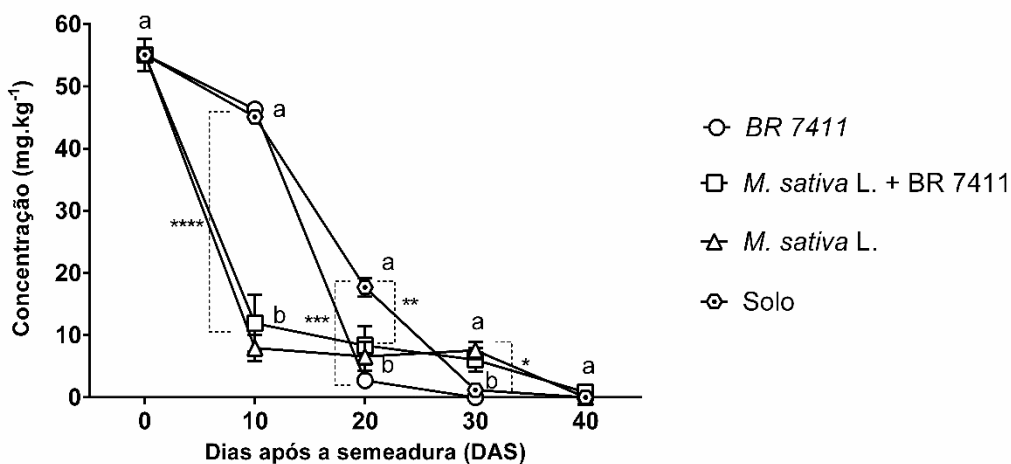
Quanto ao monitoramento da concentração de pireno em solos contaminados com 150 ppm de HPA total, a ação sinérgica entre *Medicago sativa L.* e a cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* mostrou-se mais eficiente que a ação isolada dos tratamentos de fitorremediação ("*Medicago sativa L.*") e biorremediação ("BR 7411") até os primeiros 10 DAS, reduzindo as concentrações de pireno abaixo de 20 mg.kg^{-1} em 10 DAS (Fig. 53 C), apresentando valores médios de percentual de remoção de pireno em torno de 70 % e gradativamente até atingir a faixa de 10 mg.kg^{-1} ao final dos 40 DAS, com percentuais de remoção de pireno acima de 80 % (Fig. 54 C) (Tukey, $p < 0.0001$). Para solos cultivados apenas com *Medicago sativa L.* ou tratados apenas com o inóculo de BR 7411, a diminuição da concentração permaneceu a mesma, não havendo diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tukey $p < 0.0001$) para os primeiros 10 DAS (Fig. 53 C), contudo, ambos tratamentos apresentaram-se eficazes na redução da concentração de pireno atingindo a faixa de 32 mg.kg^{-1} nos primeiros 10 DAS (Com percentuais de remoção de pireno em torno de 40 %), cerca de 10 mg.kg^{-1} em 20 DAS (Com percentuais de remoção superiores a 70 %) e abaixo de 10 mg.kg^{-1} nos tempos de 30 DAS e oscilando entre 10 e próximo de 0 mg.kg^{-1} ao final do experimento em 40 DAS (com percentuais de remoção superiores a 80 %),

sendo essas diferenças significativas, quando comparadas aos tratamentos controle (somente o solo) (Tukey $p < 0.0001$) (Fig. 54 C). Desta forma, o HPA pireno apresentou uma tendência a ser eliminado do ambiente com mais facilidade, utilizando consórcios entre a planta *Medicago sativa* L. e a cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, como ferramenta de remediação.

A) Concentração de fenantreno em solo contaminado com 150 ppm de HPA total



B) Concentração de antraceno em solo contaminado com 150 ppm de HPA total



C) Concentração de pireno em solo contaminado com 150 ppm de HPA total

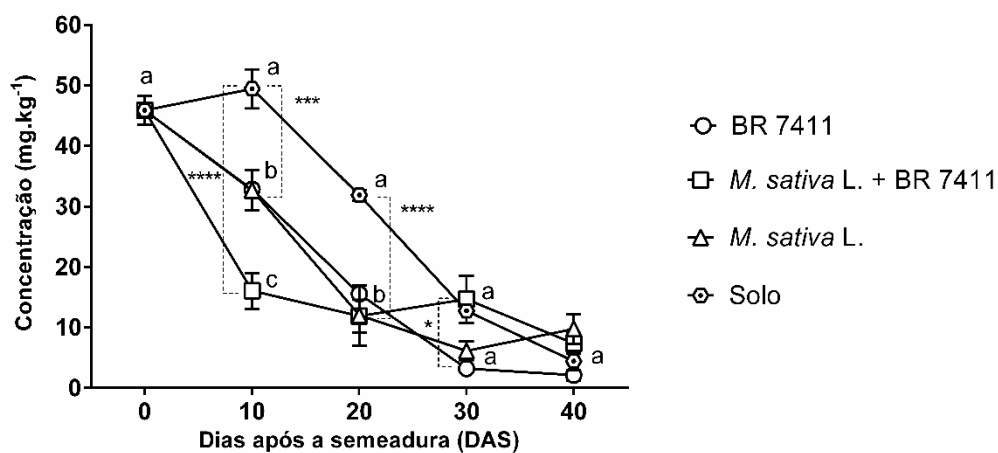
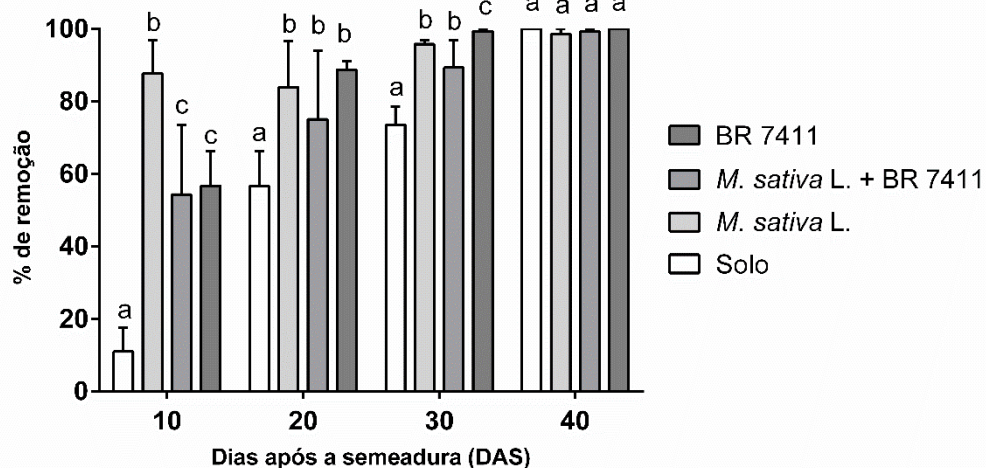
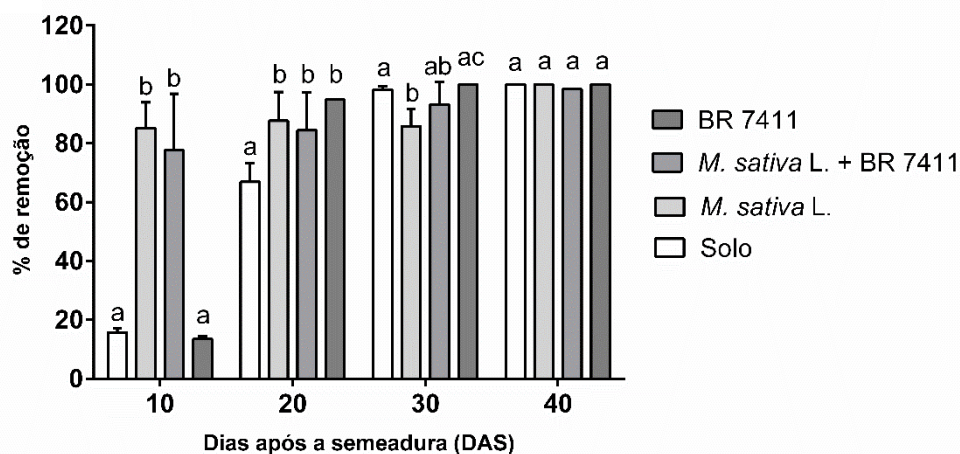


Figura 53. Concentração fenantreno (A) antraceno (B) e pireno (C) em solos contaminados com 150 ppm de HPA total (50 ppm de cada HPA) por 40 DAS. Cada curva representa a concentração de HPA (mg.kg⁻¹) dos tratamentos Solos (○) *Medicago sativa L.* (△) *Medicago sativa L.* + BR 7411 (□) BR 7411 (◊) ao longo de 40 DAS. Cada ponto representa a média e \pm desvio das concentrações de HPA em cinco amostras de solo (quintuplicata biológica). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as séries para cada tratamento. A análise estatística foi feita por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$) (intervalo de confiança IC: ****=99,9 % ***= 99 % **= 95 % * = 90 %).

A) Percentual de remoção de 50 ppm de fenantreno



B) Percentual de remoção de 50 ppm de antraceno



C) Percentual de remoção de 50 ppm de pireno

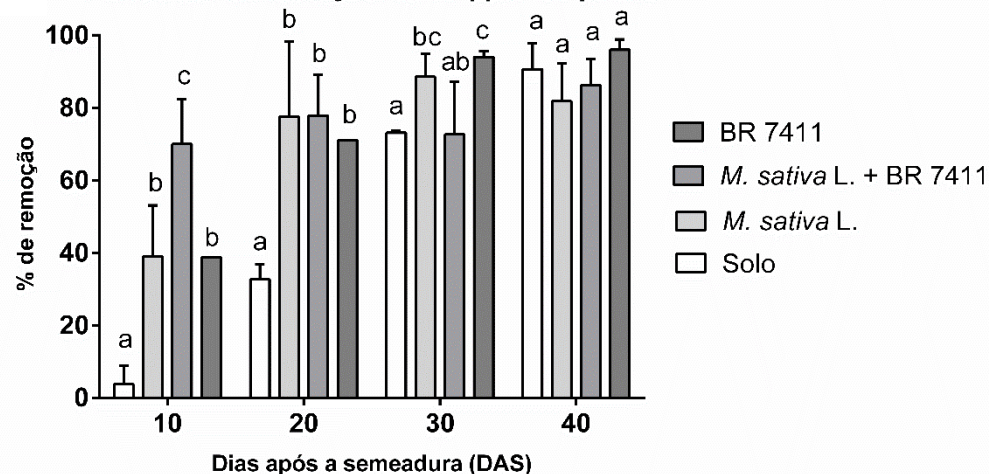


Figura 54. Percentual de remoção de fenantreno (A) antraceno (B) e pireno (C) em solos contaminados com 150 ppm de HPA total (50 ppm de cada HPA) por 40 DAS. Cada barra representa percentual de remoção de HPA (mg.kg⁻¹) para os tratamentos: Solo, *Medicago sativa L.*, *Medicago sativa L.* + BR 7411 e BR 7411, ao longo de 40 DAS. Cada coluna representa a média e desvio padrão do percentual de remoção de dos HPA, em cinco amostras de solo (quintuplicata biológica). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as séries para cada tratamento. A análise estatística foi feita por ANOVA *two way* seguido de Tukey ($p < 0.0001$).

5.13. Potencial de fitorremediação e biorremediação em solos contaminados com 300 ppm de HPA total

Os dados foram obtidos pelo monitoramento das concentrações de HPA em solos contaminados com 300 ppm de HPA total, cultivados e não cultivados com *Medicago sativa L.*, na presença e ausência da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, nos intervalos de tempo de 0, 10, 20, 30 e 40 DAS.

Como resultado, para o monitoramento das concentrações de fenantreno (Fig. 55 A) antraceno (Fig. 55 B) e pireno (Fig. 55 C) em solos contaminados com 300 ppm de HPA total, é possível observar que os tratamentos em sua maioria apresentaram resultados eficientes na diminuição da concentração dos HPA, sendo mais visível, para todos os tratamentos, a partir de 20 DAS. Com o aumento da concentração dos contaminantes, a diminuição da concentração dos HPA se dá de forma mais atenuada, se comparada aos ensaios com apenas 150 ppm de HPA total (Fig. 55 A-C).

Para resultados referentes a concentração de fenantreno (Fig. 55 A) a utilização do tratamento de fitorremediação de *Medicago sativa L.* (na ausência de BR 7411) promoveu a maior redução na concentração deste HPA para os primeiros 10 DAS, assim como nos ensaios em concentrações de 150 ppm, atingindo valores específicos abaixo de 40 mg.kg⁻¹ de fenantreno no solo, sendo uma queda significativa (Tukey $p < 0.0001$), quando comparada com o solo sem tratamento (IC = 99,9 %) e quando comparado com os tratamentos contendo a cepa BR 7411, na ausência ou presença de *Medicago sativa L.* (IC = 99 %), atingindo percentuais de remoção de fenantreno oscilando em torno de 60 % para os primeiros 10 DAS e atingindo valores próximos a 90 % ao final do experimento em 40 DAS (Fig. 56 A).

Para o monitoramento das concentração de fenantreno em tratamentos contendo o inóculo da cepa BR 7411, não houve diferença significativa para o tratamento "*M.sativa L.* + BR 7411" comparado com o solo contendo nenhum tratamento ao longo de 40 DAS, quanto o tratamento "BR 7411" diferenças significativas, são observadas a partir de 30 DAS chegando a valores próximos de 0 mg.kg⁻¹, (IC = 90 %) e percentuais de remoção de fenantreno superiores a 90 % (Tukey $p < 0.0001$) (Fig. 55 e 56 A).

Desta forma, tal qual nos tratamentos de 150 ppm de HPA total, em solos contendo fenantreno em tratamentos de 300 ppm de HPA total, observamos uma tendência ao fenantreno ser eliminado mais rápido do ambiente, no tempo de 10 DAS, em tratamentos cujo uso isolado da planta *Medicago sativa L.*, como ferramenta de remediação, fora adotado. Levando em conta que o uso isolado da cepa BR 7411 também foi eficaz para remover mais de 90 % do contaminante em 30 DAS.

Para os resultados referentes ao monitoramento da concentração de antraceno (Fig. 55 B) em solos contaminados com 300 ppm de HPA total, o uso isolado da planta *Medicago sativa L.* apresentou-se mais eficiente na queda da concentração de antraceno nos primeiros 10 DAS contudo, atingindo valores próximos a 50 mg.kg⁻¹ de antraceno, equivalente a percentuais de 50 % de remoção de antraceno. Contudo estes valores não apresentaram diferença significativa (Tukey $p < 0.0001$) quando comparado como os outros tratamentos. A ação isolada da bactéria *Ensifer meliloti*, e a utilização do consórcio *Medicago sativa L.* + BR 7411 promoveu a diminuição da concentração do antraceno valores em torno de 75 mg.kg⁻¹, sendo uma queda significativa em relação ao solo com ausência de tratamento (Tukey $p < 0.0001$) (Fig. 56 B), onde nesse intervalo de tempo, atinge percentuais médios de remoção médios entre 20 % a 25 % para o tempo de 10 DAS (Fig. 56 B).

Contudo, aos 20 DAS, o tratamento *Medicago sativa L.* + BR 7411 proporcionou a diminuição das concentrações de antraceno para valores abaixo de 25 mg.kg⁻¹, representando um percentual de remoção médio de 80 %, valor este atingido para a atenuação natural do antraceno em 40 DAS sem a utilização de tratamentos, removendo esse HPA na metade do tempo (Fig. 55 B). Comparado com os valores obtidos o solo sem tratamento, a concentração de antraceno no tempo de 20 DAS apresentou diferenças significativas, com intervalos de confiança (IC) de 99 % (Tukey $p < 0.0001$). Durante os últimos dias do experimento, a utilização dos tratamentos alcançou valores próximos a 10 mg.kg⁻¹ sendo os tratamentos com a cepa BR 7411 e *Medicago sativa L.* + BR 7411, os que proporcionaram valores médios de percentual de remoção mais próximos de 90 % (Tukey $p < 0.0001$). Desta forma, o HPA antraceno apresentou uma tendência a ser eliminado mais rápido do ambiente, em tratamentos utilizando apenas a planta *Medicago sativa L.* como ferramenta de remediação, mas

de forma lenta, os tratamentos contendo a cepa BR 7411 apresentaram percentuais de remoção médios mais elevados ao final do experimento, em 40 DAS.

Quanto ao monitoramento da concentração de pireno em solos contaminados com 150 ppm de HPA total, a ação sinérgica entre *Medicago sativa L.* e a cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* mostrou-se mais eficiente que a ação isolada dos tratamentos de fitorremediação ("*Medicago sativa L.*") e biorremediação ("BR 7411") até os primeiros 10 DAS, sendo este perfil observado também nos resultados referentes aos solos contaminados com 150 ppm de HPA total, reduzindo as concentrações de pireno abaixo de 50 mg.kg⁻¹ em 10 DAS (Fig. 55 C), apresentando valores de percentual de remoção médios de pireno em torno de 45 % e gradativamente até atingir a faixa de 30 mg.kg⁻¹ ao final dos 40 DAS, com percentuais de remoção de pireno acima de 65 % (Fig. 56 C) (Tukey, $p < 0.0001$ %), sendo o máximo de remoção para esse tratamento. É possível destacar que este foi o único tratamento que proporcionou a redução dos valores da concentração de pireno, no tempo de 10 DAS, onde ambos os tratamentos de remediação, que utilizam a planta e a bactéria isoladamente, não apresentaram diferença significativa nas concentrações de pireno, quando comparados com o solo contaminado na ausência de tratamento (Tukey, $p < 0.0001$ %) (IC = 99,9 %).

Para solos cultivados apenas com *Medicago sativa L.* ou tratados apenas com o inóculo de BR 7411, a diminuição da concentração permaneceu a mesma, não havendo diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tukey $p < 0.0001$) para os primeiros 10 DAS (Fig. 55 C) (Tukey, $p < 0.0001$ %) (IC = 99,9 %), contudo, também não apresentaram diferença significativa nas concentrações de pireno, quando comparados com o solo contaminado na ausência de tratamento, mostrando um percentual de redução de menos de 5 % (Tukey, $p < 0.0001$ %) (IC = 99,9 %) (Fig. 56 C).

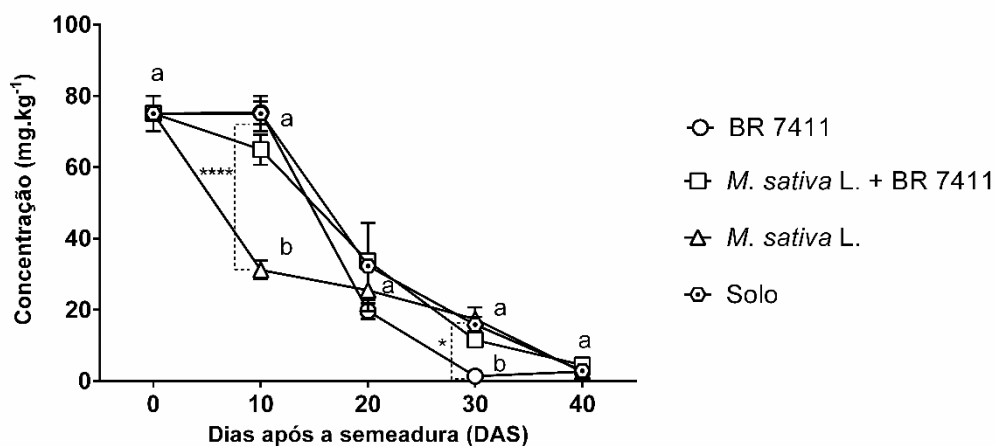
Para o tempo de 20 DAS, os tratamentos envolvendo o uso da planta e da bactéria (tanto em consórcio, como isoladamente) atingiram um perfil similar, não apresentando diferenças significativas entre si, mas ainda assim, promoveram a redução da concentração de pireno para valores em torno de 30 mg.kg⁻¹ (BR 7411 com IC = 99,9 %), e 35 mg.kg⁻¹ (*Medicago sativa L.* e *Medicago sativa L.* + BR 7411

com IC = 95 %) sendo estes valores significativamente diferentes quando comparados com a ausência de tratamento (Solo) (Tukey, $p < 0.0001$ %).

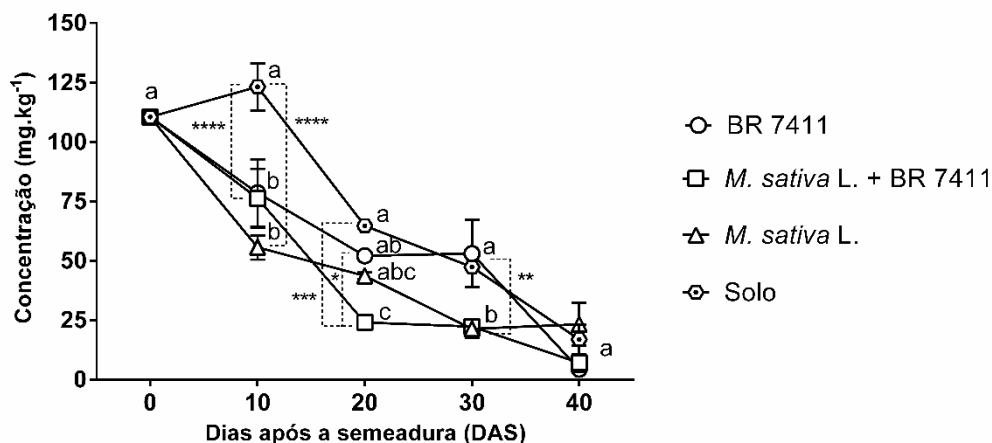
Ao final do experimento 40 DAS, os menores valores de concentração foram observados para o tratamento com BR 7411, isolado, atingindo valores próximos a 10 mg.kg^{-1} de pireno e indicando um percentual de remoção médio acima de 85 %.

Desta forma, o HPA pireno apresentou uma tendência a ser eliminado do ambiente com mais facilidade, utilizando consórcios entre a planta *Medicago sativa L.* e a Cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, como ferramenta de remediação, eliminando cerca de metade do pireno presente no solo contaminado em 10 dias.

A) Concentração de fenantreno em solo contaminado com 300 ppm de HPA total



B) Concentração de antraceno em solo contaminado com 300 ppm de HPA total



C) Concentração de pireno em solo contaminado com 300 ppm de HPA total

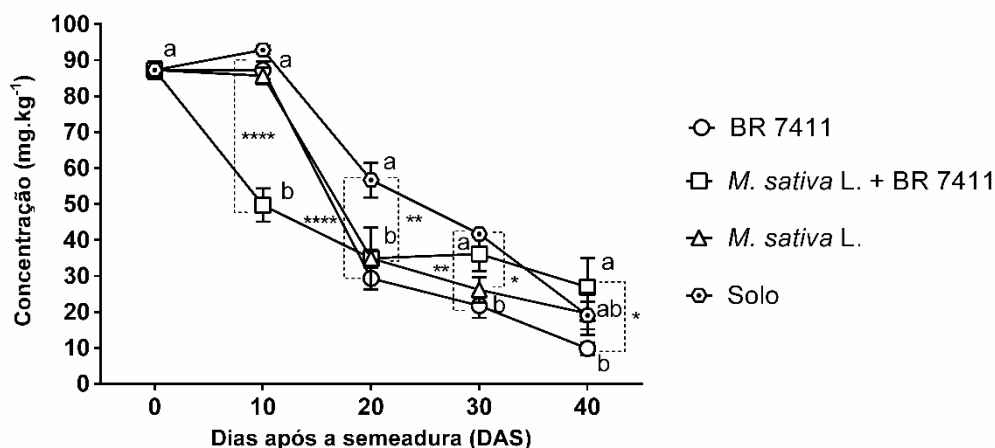
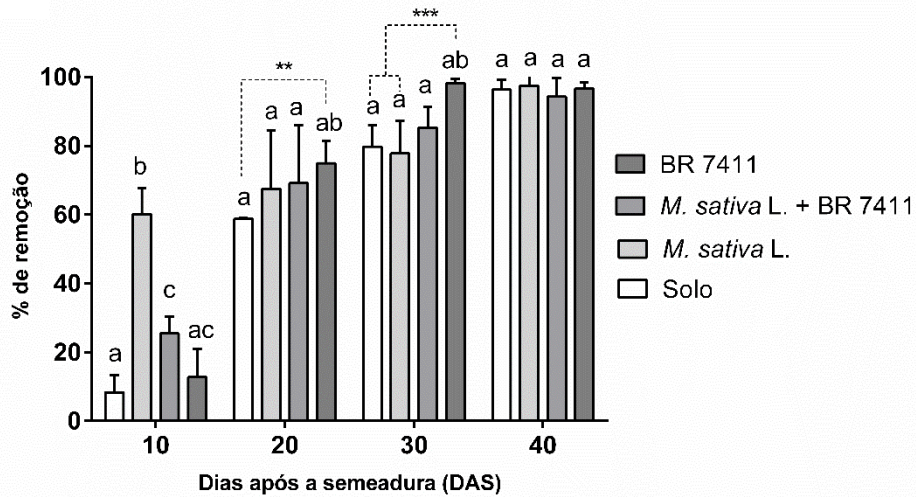
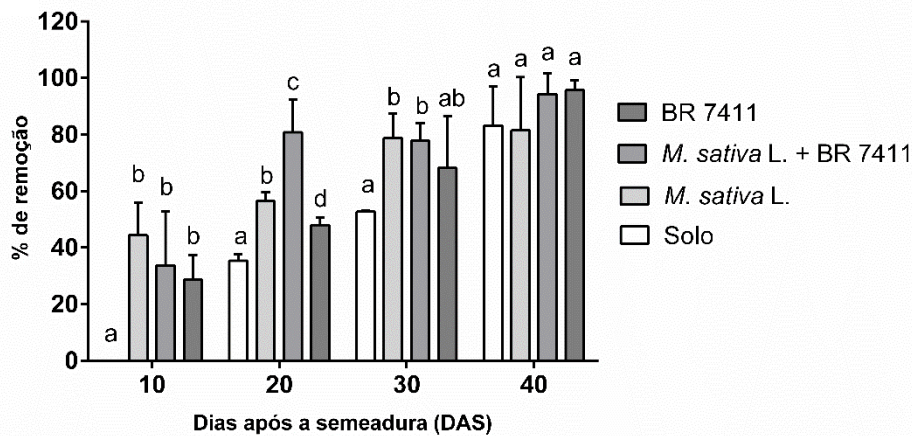


Figura 55. Concentração fenantreno (A) antraceno (B) e pireno (C) em solos contaminados com 300 ppm de HPA total (100 ppm de cada HPA) por 40 DAS. Cada curva representa a concentração de HPA (mg.kg^{-1}) dos tratamentos Solos (○) *Medicago sativa L.* (△) *Medicago sativa L.* + BR 7411 (□) BR 7411 (◊) ao longo de 40 DAS. Cada ponto representa a média e \pm desvio das concentrações de HPA em cinco amostras de solo (quintuplicata biológica). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as séries para cada tratamento. A análise estatística foi feita por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$) (intervalo de confiança IC: **** = 99,9 % *** = 99 % ** = 95 % * = 90 %).

A) Percentual de remoção de 100 ppm de fenantreno



B) Percentual de remoção de 100 ppm de antraceno



C) Percentual de remoção de 100 ppm de pireno

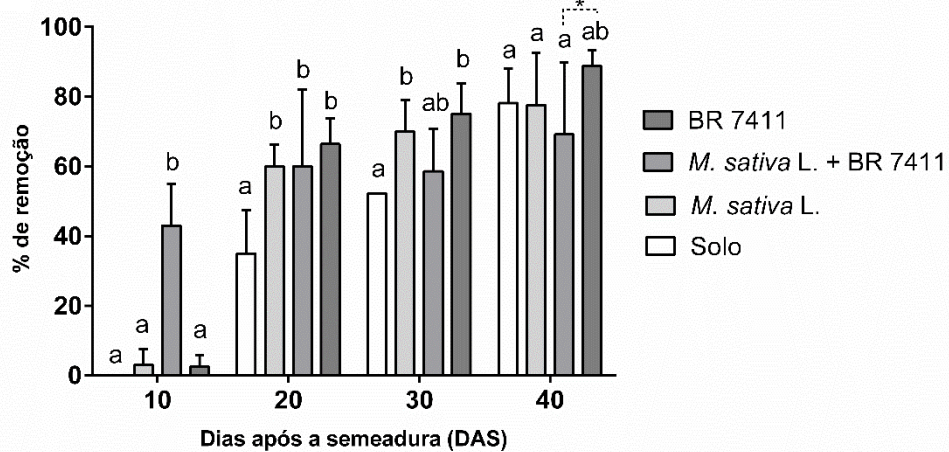


Figura 56. Percentual de remoção de fenantreno (A) antraceno (B) e pireno (C) em solos contaminados com 300 ppm de HPA total (100 ppm de cada HPA) por 40 DAS. Cada barra representa percentual de remoção de HPA (mg.kg⁻¹) para os tratamentos: Solo, *Medicago sativa L.*, *Medicago sativa L.* + BR 7411 e BR 7411, ao longo de 40 DAS. Cada coluna representa a média e desvio padrão do percentual de remoção de dos HPA, em cinco amostras de solo (quintuplicata biológica). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as séries para cada tratamento. A análise estatística foi feita por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$). (intervalo de confiança IC:* = 99 % ** = 95 % * = 90 %).**

5.14. Potencial de fitorremediação e biorremediação em solos contaminados com 450 ppm de HPA total.

Os dados foram obtidos pelo monitoramento das concentrações de HPA em solos contaminados com 450 ppm de HPA total, cultivados e não cultivados com *Medicago sativa L.*, na presença e ausência da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, nos intervalos de tempo de 0, 10, 20, 30 e 40 DAS.

Como resultado, para o monitoramento das concentrações de fenantreno (Fig. 57 A) antraceno (Fig. 57 B) e pireno (Fig. 57 C) em solos contaminados com 450 ppm de HPA total, é possível observar que os tratamentos apresentaram resultados eficientes na diminuição da concentração dos HPA, sendo mais visível, para todos os tratamentos, a partir de 20 DAS. Comparado com os tratamentos realizados em 150 ppm e 300 ppm, os HPA em solos contaminados com 450 ppm de HPA total foram mais recalcitrantes, principalmente para os HPA antraceno e pireno (Fig. 57 B e C), sendo evidente o impacto do uso dos tratamentos contendo a planta e a bactéria, para a remediação dos HPA (Fig. 57 A-C).

Para resultados referentes a concentração de fenantreno (Fig. 57 A) a utilização do tratamento de fitorremediação de *Medicago sativa L.* (na ausência de BR 7411) promoveu a maior redução na concentração deste HPA para os primeiros 10 DAS, assim como nos ensaios em concentrações de 150 e 300 ppm, atingindo valores específicos abaixo de 70 mg.kg^{-1} de fenantreno no solo, sendo uma queda significativa (Tukey $p < 0.0001$), quando comparada com o solo sem tratamento (IC = 99,9 %) e quando comparado com os tratamentos contendo a cepa BR 7411, na ausência ou presença de *Medicago sativa L.* (IC = 99 %), atingindo percentuais de remoção de fenantreno oscilando em torno de 45 % para os primeiros 10 DAS e atingindo valores próximos à 90 % ao final do experimento em 40 DAS (Fig. 58 A).

Para o monitoramento das concentração de fenantreno, não houve diferença significativa para o tratamento "*M.sativa L.* + BR 7411" comparado com o solo contendo nenhum tratamento ao longo de 40 DAS, exceto para o intervalo de 30 DAS, onde os valores de concentração de fenantreno atingiram a casa dos 30 mg.kg^{-1} , (IC = 90 %) e percentual de remoção em torno de 70 % (Tukey $p < 0.0001$) (Fig. 58 A). Contudo, o uso da cepa BR 7411 de forma isolada promoveu os mesmo valores

atingidos pelo tratamento “*M.sativa* L. + BR 7411” 10 dias antes, no tempo de 20 DAS, e atingindo aos 30 DAS valores de concentração abaixo de 10 mg.kg⁻¹ de pireno e percentuais de remoção maiores que 90 % , sendo estes resultados significativos quando comparados com os demais tratamentos (Tukey p < 0.0001) (Fig. 58 A). Desta forma, tal qual nos tratamentos de 150 ppm e 300 ppm de HPA total, em solos contendo fenantreno em tratamentos de 450 ppm de HPA total, observamos uma tendência ao fenantreno ser eliminado mais rápido do ambiente, no tempo de 10 DAS, em tratamentos cujo uso isolado da planta *Medicago sativa* L., como ferramenta de remediação, fora adotado. Mas a longo prazo, o uso isolado da cepa BR 7411 foi mais eficaz para remover o fenantreno, onde os percentuais de remoção da cepa, comparados com os percentuais de remoção em solos sem tratamento, apresentaram uma diferença de cerca de 40 % a mais de remoção para o tratamento com a cepa BR 7411, para o tempo de 30 DAS.

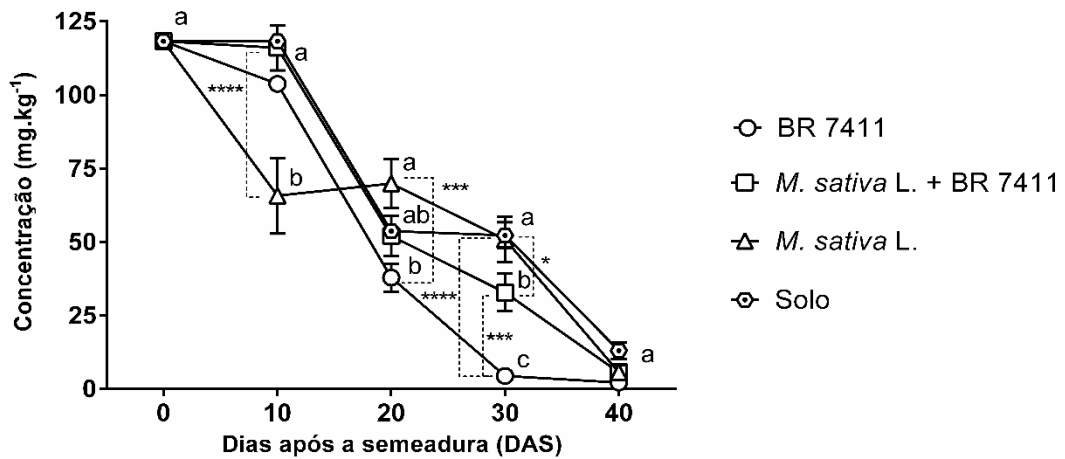
Para os resultados referentes ao monitoramento da concentração de antraceno (Fig. 57 B), de todos ensaios estudados, foi o único a apresentar a ausência de atenuação natural do antraceno, indicando a característica recalcitrante desse HPA, mantendo a concentração oscilando em torno de 150 ppm até o final do experimento. Quanto aos tratamentos, solos cultivados com *Medicago sativa* L. com e sem a presença da cepa BR 7411, apresentaram perfis similares (Tukey p < 0.0001) de queda da concentração de HPA ao longo de 40 DAS, destacando o tempo de 20 DAS onde é possível observar concentrações entre 80 a 100 mg.kg⁻¹ de antraceno, apresentando diferença significativa (Tukey p < 0.0001) quando comparado aos tratamentos controle (contendo valores próximos a concentração inicial de 150 mg.kg⁻¹ de antraceno), sendo estes valores equivalentes a percentuais de remoção de 40 a 50 % (Fig. 58 B). Contudo, embora apresentem perfis similares, durante 20, 30 e 40 DAS, as concentrações de antraceno tenderam a ser menores nos tratamentos cujo consórcio planta x bactéria, fora empregado (Fig. 57 B). A ação isolada da cepa BR 7411 promoveu a diminuição da concentração do antraceno valores em torno de 100 mg.kg⁻¹, durante os primeiros 10 DAS e 20 DAS, culminando em valores próximos de 25 % durante 30 DAS e abaixo de 25 mg.kg⁻¹ em 40 DAS, sendo uma queda significativa em relação ao solo com ausência de tratamento (Tukey p < 0.0001) em todos os pontos (Fig. 57 B), onde nesse intervalo de tempo, atinge percentuais médios de remoção entre 40 % para os tempos de 10 e 20 DAS e 90 a 95 % para os tempos

de 30 e 40 DAS (Fig. 58 B). A partir de 30 DAS, os solos contendo apenas a cepa BR 7411, apresentaram valores de antraceno menores do que os tratamentos envolvendo a presença da planta *Medicago sativa L.* (Tukey $p < 0.0001$), promovendo assim, uma remoção mais eficiente do antraceno em tratamentos cuja bactéria *Ensifer meliloti* esteja presente.

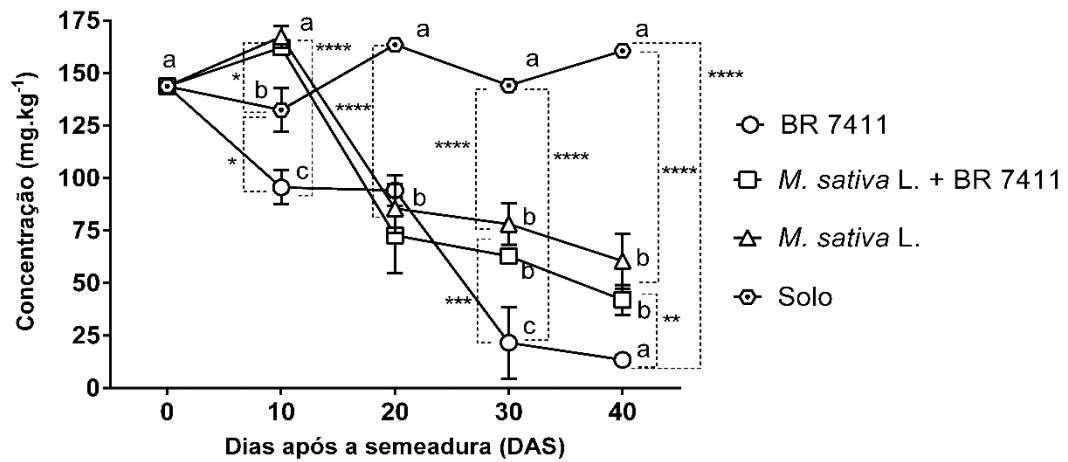
Quanto ao monitoramento da concentração de pireno em solos contaminados com 450 ppm de HPA total, a ação Isolada da Cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* mostrou-se mais eficiente que os tratamentos envolvendo o uso de *Medicago sativa L.* nos primeiros 20 DAS sendo esse perfil observado até o final do experimento (40 DAS), sendo este perfil diferente do observado nos resultados referentes aos solos contaminados com 150 e 300 ppm de HPA total, onde o consórcio planta e bactéria apresentaram-se mais eficientes em 10 DAS quando comparados aos demais tratamentos. Sendo assim, os solos na presença de BR 7411 apresentaram redução nas concentrações de pireno para valores de 50 mg.kg^{-1} em 20 DAS (Fig. 57 C), apresentando valores de percentual de remoção médios de pireno em torno de 60 % e gradativamente até atingir a faixa de 20 mg.kg^{-1} ao final dos 40 DAS, com percentuais de remoção de pireno acima de 80 % (Fig. 57 C) (Tukey, $p < 0.0001$), sendo o máximo de remoção para esse tratamento.

Para solos cultivados com *Medicago sativa L.* com ou sem o inóculo de BR 7411, a diminuição da concentração permaneceu a mesma, não havendo diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tukey $p < 0.0001$) durante os 40 DAS (Fig. 57 C) (Tukey, $p < 0.0001$ %), contudo, é possível observar uma tendência a concentrações menores de pireno, em solos cujo consórcio planta x bactéria fora empregado. Embora não apresentem diferenças significativas entre si, os tratamentos envolvendo a participação da planta *Medicago sativa L.* foram capazes de reduzir a concentração de pireno para valores em torno de 50 mg.kg^{-1} ao final de 40 DAS apresentando diferença significativa quando comparado ao solo sem tratamento (Tukey, $p < 0.0001$) atingindo percentuais de remoção entre 60 e 70 % ao final de 40 DAS (Fig. 58 C). Desta forma, o HPA pireno na concentração de 150 ppm, apresentou uma tendência a ser eliminado do ambiente com mais facilidade, utilizando a Cepa BR 7411, como ferramenta de remediação, eliminando mais da metade do pireno presente no solo contaminado em 20 dias.

A) Concentração de fenantreno em solo contaminado com 450 ppm de HPA total



B) Concentração de antraceno em solo contaminado com 450 ppm de HPA total



C) Concentração de pireno em solo contaminado com 450 ppm de HPA total

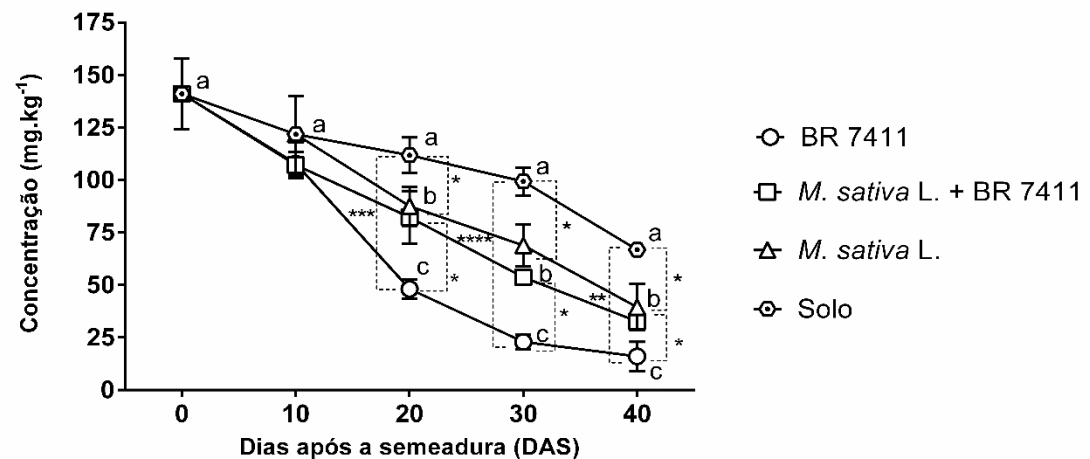


Figura 57. Concentração fenantreno (A) antraceno (B) e pireno (C) em solos contaminados com 450 ppm de HPA total (150 ppm de cada HPA) por 40 DAS. Cada curva representa a concentração de HPA (mg.kg^{-1}) dos tratamentos Solo (○) *Medicago sativa L.* (△) *Medicago sativa L.* + BR 7411 (□) BR 7411 (◇) ao longo de 40 DAS. Cada ponto representa a média e \pm desvio das concentrações de HPA em cinco amostras de solo (quintuplicata biológica). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as séries para cada tratamento. A análise estatística foi feita por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$) (intervalo de confiança: **** = 99,9 % *** = 99 % ** = 95 % * = 90 %).

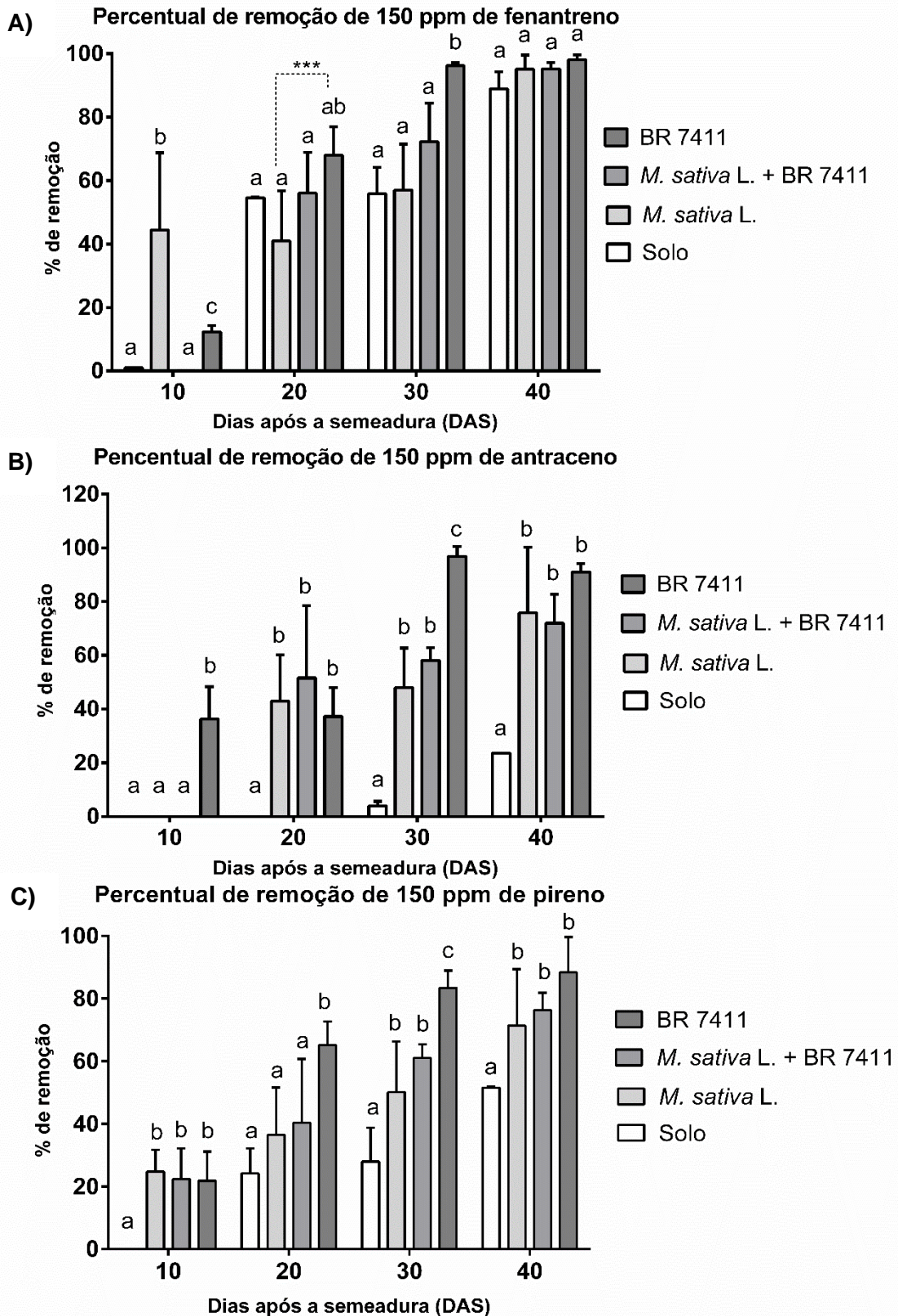


Figura 58. Percentual de remoção de fenantreno (A) antraceno (B) e pireno (C) em solos contaminados com 450 ppm de HPA total (150 ppm de cada HPA) por 40 DAS. Cada barra representa percentual de remoção de HPA (mg.kg^{-1}) para os tratamentos: Solo, *Medicago sativa L.*, *Medicago sativa L.* + BR 7411 e BR 7411, ao longo de 40 DAS. Cada coluna representa a média e desvio padrão do percentual de remoção de dos HPA, em cinco amostras de solo (quintuplicata biológica). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as séries para cada tratamento. A análise estatística foi feita por ANOVA two way seguido de Tukey ($p < 0.0001$). (intervalo de confiança:* = 99 %).**

5.15. Análise proteômica de *Medicago sativa L.* em solos contaminados com HPA

Os resultados a seguir foram obtidos através da análise de amostras de tecido vegetal pertencente as partes aéreas de *Medicago sativa L.* na presença e ausência da cepa BR 7411, cultivadas em solo contaminado com 300 ppm de HPA. O tempo de 20 DAS foi escolhido por ser um ponto intermediário do experimento, onde era possível obter material vegetal suficiente para a análise proteômica e também, foi possível observar potenciais de fitorremediação satisfatórios, obtidos pelos percentuais de remoção oscilando entre 60 e 80 % para os três HPA estudados, como também, diferenças entre a biomassa e biometria de *Medicago sativa L.*, envolvendo os tratamentos com e sem a cepa BR 7411. Os demais tecidos vegetais (raízes e partes aéreas) de plantas cultivadas na presença e ausência de HPA (nas três concentrações estudadas), coletados em todos os pontos, seguem guardados em freezer - 80 °C para futuras análises.

5.16. Extração de proteínas com Tris-Mg/NP-40 e depleção de RuBisCO com Sulfato de Protamina - Identificação de proteínas pouco abundantes (*Low Abundant Proteins* – LAPs)

Para averiguar a eficácia do método de extração de proteínas, amostras de tecido vegetal tiveram suas proteínas extraídas e analisadas por SDS-PAGE 15 %, para cada etapa do método de extração usando o tampão Tris-Mg/NP-40 e seguido das etapas de depleção com sulfato de protamina. Como resultado, foi possível observar as corridas de primeira e segunda extrações contendo as proteínas solúveis em tampão Tris-Mg/NP-40, sendo essas duas etapas suficientes para a extração das proteínas, vide a ausência de proteínas extraídas e detectadas pelo comassie na eletroforese de amostras obtidas a partir do *debris* celular, sendo esses extratos (1º e 2º) somados e formando um *pool* protéico a ser utilizado nas análises posteriores de depleção de RuBisCO (Fig. 59).

Como resultado da etapa de depleção de RuBisCO, utilizando sulfato de protamina, foi possível observar o extrato de contendo a RuBisCO depletada, evidenciando o aumento das bandas de 55 e 15 kDa (kilodalton), correspondentes as subunidades maior (LSU) e menor (SSU) da RuBisCO, respectivamente, e a ausência dessas bandas em amostras contendo as proteínas de pouca abundância (*Low*

Abundant Proteins – LAPs) e em contra partida, o aumento da intensidade de várias bandas protéicas nas faixas de 45 a 20 kDa e acima de 60 kDa, indicando assim a eficácia na remoção da RuBisCO dos extratos protéicos de *Medicago sativa L.* e o enriquecimento das proteínas pouco abundantes (Fig. 59).

Etapas da depleção de RuBisCO e enriquecimento das proteínas baixa abundância (Low Abundant Proteins - LAPs)

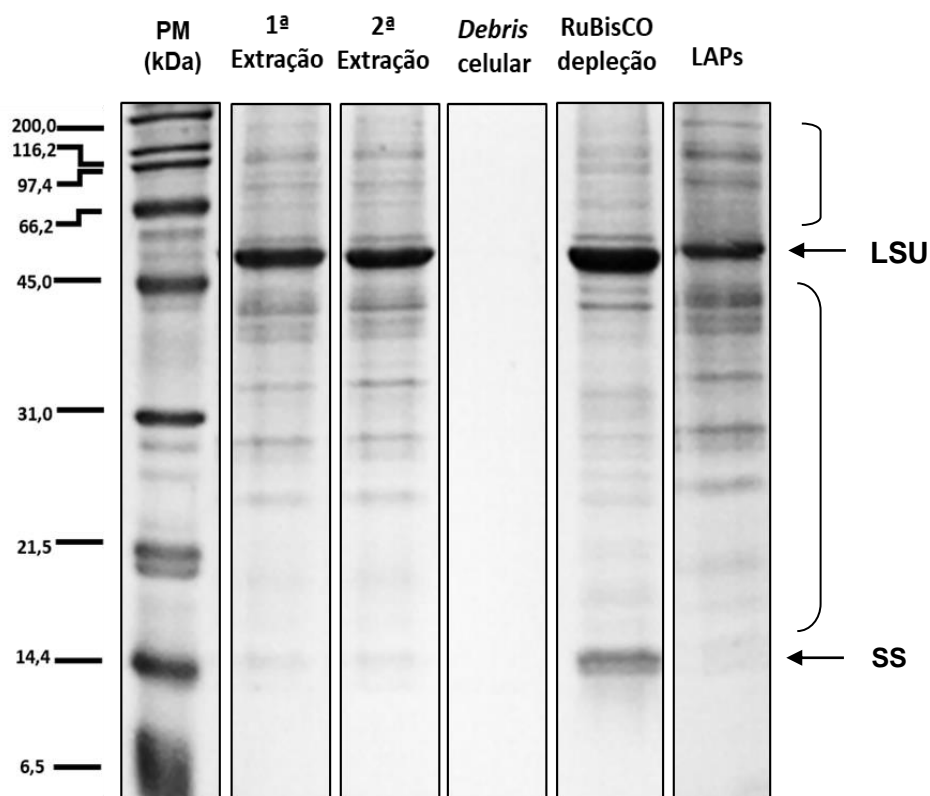
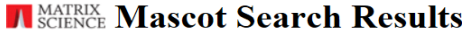


Figura 59. SDS-PAGE – 15 % das proteínas obtidas nas etapas do método de extração de proteínas com Tris-Mg/NP-40 e depleção de RuBisCO com sulfato de protamina para a identificação de proteínas pouco abundantes (*Low Abundant Proteins* – LAPs). Cada poço contém 30 µg de proteínas (com exceção da amostra de debris celular, ao qual não apresentou concentração de proteínas detectável pelo método de Bradford). Detalhe (setas) para as regiões de 55 kDa (LSU- subunidade maior da RuBisCO) e 15 kDa (SSU- subunidade menor da RuBisCO) nas amostras de depleção de RuBisCO, onde é possível observar aumento da intensidade dessas bandas indicando depletadas e majoritárias na amostra. As chaves, indicando as regiões acima de 60 kDa e entre 45 e 20 kDa, é possível observar o aumento da intensidade das bandas em amostras de LAPs, indicando o enriquecimento das proteínas pouco abundantes (LAPs), quando comparado com os demais poços.

Para certificar de que a RuBisCO fora depletada dos extratos das LAPs, foi feita a hidrólise tríplica (*in gel*) das bandas correspondentes as regiões de 55 e 15 kDa e submetidas a espectrometria de massas (ESI-Q-TOF) e como resultado, não foi possível detectar peptídeos trípticos pertencentes a RuBisCO, em abundância suficiente para a identificação da presença das subunidades da RuBisCO em extratos de LAPs, comprovando assim a eficácia do método de extração e depleção da RuBisCO, além do enriquecimento das LAPs. As proteínas identificadas após a depleção e a ausência das subunidades maior e menor da RuBisCO podem ser observadas na interface da ferramenta *Matrix Science – Mascot Search – MS/MS ion Search* na figura 60.

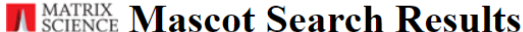


Mascot Search Results

User : Wilber
 Email : Wilber.sa@hotmail.com
 Search title : Laps 2
 MS data file : 20170707_AV_Wilber_L2_CID.pk1
 Database 1 : contaminants 20090624 (262 sequences; 133770 residues)
 Database 2 : NCBIprot 20171205 (139213787 sequences; 51013024959 residues)
 Taxonomy 2 : Viridiplantae (Green Plants) (5774714 sequences)
 Timestamp : 11 Mar 2018 at 15:31:55 GMT
 Protein hits :

2::P10933.1	RecName: Full=Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic; Short=FNR; Flags: Precursor
2::GAU22613.1	hypothetical protein TSUD_234350 [Trifolium subterraneum]
1::00220327.3	Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
2::XP_013446435.1	photosystem II oxygen-evolving enhancer protein [Medicago truncatula]
2::EF28587.1	ferredoxin--NADP reductase, putative [Ricinus communis]
2::XP_021604215.1	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic [Manihot esculenta]
2::XP_007156158.1	hypothetical protein PHAVU_003G263200g [Phaseolus vulgaris]
2::XP_007157909.1	hypothetical protein PHAVU_002G108000g [Phaseolus vulgaris]
1::00009865.2	Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10
2::XP_021275213.1	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic [Herrania umbratica]
1::00021304.1	Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
2::GAU12965.1	hypothetical protein TSUD_191560 [Trifolium subterraneum]
2::XP_006393807.1	hypothetical protein EUTSA_v10004465mg [Eutrema salsugineum]
2::XP_017427945.1	PREDICTED: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic [Vigna angularis]
2::XP_010679926.1	PREDICTED: ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic [Beta vulgaris subsp. vulgaris]
1::00019359.3	Tax_Id=9606 Gene_Symbol=KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
2::ART94496.1	ferredoxin--NADP(+) reductase [Mentha x piperita]
2::CAD30025.1	ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase (plasmid) [Triticum aestivum]
2::NP_001308345.1	oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic [Solanum lycopersicum]
2::AFK43771.1	unknown [Lotus japonicus]

A) Com a depleção de RuBisCO



Mascot Search Results

User : Wilber de Sousa Alves
 Email : Wilber.sa@hotmail.com
 Search title : NCBI taxonomia W 18
 MS data file : 20130227_ana_wilber_18_CID.pk1
 Database : NCBIInr 20130303 (23463169 sequences; 8064228071 residues)
 Taxonomy : Viridiplantae (Green Plants) (1197003 sequences)
 Timestamp : 7 Mar 2013 at 03:14:10 GMT
 Protein hits :

gi 1223773	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit [Medicago sativa]
gi 153012229	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Medicago truncatula]
gi 159161168	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Ceratophyllum demersum]
gi 2509654	RecName: Full=Ribulose biphosphate carboxylase large chain; Short=RuBisCO large subunit
gi 237636940	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Cladococcus selaginoides]
gi 7240134	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Bretschneidera sinensis]
gi 27448097	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Zippelia begoniifolia]
gi 1817558	ribulase-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Ceratophyllum demersum]
gi 22795475	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Apodytes dimidiata]
gi 7240258	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase [Helwingia japonica]

B) Sem a depleção de RuBisCO

Figura 60. Eficácia do método de depleção de RuBisCO com sulfato de protamina - Interface de busca de amostras de proteínas depletadas (LAPs), obtidas no *Matrix Science – Mascot Search – MS/MS ion Search*. Destaque para a diminuição na abundância de RuBisCO na amostra, sendo essa condição ausente em amostras vegetais comuns, por ser a RuBisCO proteína mais abundante nas plantas, onde a maioria dos rits seriam identificados como RuBisCO (B – típica busca feita em amostras não depletadas). A ausência dessa de RuBisCO permitiu a identificação das demais proteínas que estavam em baixa abundância na amostra, enriquecidas na etapa de depleção da RuBisCO (A - LAPs). Traços de RuBisCO ainda são encontradas em amostras LAPs, porém com poucos peptídeos identificados e baixa abundância.

5.17. Análise dos perfis protéicos de partes aéreas de *Medicago sativa L.* cultivadas em solos contaminado com 300 ppm de HPA na presença e ausência da Cepa BR 7411.

Após estabelecer a metodologia para extração de proteínas e depleção de RuBisCO, partes aéreas de *Medicago sativa L.* foram submetidas a etapa de extração de proteínas seguida de depleção da RuBisCO e enriquecimento das proteínas pouco abundantes (LAPs) e seus perfis protéicos estudados.

Como resultado, os perfis protéicos das LAPs foram obtidos com sucesso e os mesmos apresentaram diferenças quanto ao número de bandas e também intensidade. Observando o perfil protéico das amostras de plantas controles sem o inóculo bacteriano, com plantas cultivadas na presença de 300 ppm de HPA sem inóculo bacteriano, é possível perceber um aumento na intensidade das bandas em regiões acima de 20 kDa, indicando que proteínas presentes nessa extensa faixa se apresentaram diferencialmente expressas quando na presença dos HPA. Quando a faixa de proteínas de menor peso molecular (abaixo de 20 kDa) é possível observar um aumento significativo das bandas pertencentes a amostras de plantas cultivadas na presença do contaminante, sendo essas proteínas indicadas como possíveis candidatas a serem LAPs do tipo PRF (Proteínas Relacionadas a Fitorremediação). Esses resultados por sua vez, indicam a mudança visível do proteoma das plantas de *Medicago sativa L.* quando na presença dos HPA (Fig. 61).

Quanto ao perfil protéico das LAPs de plantas sob influência da cepa BR 7411, podemos observar as banda que apresentam alterações sutis em determinadas regiões, sendo as mais evidentes as bandas pertencentes a faixa entre 14,4 kDa e 21,5 kDa, em plantas cuja presença dos HPA contribuem para o aumento da intensidade de uma banda (seta 2) (Fig. 61) logo abaixo de uma segunda banda mais difusa (seta 1), próximo aos 20 kDa, que também se faz presente em amostras controle, contudo, esta banda apresenta sua intensidade mais elevada em amostras na presença de BR 7411, sendo aparentemente ausente nas amostras controle sem BR 7411 e com intensidade reduzida em amostras cultivadas na presença do contaminante (Fig 61).

Quando comparadas as corridas, é possível concluir que na região contendo as LAPs de menor peso molecular, é a região onde encontramos as maiores

diferenças em resposta aos tratamentos com a cepa BR 7411 e com os contaminantes, destacando as bandas (seta 2) (Fig. 61) como sendo um conjunto de proteínas com maior probabilidade de serem LAPs do tipo PRF, vide estarem presentes principalmente em amostras contendo HPA (independente da administração dos inóculos de BR 7411), e o aumento da intensidade das bandas (seta 1 e 3) (Fig. 61) em amostras cuja administração da cepa BR 7411 fora efetuada.

Quando analisamos as duas variáveis de estudo (cepa BR 7411 e presença do contaminante) é possível observar o aumento da expressão dessas 3 bandas como também um aumento sutil da intensidade das bandas protéicas de uma forma global em todo o perfil protéico, quando comparado com as demais condições.

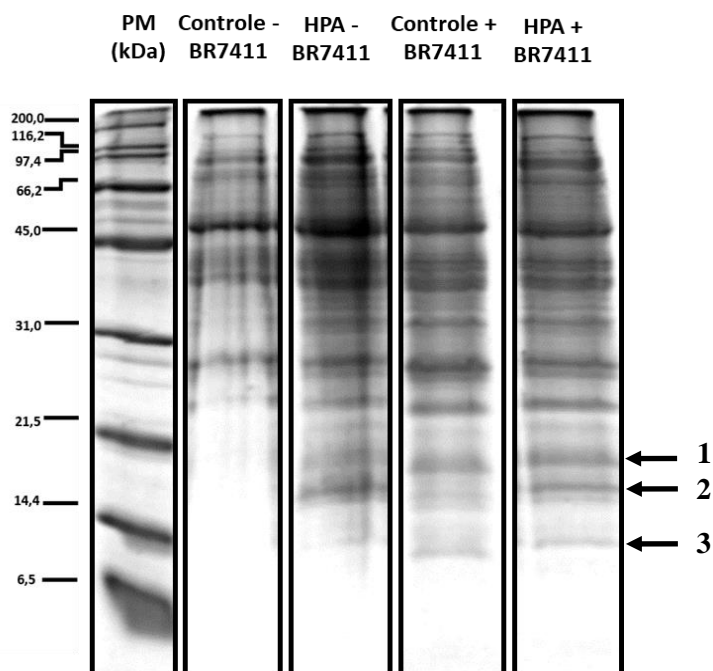


Figura 61. SDS-PAGE15 % de proteínas pouco abundantes (*Low Abundant Proteins* – LAPs) influência de BR 7411 no perfil protéico de plantas cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA total. Cada poço contém 30 µg de proteínas. Destaque para a mudança no perfil protéico dos tratamentos quando comparados ao controle sem a cepa BR 7411, mostrando aumento da intensidade das bandas indicadas pelas setas.

Quanto aos resultados pertencentes ao perfil protéico das proteínas depletadas na etapa de depleção da RuBisCO, é possível observar que majoritariamente toda a RuBisCO presente em todas as amostras fora depletada, vide presença das bandas características da RuBisCO no SDS-PAGE 15 %, destacando a banda mais intensa na região de 55 kDa (LSU), característica da subunidade maior da RuBisCO, e as bandas mais intensas perto de 15 kDa (SSU), representativas da subunidade menor

da RuBisCO. Contudo, o destaque principal pode ser visto no aumento significativo da intensidade da subunidade menor da RuBisCO, em resposta a presença dos 300 ppm de HPA total (Fig. 62).

Esse perfil tende a desaparecer em amostras contendo a RuBisCO depletada cujo extrato fora obtido de partes aéreas cultivados na presença do Inóculo da cepa BR 7411, sendo este perfil, muito similar ao controle, sem os contaminantes. O que indica uma possível diminuição da expressão da subunidade menor da RuBisCO, aos níveis normais, quando na presença de BR 7411. Concluindo assim, que a subunidade menor da RuBisCO apresentar-se-ia como uma possível PRF e que a presença da cepa BR 7411 poderia executar um papel de auxílio na remediação dos HPA, diminuindo assim a necessidade das plantas de expressar em maior quantidade as subunidades menores da RuBisCO (Fig. 62).

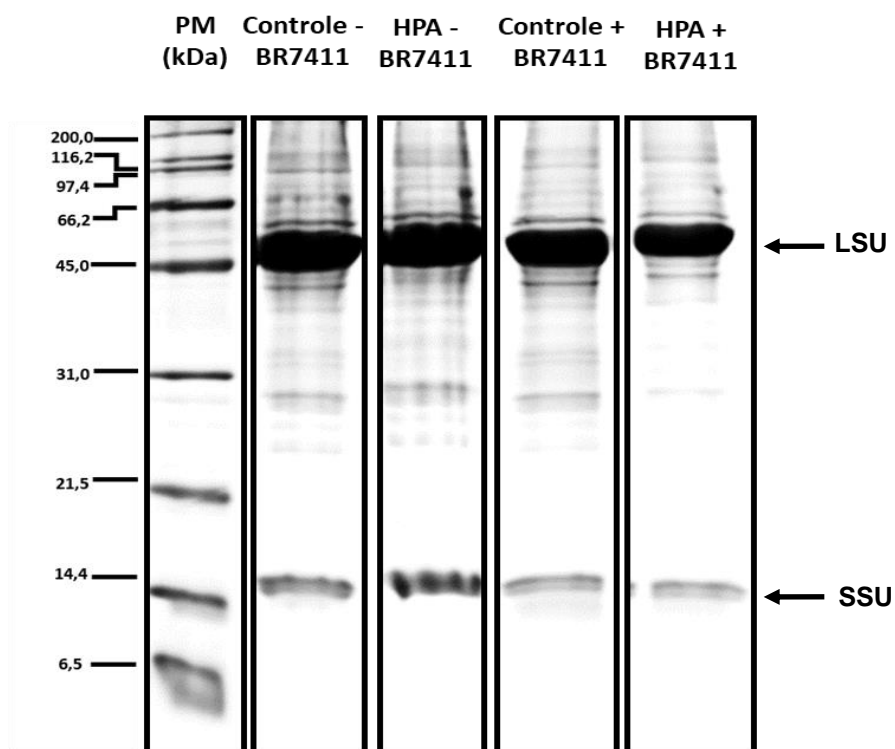


Figura 62. SDS-PAGE 15 % de RuBisCo com Sulfato de Protamina. influência de BR 7411 no perfil protéico de plantas cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA total. Cada poço contém 30 µg de proteínas. Detalhe (setas) para as regiões de 55 kDa (LSU - subunidade maior da RuBisCO) e 15 kDa (SSU - subunidade menor da RuBisCO) onde é possível observar aumento da intensidade dessas bandas indicando serem majoritárias na amostra. Destaque para aumento significativo da subunidade menor da RuBisCO em amostras cultivadas na presença de 300 ppm de HPA total, quando comparada com o controle sem BR 7411, e o impacto da cepa BR 7411 na diminuição desse aumento em HPA + BR 7411.

5.18. Análise proteômica *Shotgun (Label-free)* quantitativa das partes aéreas de *Medicago sativa L.* cultivadas na presença e na ausência de 300 ppm de HPA total.

Tendo em vista os resultados dos perfis protéicos das proteínas, para a análise de proteômica quantitativa, fora escolhido analisar primeiro a resposta dos HPA na planta *Medicago sativa L.*, sem a presença da variável “Cepa BR 7411”, tendo em vista a presença de mudanças significativas do perfil protéico da planta na presença do HPA, e também, do aumento da intensidade das bandas referentes a subunidade menor da RuBisCO presente em extratos de proteínas depletadas. As análises das proteínas pertencentes a amostras cultivadas na presença e ausência de HPA sob influência ou não da cepa BR 7411 serão realizadas em trabalhos futuros.

Para garantir a qualidade dos extratos protéicos, amostras das partes aéreas de plantas de *Medicago sativa L.* cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA foram submetidas a SDS-PAGE 15 %, em triplicata, gerando os perfis protéicos de amostras depletadas (RuBisCO) e amostras enriquecidas (LAPs). Como resultado, podemos observar que as amostras apresentaram perfis satisfatórios, e os padrões observados nas análises anteriores se fizeram presentes nas três réplicas, comprovando assim os fenômenos previamente observados, a seta apresenta aumento sutil das proteínas entre 14,4 e 21,5 kDa em amostras LAPs (Fig. 63).

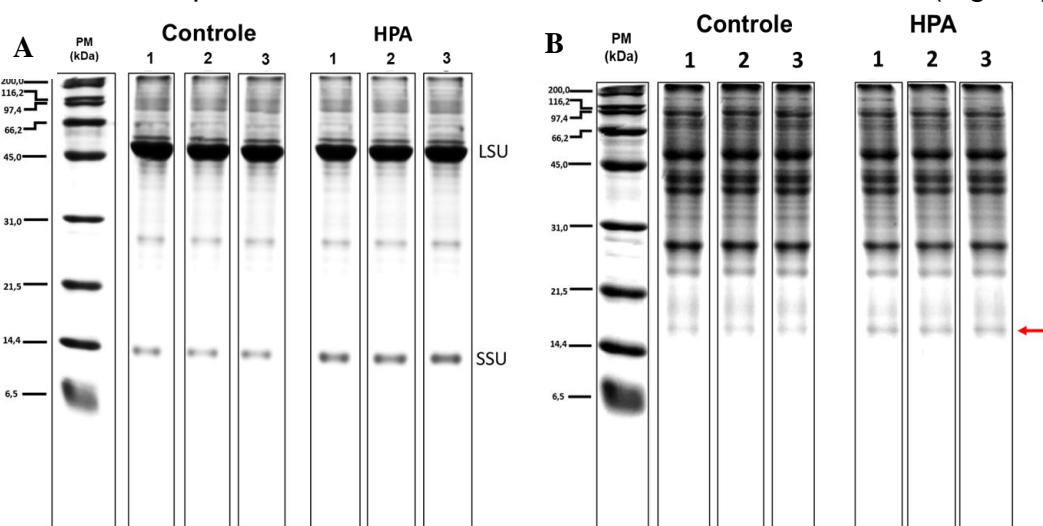


Figura 63. SDS-PAGE 15 % das partes aéreas de plantas de *Medicago sativa L.* Cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA. Análise feita em triplicata, para etapa de identificação de proteínas para proteômica quantitativa, cada amostra possui 30 µg de proteínas. **A)** perfis protéicos de amostras depletadas (RuBisCO). detalhe para as bandas de 55 kDa, contendo a subunidade maior da RuBisCO (LSU) e as bandas de em torno de 14 kDa conceto a subunidade menor da RuBisCO (SSU) **B)** perfis protéicos de amostras enriquecidas (proteínas pouco abundantes - LAPs), detalhe (seta) para aumento sutil das proteínas entre 14,4 e 21,5 kDa.

Após etapa de proteômica quantitativa feitas pelo Synapt e análise via Software *Progenesis Qi for Proteomics*, foram identificadas de 709 proteínas (Apêndice A), deste total, 282 proteínas foram mais expressas em amostras controle (*fold change* > 1.0), e 298 proteínas foram mais expressas em plantas cultivadas em solo contaminado com 300 ppm de HPA total (*fold change* > 1), e 129 proteínas não apresentaram diferenças na sua expressão protéica entre as duas condições.

Dentre as 709 proteínas, foi possível observar a presença de 42 proteínas diferencialmente expressas, com *fold change* > 2 entre as duas condições, sendo 24 proteínas identificadas em plantas cultivadas em solo contaminado com 300 ppm de HPA total como mais expressas nessa condição, e 18 proteínas identificadas como mais expressas em plantas controle. As listas de proteínas identificadas contendo os números de identificação do banco de dados do Uniprot, suas massas (kDa) e dados estatísticos (ANOVA, p-valor), como também sua ontologia, são apresentadas nas tabela 4 e 5. A abundância relativa de cada proteína foi calculada e apresentada nas figuras 64 e 65.

Tabela 4 - Proteínas identificadas em partes aéreas de *Medicago sativa* L. cultivadas em solo controle (*fold change* > 2)

Uniprot ID	Massa (kDa)	Anova (p)	Fold change	Proteínas	Organismo	Ontologia
B7FN10	15,153	5.24E-14	Infinity	Photosystem I subunit O	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
A0A072THL1	59,209	9.58E-07	11,67	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
G7KZ01	69,221	2.89E-08	11,59	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
G7IS33	46,719	0,000339	4,77	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Folding, classificação e degradação / degradação de RNA
G7K0Q7	29,461	2.38E-06	3,51	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
G7LIA0	97,619	1.11E-07	3,28	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo lipídico / Metabolismo do ácido linoléico
G7K0M1	45,124	3.91E-10	3,12	Fasciclin-like arabinogalactan protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Biogênese da parede celular secundária de plantas / Adesão celular
A0A072UYL1	45,974	2.40E-05	2,81	Mg-protoporphyrin IX chelatase (EC 6.6.1.1)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de co-fatores e vitaminas / Porfirina e Metabolismo da clorofila
A0A072TJV4	56,133	1.83E-07	2,59	Photosystem II CP47 reaction center protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
G7IP20	18,020	9.46E-09	2,44	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Maquinaria de Transcrição / Sistema RNA Polimerase II/ Complexo Mediador
G7JAR7	51,626	3.50E-07	2,42	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo energético / Metabolismo de aminoácidos
Q8VZX7	35,616	1.31E-08	2,32	1-aminocyclopropanecarboxylic acid oxidase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
A0A072TX81	53,692	8.67E-06	2,24	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.144)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de glutatona
A0A072U942	34,220	5.11E-10	2,09	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (EC 2.4.1.207)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Biogênese da parede celular / modificação da parede celular tipo planta envolvida no crescimento de células multicelulares / processo metabólico xiloglucano
G7KRX3	566,996	3.50E-07	2,08	Auxin transporter BIG	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Crescimento de células unidimensionais / Transportadores / Outros transportadores / Transportadores impulsionados por potencial eletroquímico
B7FFD4	24,864	5.10E-06	2,07	Glutamate 1-semialdehyde aminotransferase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de co-fatores e vitaminas / Porfirina e Metabolismo da clorofila
G7JWW6	41,197	8.59E-08	2,06	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar de nucleotídeo
A0A072TQ67	35,854	0,003186	2,04	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Metabolismo de Aminoácidos

Tabela 5 - Proteínas identificadas em partes aéreas de *Medicago sativa* L. cultivadas em solo contaminado com 300 ppm de HPA total (fold change > 2)

Uniprot ID	Massa kDa	Anova (p)	Fold change	Proteínas	Organismo	Ontologia
A0A072TG33	35,408	9.83E-08	76,48	Ion channel protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transporters / Transdução de sinal
A0A126TGR5	54,917	7.27E-06	41,93	ATP synthase subunit alpha	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Adaptação ambiental
G7JQ29	42,916	0,00030 4665	13,29	S-adenosylmethionine synthase (EC 2.5.1.6)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de metionina e cisteína
B7FLV3	36,376	2.66E-05	6,49	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (Vacuolar import/degradation, VID27-like protein (Medicago truncatula))	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Carcinogênese química / arilsulfotransferase / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Degradação de 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridina
A0A072VDU0	35,924	1.63E-08	5,18	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
A0A072TJ17	19,422	0,02700 7642	4,88	Aspartyl protease family protein, putative	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processos celulares / Crescimento celular e morte / Ciclo celular
B7FJ08	27,862	6.85E-08	4,57	ATP-binding ABC transporter	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transporte de Membranas / Transportadores ABC / Resistência a Medicamentos
I3SDP0	13,423	0.02933 5631	4,16	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (cold shock protein 2 (<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>))	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Respostas a estresses abióticos
G7J9R2	59,588	6.03E-05	3,53	Cytochrome P450 family protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Metabolismo de drogas / Metabolismo de lipídeos / Metabolismo de terpenóides e policetídeos
G7INA7	16,575	1.90E-09	3,34	ABA-responsive protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Transdução de sinal por hormônio vegetal
G7IPJ9	56,662	2.80E-09	3,13	Phospho-2-Dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (EC 2.5.1.54)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis / chorismate mutase
Q94IM3	16,830	1.36E-11	3,10	Class 10 PR protein	<i>Medicago sativa</i> L.	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico / Grande indução na presença de Acido salicílico
A0A072TRI7	27,942	4.74E-11	2,83	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de Nitrogênio
A0A072TRS0	26,567	2.61E-11	2,72	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Metabolismo de aminoácidos
G7L8F8	18,026	0.00310 7834	2,54	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transporter	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
G7JKF2	62,348	1.61E-05	2,30	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta (PPF) (EC 2.7.1.90)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Processamento de Informação Genética / Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal
I3T9P7	29,143	2.14E-10	2,26	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Resistência a medicamentos
B7FM98	19,457	0,12341 4586	2,23	Plant/F25P12-18 protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Organização da parede celular
Q94IM2	8,525	0,01883 2087	2,20	Pentameric polyubiquitin	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processo de modificação de proteína celular / Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina / ubiquitinação proteica envolvida no processo catabólico proteico dependente de ubiquitina
A0A060CS45	72,334	8.38E-08	2,17	Heat shock protein 70	<i>Medicago sativa</i> L.	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
Q8L6K8	16,592	0,00014 2639	2,09	Harvest-induced protein	<i>Medicago sativa</i> L.	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
Q1RSH3	61,168	3.06E-08	2,03	GroEL-like chaperone, ATPase (TCP-1/cpn60 chaperonin family protein)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Degradação de RNA
A0A072V4P8	45,544	4.71E-10	2,01	Extracellular dermal glycoprotein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
Q945R2	11,915	7.24E-10	2,00	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (EC 4.1.1.39) (Fragment)	<i>Medicago sativa</i> L.	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotossíntese

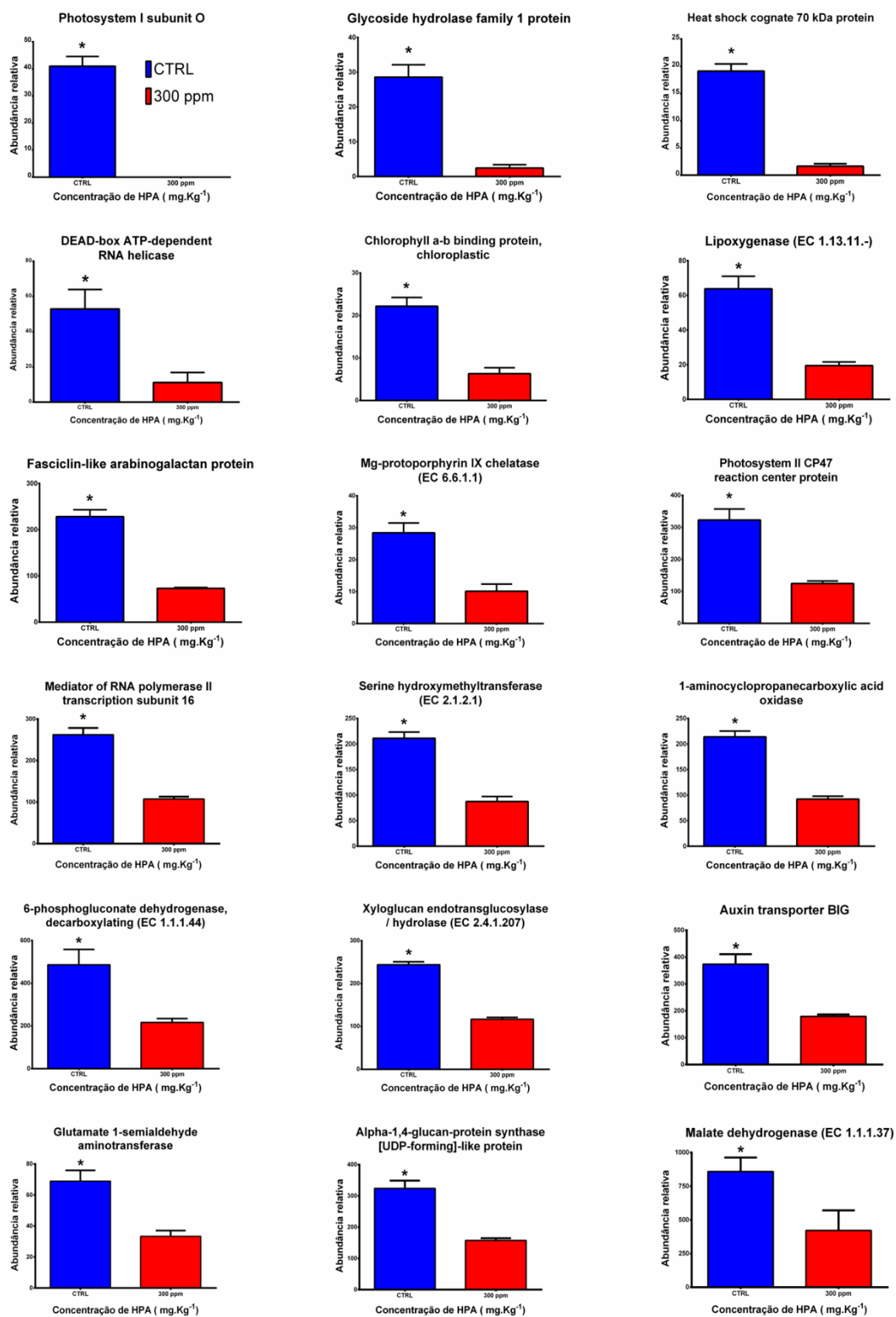


Figura 64. Gráficos da abundância relativa das proteínas mais expressas no controle (*Fold change* > 2). Estrelas indicam diferença significativa por teste t de student com $p < 0.0001$.

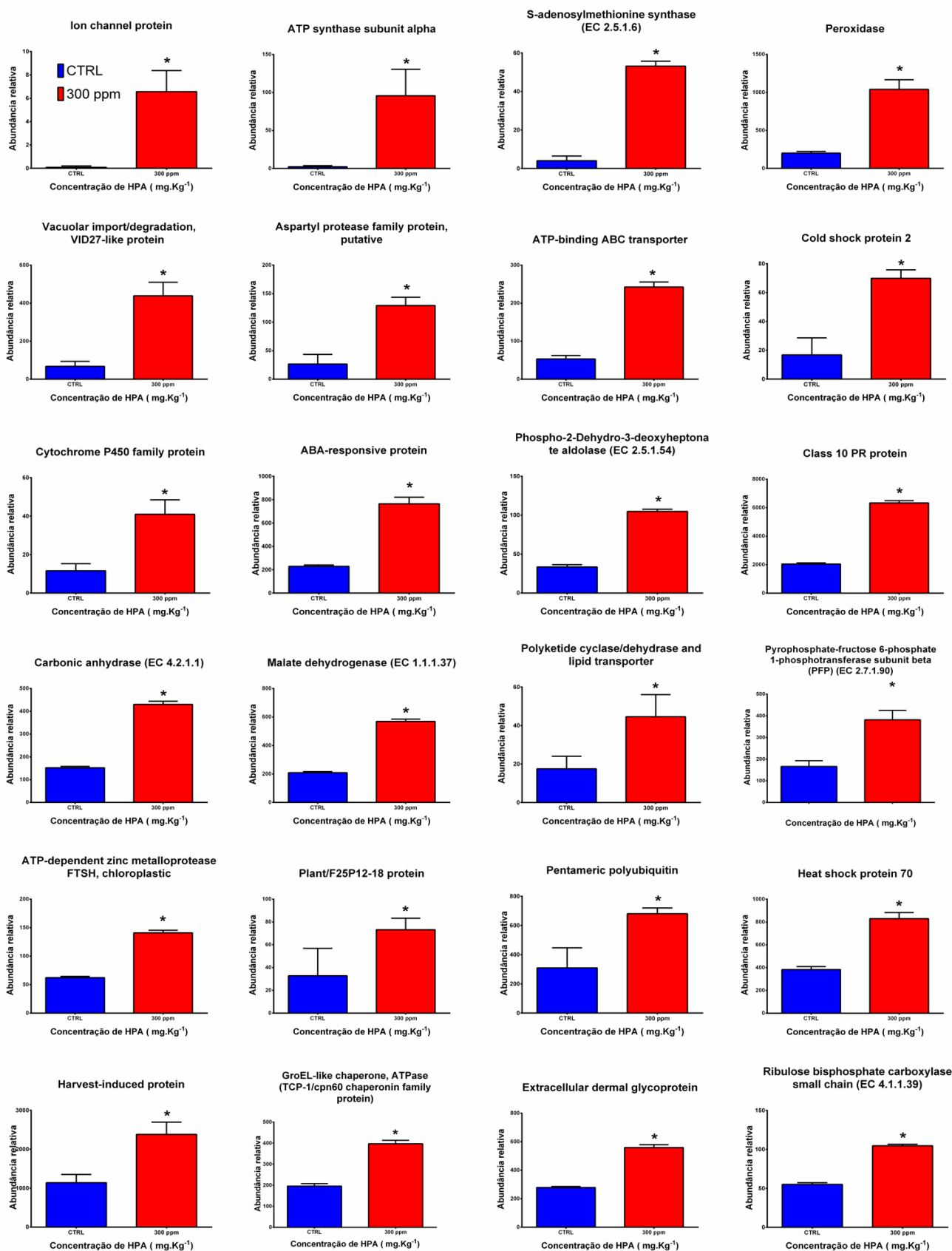


Figura 65. Gráficos da abundância relativa das proteínas mais expressas em 300 ppm de HPA Total (*Fold change* > 2). Estrelas indicam diferença significativa por teste t de Student com $p < 0.0001$.

5.19. Classificação das funções biológicas das proteínas identificadas em *Medicago sativa* L. cultivadas em solo controle e contaminado com HPA

No gráfico de classificação funcional das proteínas identificadas em *Medicago sativa* L. cultivadas em solo controle e contaminado com HPA (Fig. 66) podemos observar diferenças no perfil de classificação funcional dessas proteínas, com a presença de proteínas contendo a função de “Metabolismo e biodegradação de xenobióticos”, sendo essa função ausente nas proteínas mais expressas no controle e presente para o conjunto de proteínas mais expressas em 300 ppm de HPA total, de forma majoritária.

Outras diferenças também foram observadas, como o aumento do número de proteínas mais expressas em 300 ppm de HPA total, para as categorias funcionais de metabolismo dos carboidratos, processamento da informação genética, metabolismo de lipídico, biossíntese de metabólitos secundários, crescimento celular e morte e fatores de tradução, como também, o destaque para o aumento do número de proteínas com as funções de transporte e catabolismo, resposta ao estresse e metabolismo e resistência a drogas, como as funções, que junto com a função de metabolismo e biodegradação de xenobióticos, são as funções que contêm o aumento mais significativo no número de proteínas mais expressas em 300 ppm de HPA total, quando comparadas com amostras mais expressas no controle. Contudo, proteínas cuja função está relacionada a metabolismo energético e fotossíntese, foram as mais afetadas pela presença dos HPA, sendo mais abundantes em amostras cultivadas em solo controle, quando comparadas com proteínas advindas de amostras de alfafa cultivadas em solo contaminado.

Analizando a distribuição do percentual de proteínas por função biológica, as proteínas mais expressas em amostras controle cujas funções foram metabolismo energético e fotossíntese, apresentaram correspondem a 19,14 % e 9,81 % do total de proteínas identificadas no controle, sendo valores mais elevados do que os obtidos para as amostras de 300 ppm de HPA total, que obtiveram percentuais de 15,95 % (M. energético) e 5,39 % (Fotossíntese) (Fig. 67 A). As proteínas mais expressas em amostras 300 ppm de HPA total, cujas funções de transporte e catabolismo, resposta ao estresse, metabolismo e resistência a drogas e biodegradação e metabolismo dos xenobióticos, apresentaram percentuais de 8,41 %, 3,88 % , 2,16 % e 1,94 %

respectivamente, sendo os três primeiros percentuais mais elevados do que os obtidos para amostras mais expressas no controle, onde os percentuais foram de 6,46 % (Transporte e catabolismo) 0,72 % (Resposta ao estresse) 2,16 % (Metabolismo e resistência a drogas) e 0 % (Biodegradação e metabolismo dos xenobióticos) (Fig. 67

B)

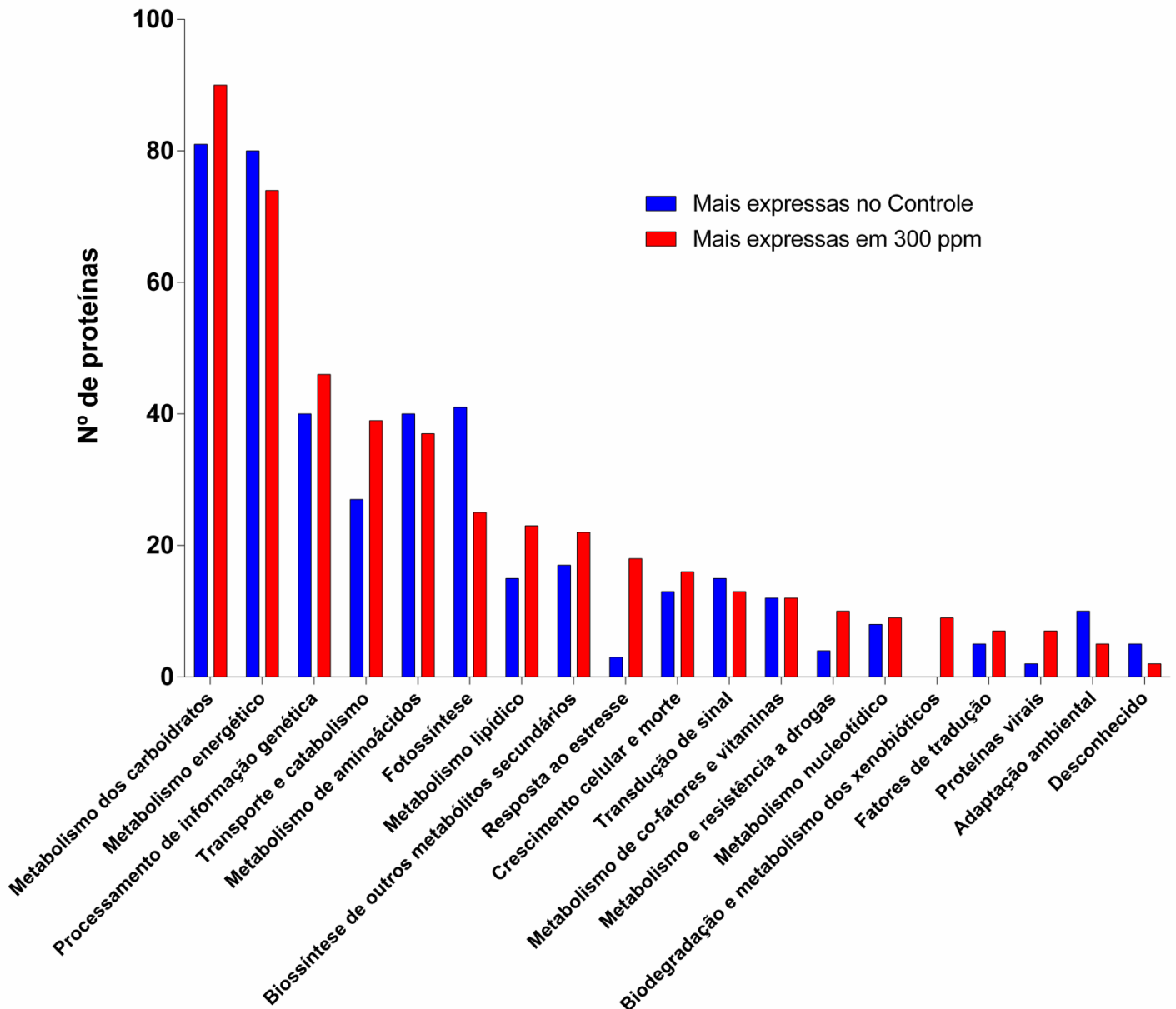


Figura 66. Classificação funcional, baseada no KEGG, para as proteínas identificadas em amostras de tecido aéreo de *Medicago sativa* L cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA total. O gráfico apresenta as proteínas identificadas em plantas cultivadas em solo contaminado e controle, agrupadas em 19 categorias.

Distribuição do percentual de proteínas de *Medicago sativa L.* por função biológica.

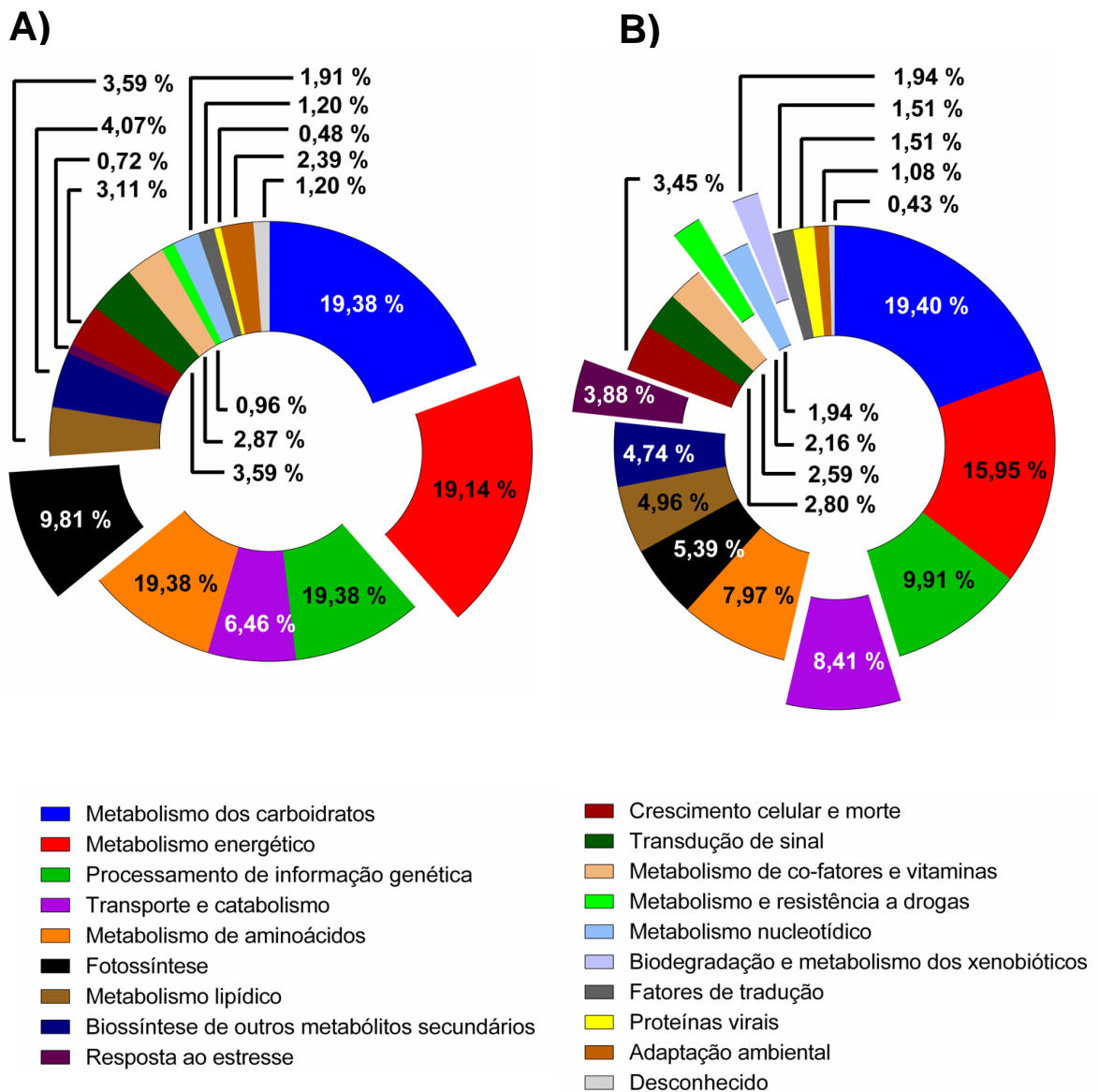


Figura 67. Gráficos com distribuição do percentual de proteínas por função biológica baseada no KEGG. A) Proteínas mais expressas em amostras controle, destaque em seções “tipo explosão” para os percentuais de proteínas identificadas para as funções de metabolismo energético (19,14 %) e fotossíntese (9,81 %). Destaque também para a ausência de proteínas com a função de biodegradação e metabolismo de xenobióticos. **B)** Proteínas mais expressas em amostras 300 ppm de HPA total, destaque em seções “tipo explosão” para os percentuais de proteínas identificadas para as funções de Transporte e catabolismo (8,41 %), resposta ao estresse (3,88 %), Metabolismo e resistência a drogas (2,16 %) e biodegradação e metabolismo dos xenobióticos (1,94 %).

5.20. Identificação de Proteínas Relacionadas a Fitorremediação (PRF) em *Medicago sativa L.* cultivadas em solos contaminados com HPA e suas interações.

Dentre as proteínas identificadas em plantas cultivadas em solo contaminado, 54 proteínas apresentaram potencial para serem candidatas a PRF, sendo estas

proteínas pertencentes as funções de transporte e catabolismo, resposta ao estresse, metabolismo e resistência a drogas e biodegradação e metabolismo dos xenobióticos, tendo como critério de escolha os percentuais de distribuição das proteínas em amostras de solo contaminado com 300 ppm, como também sua própria ontologia, e além dessas proteínas, como possíveis candidatas a PRF, foram incluídas as demais proteínas diferencialmente expressas e identificadas em amostras de solo contaminado com 300 ppm contendo *fold change* > 2 (Tabela 7).

Para determinar o grau de interação entre as 54 proteínas escolhidas, foi utilizada a ferramenta “STRING: *functional protein association networks*”. As interações foram feitas discriminando as proteínas de acordo com processos biológicos ao qual participam (Fig. 68), suas funções moleculares (Fig. 69) e os componentes celulares onde podem ser encontradas (Fig. 70), sendo esses dados obtidos de acordo com o Gene Ontology (GO), destacando também as proteínas com *fold change* > 2 (estrela) das demais proteínas identificadas. A lista contendo as candidatas a PRFs é apresentada na tabela, as proteínas presentes na rede de interações podem ser identificadas através da coluna String (Gene) presente na tabela 7, contendo o código dos genes correspondentes para cada proteína estudada.

Como resultado, podemos observar que a rede formada pelas proteínas escolhidas apresentou 47 nós, obtendo assim significativamente mais interações do que o esperado pela ferramenta utilizada, sendo o número esperado de interações igual a 24 e o obtido experimentalmente igual a 67 interações, valor esse 2,8 vezes maior que o esperado. Isso significa que as proteínas analisadas apresentaram mais interações entre si do que o esperado para um conjunto aleatório de proteínas de tamanho similar, extraídas do genoma. Tal enriquecimento indicou que as proteínas estão pelo menos parcialmente biologicamente ligadas como um grupo, sendo o p-valor de enriquecimento de PPI equivalente a $7.57e^{-13}$. Além disso, dentre as 24 proteínas com *fold change* > 2, 14 proteínas foram capazes de interagir com uma ou mais proteínas na rede. A espessura das interações é um indicativo da confiança da interação de forma diretamente proporcional (quanto maior / menor a espessura maior / menor a confiança da interação) (Fig 68 – 70).

Dentro da rede de interação, os principais processos biológicos que podemos destacar foram a “resposta a produtos químicos”, contendo 20 proteínas identificadas

e anotadas para esse processo ($FDR = 2,56e^{-7}$), resposta a “estímulos abióticos” contendo 16 proteínas ($FDR = 4,38e^{-7}$) e “resposta ao estresse” com 19 proteínas identificadas ($FDR = 3,59e^{-6}$) (Fig. 68). Dentre as funções moleculares, destacamos a participação de 20 proteínas diretamente relacionadas com a “ligação de compostos orgânicos cíclicos e/ou heterocíclicos” ($FDR = 0,00253$), como também a identificação de 12 proteínas anotadas para a função molecular de atividade “oxidoreductase” ($FDR = 8,46e^{-6}$) (Fig. 69). Quanto a localização celular dessas proteínas, podemos observar para a análise dos componentes celulares, indicou que a maioria das proteínas identificadas são majoritariamente presentes em “cloroplastos” (15 proteínas), no “citosol” (13 proteínas) e proteínas presentes em “membranas”, sendo essas membranas pretencentes principalmente a “vacúolos” (6 Proteínas) e também a própria “membrana celular” (19 Proteínas) (Fig. 70).

As proteínas identificadas foram analisadas a partir do CBI taxonomy Id de número 3702, vide a baixa cobertura dos outros bancos de leguminosas presentes na ferramenta, sendo necessário utilizar proteínas anotadas para a planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Apenas uma proteína da tabela não foi analisada, a “*Serine-glyoxylate aminotransferase-like protein*” pertencente a função de “transporte e catabolismo”, pois não foi encontrada no banco de dados, para a taxonomia utilizada na busca.

Tabela 7. Possíveis candidatas a Proteínas Relacionadas a Fitorremediação (PRFs).

BIODEGRADAÇÃO E METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS					
Uniprot ID	String (Gene)	Massa (kDa)	Anova (p)	Fold change	Proteínas
B7FLV3	AT3G19240	36,376	2.66E-05	6,49	Vacuolar import/degradation, VID27-like protein
G7J9R2	CYP714A2	59,588	6.03E-05	3,53	Cytochrome P450 family protein
I3T307	HOT5	40,689	0.000219381	1,16	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (EC 1.1.1.284)
I3S0L8	AT3G28670	33,916	0.000786236	1,16	Zinc-binding dehydrogenase family oxidoreductase
G7KZG9	AT1G79470	53,986	0.003486912	1,13	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMP dehydrogenase) (IMPD) (IMPDH) (EC 1.1.1.205)
A0A072TWL0	NDPK1	16,461	0.000107517	1,12	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)
I3SCB2	HOT5	41,010	0.212480958	1,06	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (EC 1.1.1.284)
A0A072TS46	AT3G28670	40,941	0.002637681	1,06	Zinc-binding dehydrogenase family oxidoreductase

B7FMP6	NDPK1	25,559	0.031673791	1,03	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)
TRANSPORTE E CATABOLISMO					
Uniprot ID	String (Gene)	Massa (kDa)	Anova (p)	Fold change	Proteínas
B7FK04	CSD1	21,221	6.83E-08	1,41	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)
I3SM45	AT3G26380	16,590	0.00014176	1,28	Alpha-galactosidase
G7J421	TUA2	49,554	7.47E-06	1,26	Tubulin alpha chain
B7FM77	AlaAT1	57,953	7.62E-07	1,23	Alanine aminotransferase
A0A072V4P4	CAT	49,248	5.69E-08	1,22	Catalase (EC 1.11.1.6)
I3T435	PKT3	16,631	0.000363648	1,08	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal-like protein
A0A072UPU7	XLG3	56,734	0.015538065	1,08	Nucleotide-binding protein
Q2HUJ7	DET3	43,321	0.051961653	1,07	V-type proton ATPase subunit C
G7KFR6	RABA5b	21,891	0.050772173	1,05	Small GTPase family RAB protein
G7K4D7	xxxxxxx	38,449	0.625256156	1,01	Serine-glyoxylate aminotransferase-like protein
RESPOSTA AO ESTRESSE					
Uniprot ID	String (Gene)	Massa (kDa)	Anova (p)	Fold change	Proteínas
I3SDP0	GRP2	13,423	0.029335631	4,16	cold shock protein 2
A0A072TIZ9	AT1G11470	63,026	0.001255482	1,50	Pentatricopeptide (PPR) repeat protein
G7L8G2	AT1G30990	17,914	1.31E-06	1,39	Pathogenesis-related protein bet V I family protein
Q40365	RCI3	37,153	2.69E-06	1,20	Peroxidase (EC 1.11.1.7)
O65198	CSD2	20,825	0.049514281	1,11	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic (EC 1.15.1.1)
G7JJ31	CASP	21,514	0.015673548	1,08	CASP-like protein
O24076	ATARCA	35,666	0.169885726	1,06	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein
Q9SDZ7	AT1G75280	33,973	0.124729163	1,03	Isoflavone reductase-like NAD(P)H-dependent oxidoreductase
METABOLISMO E RESISTÊNCIA A DROGAS					
Uniprot ID	String (Gene)	Massa (kDa)	Anova (p)	Fold change	Proteínas
B7FJ08	ABC11	27,862	6.85E-08	4,57	ATP-binding ABC transporter
I3T9P7	FTSH1	29,143	2.14E-10	2,26	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH, chloroplastic
G7IMF2	ABCC5	160,598	0,000000349	1,69	Drug resistance transporter-like ABC domain protein
I3S1D8	AT3G49320	26,783	3.54E-05	1,35	Metal-dependent protein hydrolase
A0A072UGC9	ABCC5	162,017	0.000295813	1,32	Drug resistance transporter-like ABC domain protein
G7IMF4	ABCC5	160,464	4.51E-05	1,26	Drug resistance transporter-like ABC domain protein
RuBisCO					
Uniprot ID	String (Gene)	Massa (kDa)	Anova (p)	Fold change	Proteínas
Q945R2	RBCS1A	11,915	7.24E-10	2,00	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain (EC 4.1.1.39) (Fragment)
Q8GTY4	RCA	30,018	0,023884423	1,58	Rubisco activase (Fragment)

W8CYE3	RBCL	52,617	1,99E-11	1,54	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit) (EC 4.1.1.39)
DEMAIS PROTEÍNAS COM FOLD CHANGE > 2 EM AMOSTRAS 300 PPM HPA TOTAL					
Uniprot ID	String (Gene)	Massa kDa	Anova (p)	Fold change	Proteínas
A0A072TG33	DHAR1	35,408	9.83E-08	76,48	Ion channel protein
A0A126TGR5	ATPA	54,917	7.27E-06	41,93	ATP synthase subunit alpha
G7JQ29	SAM1	42,916	0,000304665	13,29	S-adenosylmethionine synthase (EC 2.5.1.6)
A0A072VDU0	RCI3	35,924	1.63E-08	5,18	Peroxidase (EC 1.11.1.7)
A0A072TJI7	APA1	19,422	0,027007642	4,88	Aspartyl protease family protein, putative
G7INA7	AREB3	16,575	1.90E-09	3,34	ABA-responsive protein
G7IPJ9	DHS2	56,662	2.80E-09	3,13	Phospho-2-Dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (EC 2.5.1.54)
Q94IM3	AT1G55210	16,83	1.36E-11	3,10	Class 10 PR protein
A0A072TRI7	ACA5	27,942	4.74E-11	2,83	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase)
A0A072TRS0	MDH	26,567	2.61E-11	2,72	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)
G7L8F8	AT4G01650	18,026	0.003107834	2,54	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transporter
G7JKF2	AT1G12000	62,348	1.61E-05	2,30	Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta (PFP) (EC 2.7.1.90)
B7FM98	AT5G23540	19,457	0,123414586	2,23	Plant/F25P12-18 protein
Q94IM2	UBQ14	8,525	0,018832087	2,20	Pentameric polyubiquitin
A0A060CS45	HSP70	72,334	8.38E-08	2,17	Heat shock protein 70
Q8L6K8	ABF3	16,592	0,000142639	2,09	Harvest-induced protein
Q1RSH3	HSP60	61,168	3.06E-08	2,03	GroEL-like chaperone, ATPase (TCP-1/cpn60 chaperonin family protein)
A0A072V4P8	AT1G34640	45,544	4.71E-10	2,01	Extracellular dermal glycoprotein

Nota: Proteínas identificadas em partes aéreas de *Medicago sativa* L. cultivadas em solo contaminado com 300 ppm de HPA total, com funções biológicas de biodegradação e metabolismo de xenobióticos, transporte e catabolismo, resposta ao estresse, metabolismo e resistência a drogas, proteínas relacionadas a RuBisCO e as demais proteínas com *Fold change* > que 2 em amostras 300 ppm de HPA total. A coluna de String (Gene), contém os códigos dos genes utilizados para a análise de interação das proteínas pela ferramenta String, sendo cada código correspondente a uma ou mais números de identificação do Uniprot (Unipro ID).

Candidatas a Proteínas Relacionadas a Fitorremediação (PRFs) e suas interações - Processos biológicos de acordo com o Gene Ontology (GO)

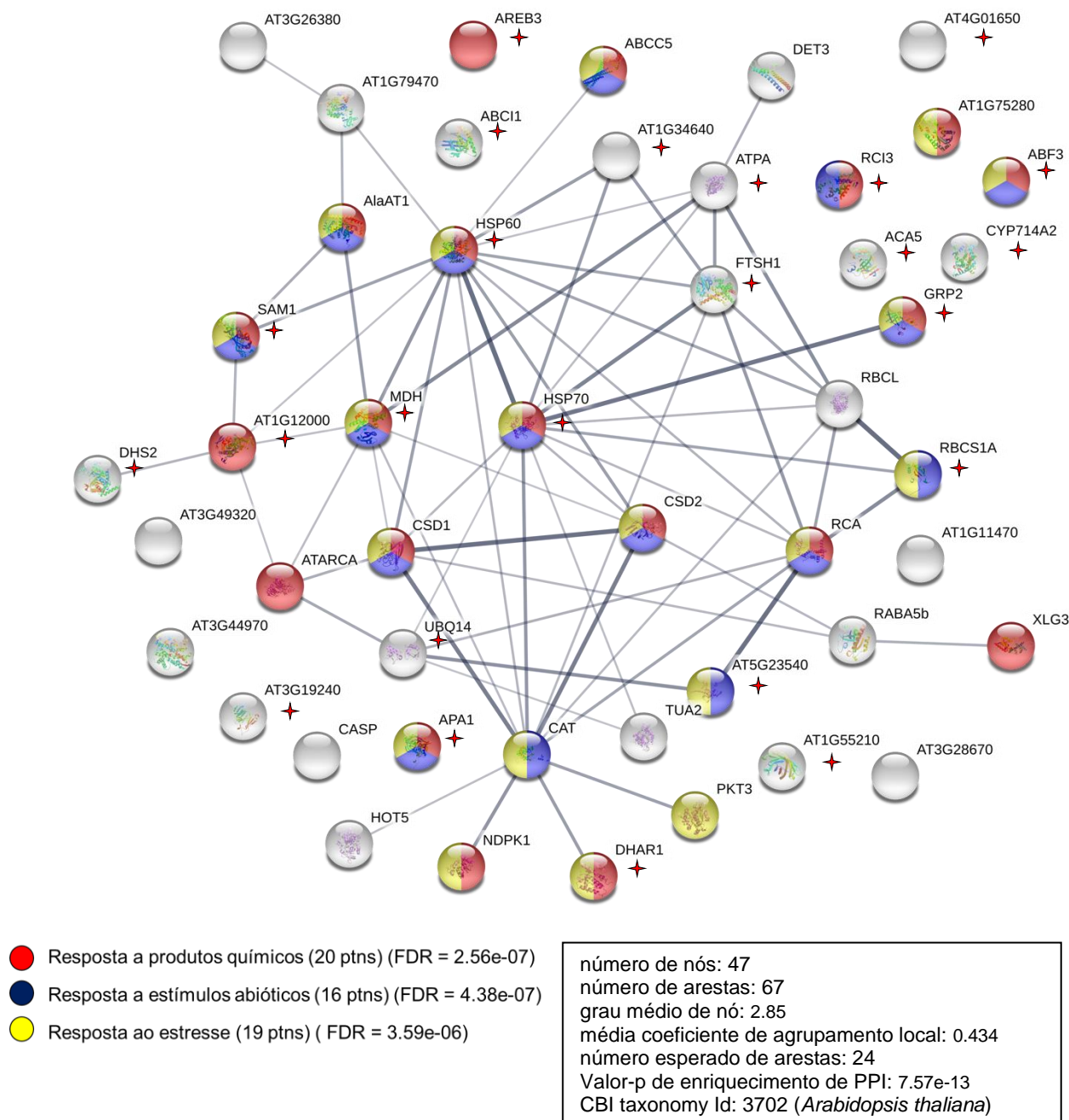


Figura 68. Rede de interações das candidatas a proteínas relacionadas a fitorremediação (PRFs) e sua participação em processos biológicos. Rede de interação formada pelas 53 proteínas obtidas em amostras de tecido aéreo de plantas de *Medicago sativa L.* cultivadas na presença de 300 ppm de HPA total e feita pela ferramenta STRING: *functional protein association networks*. Proteínas destacadas com estrelas vermelhas representam as proteínas mais expressas (*Fold change* > 2). Os processos biológicos são representados nas legendas e os dados da interação podem ser observados no quadro. A confiança das interações é medida de forma qualitativa pela espessura das interações, sendo maior a confiança quanto mais espessa for a interação.

Candidatas a Proteínas Relacionadas a Fitorremediação (PRFs) e suas interações – Funções moleculares de acordo com o Gene Ontology (GO)

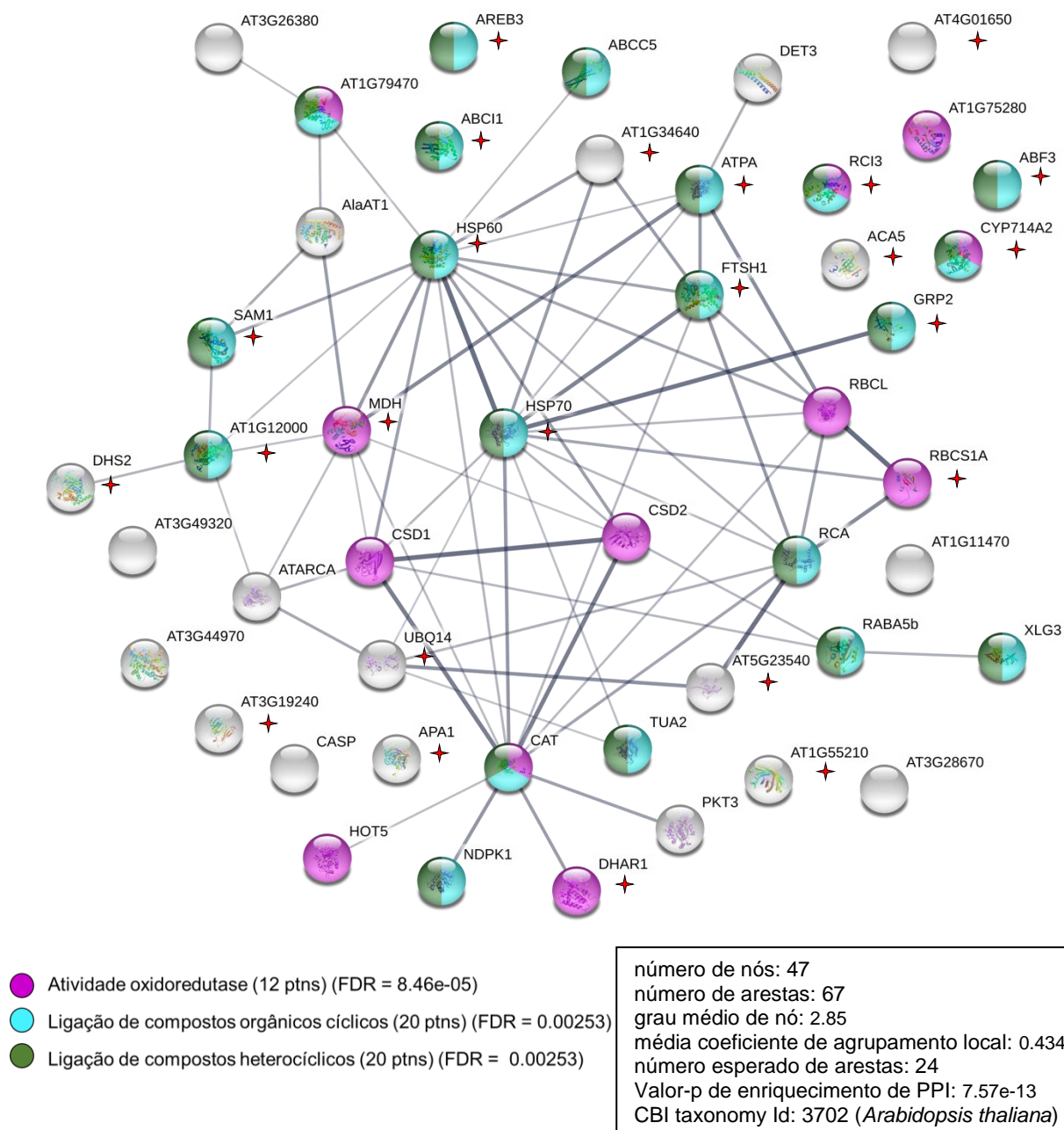


Figura 69. Rede de interações das candidatas a proteínas relacionadas a fitorremediação (PRFs) e sua participação em funções moleculares. Rede de interação formada pelas 53 proteínas obtidas em amostras de tecido aéreo de plantas de *Medicago sativa* L. cultivadas na presença de 300 ppm de HPA total e feita pela ferramenta STRING: *functional protein association networks*. Proteínas destacadas com estrelas vermelhas representam as proteínas mais expressas (*Fold change* > 2). As funções moleculares são representadas nas legendas e os dados da interação podem ser observados no quadro. A confiança das interações é medida de forma qualitativa pela espessura das interações, sendo maior a confiança quanto mais espessa for a interação.

Candidatas a Proteínas Relacionadas a Fitorremediação (PRFs) e suas interações – Componentes celulares de acordo com o Gene Ontology (GO)

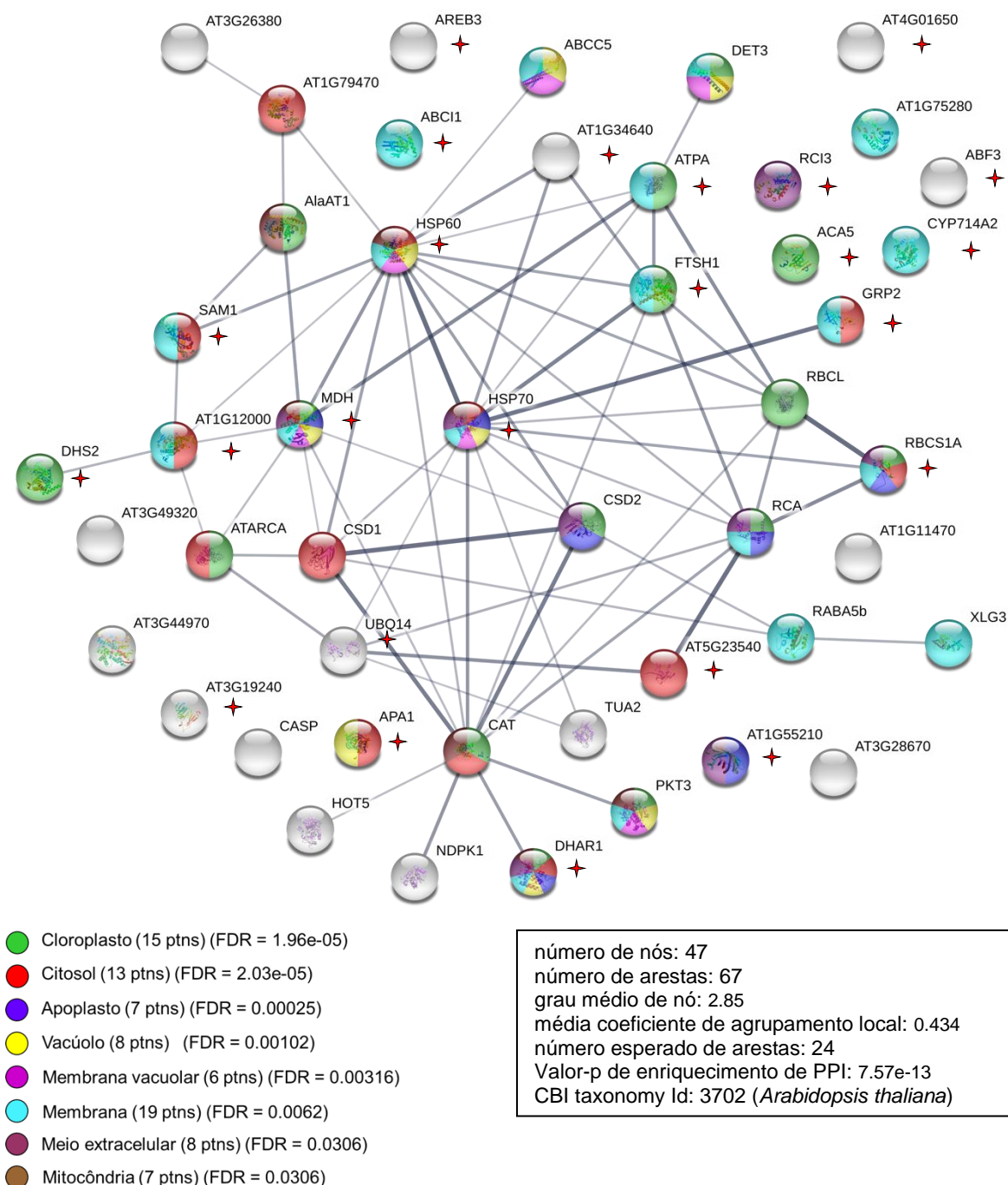


Figura 70. Rede de interações das candidatas a proteínas relacionadas a fitorremediação (PRFs) e sua localização nos compartimentos celulares. Rede de interação formada pelas 53 proteínas obtidas em amostras de tecido aéreo de plantas de *Medicago sativa* L. cultivadas na presença de 300 ppm de HPA total e feita pela ferramenta STRING: *functional protein association networks*. Proteínas destacadas com estrelas vermelhas representam as proteínas mais expressas (*Fold change* > 2). Os compartimentos celulares são representados nas legendas e os dados da interação podem ser observados no quadro. A confiança das interações é medida de forma qualitativa pela espessura das interações, sendo maior a confiança quanto mais espessa for a interação.

5.21. Detecção dos HPA em *Medicago sativa* L. por microscopia de fluorescência e influência da cepa BR 7411.

Os resultados a seguir correspondem a análise, por microscopia de fluorescência, de amostras até o tempo de 20 DAS, sendo também apresentado resultados referentes a 40 DAS, somente para amostras cultivadas na ausência de BR 7411 (validação da técnica). As análises foram feitas a partir da detecção da fluorescência dos HPA caracterizada por sinais variando de coloração azul ao ciano. A confirmação de que o sinal realmente correspondia aos HPA foi feita com a extração e análise dos HPA em tecidos aéreos e radiculares, oriundos de plantas de 40 DAS cultivadas na presença de 450 ppm de HPA total, a análise foi feita por varredura do espectro de emissão de fluorescência (340-500 nm) em extratos quando excitados com luz UV, cujos resultados estão presentes no Anexo A.

Como resultado, analisando isoladamente os espectros de fluorescência dos HPA, foi observado que os espectros de emissão dos HPA excitados a 254 nm apresentaram picos, com emissão máxima na região azul do espectro visível ($\lambda_{em} = 360 \sim 400$ nm) para todos os HPA avaliados. Os picos padrão foram observados em λ_{em} 380 nm e 402 nm (Anexo A: Fig. 1A) para antraceno, λ_{em} 360 nm para fenantreno (Anexo A: Fig. 1B) e λ_{em} 384 e 455 nm para pireno (Anexo A: Fig. 1C). O antraceno apresentou fluorescência relativa 4 a 20 vezes mais intensa que a de fenantreno e pireno, respectivamente, e foi responsável por mais de 80 % do sinal.

Quanto a validação das detecções de HPA por microscopia de fluorescência, o espectro de emissão na presença e ausência de HPA nos tecidos vegetais cultivados na presença de HPA (λ_{ex} 254 nm), apresentou picos em λ_{em} 360, 380, 402 e 455 nm, indicando a presença de todos os HPA estudados no tecido interno de *Medicago sativa* L. (Anexo A: Fig. 6A). As formas do espectro de emissão das plantas contaminadas com HPA eram semelhantes ao espectro da solução mista de HPA, apresentando o mesmo perfil (Anexo A: Fig. 6B). O espectro de emissão das plantas controle (cultivadas na ausência de HPA) foi muito semelhante ao da solução de acetonitrila, com menor emissão de fluorescência, comprovando a ausência de HPA nas plantas controle.

Diferenças na intensidade relativa de fluorescência foram observadas em raízes e folhas de plantas de alfafa cultivadas na presença de HPA, com um alto sinal de antraceno em raízes quando comparado as folhas (picos em λ_{em} 380 e 402 nm), e mais pireno nas folhas (pico em λ_{em} 455nm). O sinal de fenantreno foi observado em ambos os tecidos a uma baixa intensidade de fluorescência relativa (Anexo A: Fig. 6 A).

Após validação da presença dos HPA, foram feitas as análises dos tecidos aéreos e radiculares por microscopia de fluorescência, e averiguada a influência da cepa BR 7411 no tráfego dos contaminantes pelos tecidos vegetais, sendo os tempos estudados os de 10 e 20 DAS (os demais tempos seguem guardados em laminários para estudos futuros).

Como resultados, nas partes aéreas de *Medicago sativa L.* podemos observar, para os primeiros 10 DAS, que os HPA puderam atingir as partes aéreas (Fig. 71 A - P) sendo localizados principalmente nos limbos dos cotilédones. A intensidade da fluorescência tende a aumentar conforme a concentração dos contaminantes utilizados, sendo os sinais de fluorescência mais evidentes (intensos) nos tecidos oriundos de plantas cultivadas na presença de 450 ppm de HPA total (Fig 71 H e P). Quanto a influência da cepa BR 7411, podemos observar que plantas cultivadas em consórcio com a bactéria apresentaram tecidos contendo sinais de fluorescência mais intensos, para todos as concentrações (150, 300 e 450 ppm), se comparadas com plantas cultivadas na ausência da cepa BR 7411, absorvendo assim, maior quantidade de contaminante para os tecidos aéreos (Fig. 71 O – Q).

Outro detalhe que mereceu atenção foi a tráfego dos contaminantes via vasos condutores nos limbos foliares (Fig. 72 A-D). O destino dos HPA nestes tecidos teve início partindo da nervura central, em cotilédones e algumas folhas unifolioladas, sendo transferidos posteriormente para regiões específicas na planta, entre as nervações secundárias e pontos de terminação vascular (característico de venações reticuladas), próximas a porção central delimitada pela nervura central e a margem do limbo, sendo essas regiões o marco inicial do contato dos contaminantes com o tecido fotossintético propriamente dito em alfafas. Esse padrão se repetiu em praticamente todos os tecidos aéreos analisados, seja com ou sem influência da cepa BR 7411, um exemplo desse tráfego pode ser observado na figura 72, onde é possível observar os

HPA (azul) sendo “despejados” no parênquima clorofiliano, em detalhe também é possível observar a fluorescência vermelha, indicativa da clorofila presente nos cloroplastos, como também, um aumento da intensidade do sinal da clorofila na região contendo os HPA, indicando um aumento do número de cloroplastos nessa região (Fig. 72 C e D).

Após 20 DAS, os sinais de HPA apresentaram-se mais concentrados no interior das células, para ambos os tratamentos com ou sem a cepa BR 7411. Contudo, é possível observar nos tratamentos com a cepa BR 7411 um sinal mais intenso, do que nos mesmos tecidos oriundos de plantas cultivadas na ausência de BR 7411 (Fig. 73). Em tecidos cultivados na presença de 150 ppm de HPA total, podemos observar para plantas inoculadas com BR 7411 a eliminação dos HPA no parênquima clorofiliano, via pontos de terminação das nervuras (Fig. 73 G e H). Já para plantas cujo inóculo bacteriano não foi realizado, ainda é possível observar os HPA trafegando pelos tecidos vasculares, indicando assim uma melhora significativa do transporte dos HPA via xilema quando submetidos a presença da cepa BR 7411, sendo esse resultado compartilhado também para as demais concentrações de HPA estudadas (Fig. 73 E e F).

Outra observação relevante, pode ser obtida ao analisar mais de perto os sinais de fluorescência em tecidos frescos, recém destacados das plantas, cultivadas na presença de 450 ppm de HPA (Fig. 74). Ao observar o tecido, é possível notar a fluorescência nitidamente perfazendo o formato de estruturas em bastão, similares a cloroplastos, como também nas paredes celulares, apresentando uma fluorescência azul pálida. Contudo, após ajuste do diafragma e foco do feixe de luz do microscópio nessas regiões, a intensidade da fluorescência desses HPA decaiu gradativamente em segundos (aproximadamente 10 segundos), sem alteração da fluorescência da clorofila. Esse perfil também pode ser observado nas paredes celulares, onde a diminuição da fluorescência azul deu lugar a coloração amarela esverdeada das paredes celulares.

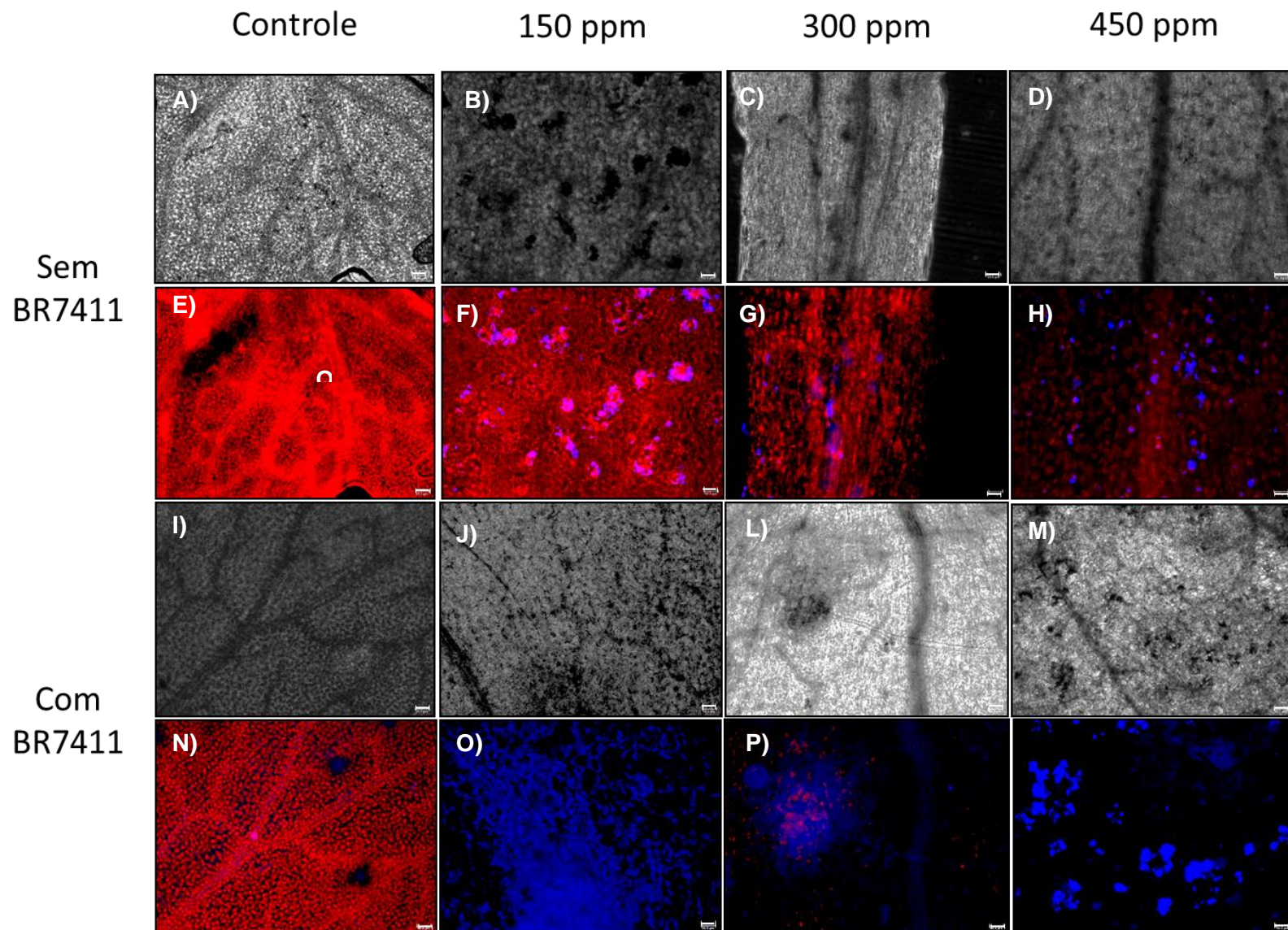


Figura 71. Detecção de HPA em *Medicago sativa* L. cultivadas por 10 dias na presença e ausência da cepa BR 7411 em diferentes concentrações de HPA. Imagens representam os tecidos vegetais vistos em campo de luz visível (A–D e I–M) e em campo de luz UV (E–H e N–Q). Folhas de alfafa apresentando fluorescência azul (característica dos HPA) e vermelha (característica da clorofila), destaque para as folhas de alfafas inoculadas com BR 7411 e a presença de maior quantidade relativa de fluorescência detectada quando comparada ao tratamento sem BR 7411. O valor das barras é de 50 µm.

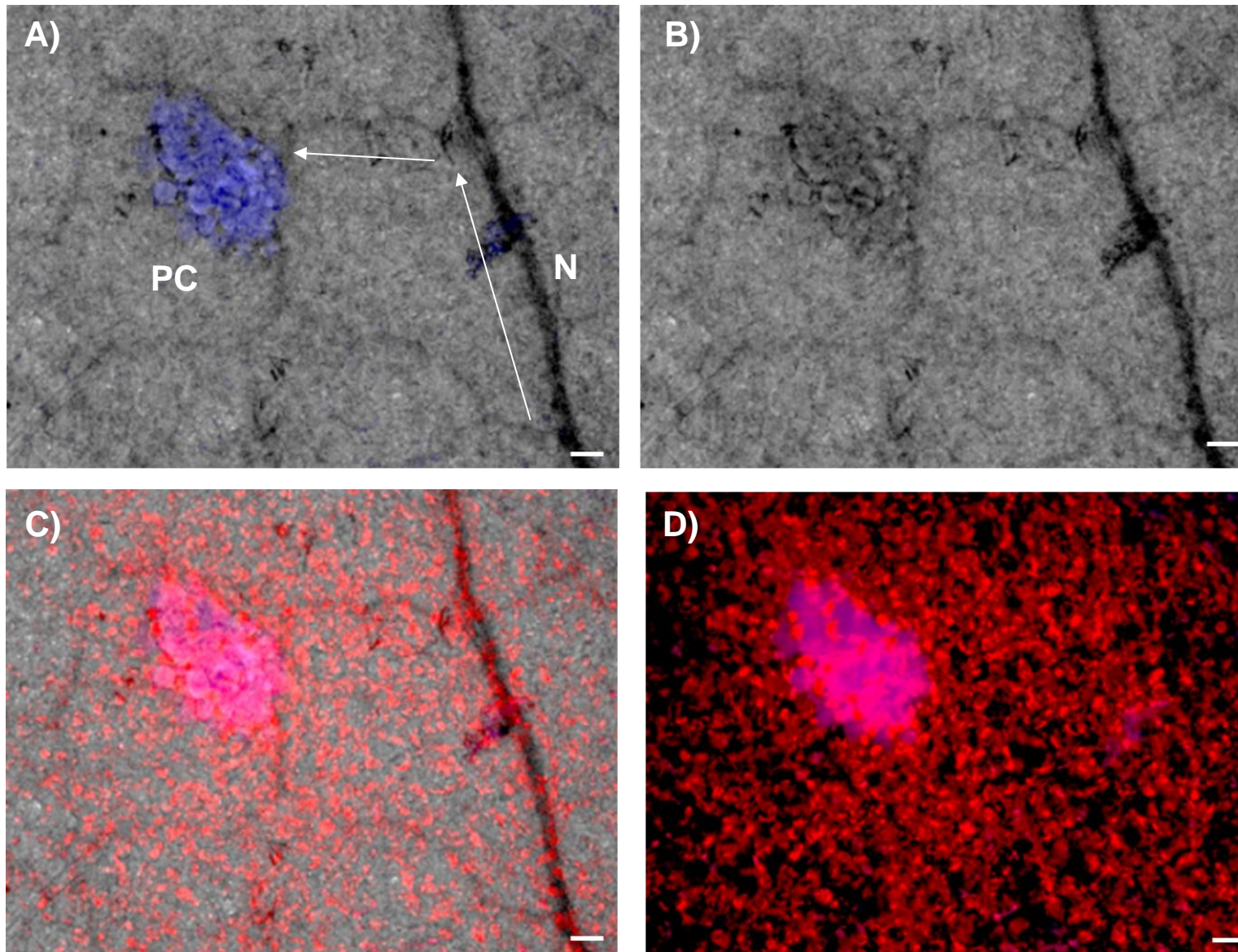


Figura 72. Tráfego de HPA em cotilédones de *Medicago sativa L.* cultivadas por 10 dias na presença e ausência da cepa BR 7411. Plantas cultivadas na presença de 300 ppm de HPA total. Imagens representam os tecidos vegetais vistos em campo de luz visível (B) e em campo de luz UV (D), em A e C temos a sobreposição das imagens (Visível e UV) evidenciando as fluorescências azul (HPA) e vermelha (Clorofila). Valor das barras é de 50 μ m. (N = nervura central do limbo) (PC = Parênquima clorofiliano), setas indicam tráfego dos HPA.

Sem BR7411

Com BR7411

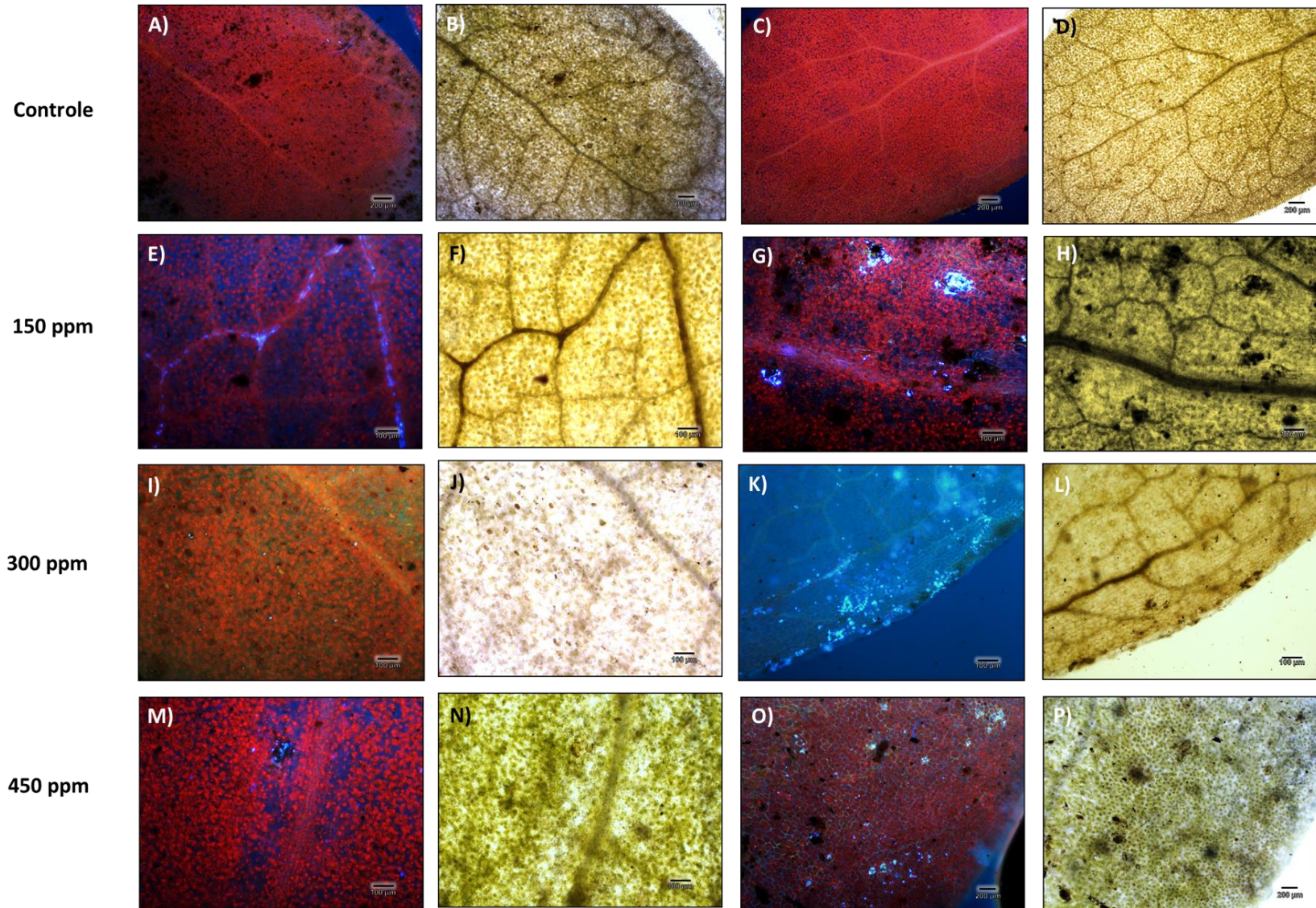


Figura 73. Detecção de HPA em *Medicago sativa* L. cultivadas por 20 dias na presença e ausência da cepa BR 7411 em diferentes concentrações de HPA. Imagens representam os tecidos vegetais vistos em campo de luz visível (B, F, J, N, D, H, L e P) e em campo de luz UV (A, E, I, M, C, G, K e O). Folhas de alfafa apresentando fluorescência azul (característica dos HPA) e vermelha (característica da clorofila), destaque para as folhas de alfafas inoculadas com BR 7411 e a presença de maior quantidade relativa de fluorescência detectada quando comparada ao tratamento sem BR 7411. O valor das barras varia de 100 µm (E – N) e 200 µm (A – D, O e P).

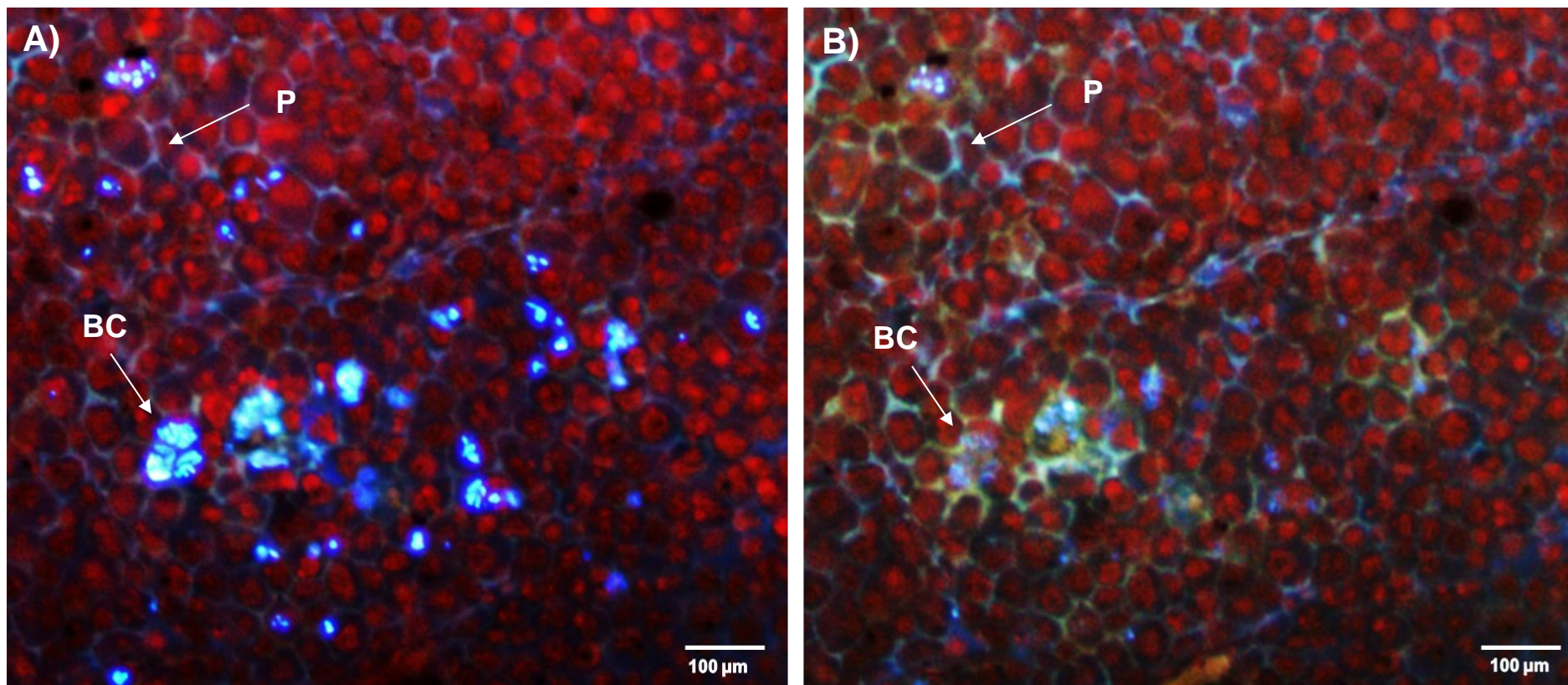


Figura 74. Microscopia de fluorescência de tecidos frescos recém destacados das plantas cultivadas na presença de 450 ppm de HPA por 20 DAS. **A)** fluorescências azuis detectadas em estruturas em forma de bastão, similares a cloroplastos, e em paredes celulares, apresentando uma fluorescência azul pálida. **B)** após ajuste do diafragma e foco do feixe de luz do microscópio, a intensidade da fluorescência dos HPA decaí de forma gradativa, em aproximadamente 10 segundos, sem alteração da fluorescência da clorofila (em vermelho), indicando ausência de dano ao tecido. O fenômeno, indica a hipótese da presença da luz ou organelas e proteínas dependentes da mesma, como responsáveis pela rápida transformação dos HPA em outra substância que não mais apresenta fluorescência. Esse perfil também pode ser observado nas paredes celulares, onde a diminuição da fluorescência azul deu lugar a coloração amarela esverdeada das paredes celulares. (P = Parede celular) (BC = Bastões, prováveis cloroplastos).

5.22. Detecção dos HPA em raízes de *Medicago sativa* L. por microscopia de fluorescência e influência da cepa BR 7411.

Quanto a análise dos tecidos radiculares de *Medicago sativa* L., podemos observar para os primeiros 10 DAS, que os HPA foram encontrados em grande quantidade nas raízes (Fig. 75 A - P), sendo localizados principalmente na epiderme e internamente, no córtex e no estelo. Tal qual nas amostras de tecido aéreo, a intensidade da fluorescência tende a aumentar conforme a concentração dos contaminantes utilizados, sendo os sinais de fluorescência mais evidentes (intensos) nos tecidos oriundos de plantas cultivadas na presença de 450 ppm de HPA total (Fig. 75 H e P). De forma similar ao observado para as partes aéreas, quanto a influência da cepa BR 7411, podemos observar que plantas cultivadas em consórcio com a bactéria, apresentaram tecidos contendo sinais de fluorescência mais intensos, para todas as concentrações (150, 300 e 450 ppm), se comparadas com plantas cultivadas na ausência da cepa BR 7411.

Contudo, é possível observar diferenças na coloração da fluorescência, indicando uma maior quantidade de pireno (fluorescência de coloração mais clara) nas regiões do córtex e epiderme, enquanto que antraceno e provavelmente fenantreno, estão mais presentes no estelo, sendo a fluorescência desses últimos diminuída quanto maior for a concentração dos HPA para amostras tratadas na ausência da cepa BR 7411 (Fig. 75 D e H), e se comparadas com amostras de raízes de plantas cultivadas em consórcio com a cepa BR 7411 (Fig. 75 L e P), observamos nitidamente a fluorescência desses HPA no estelo da planta, indicando uma maior disponibilidade desses compostos para serem absorvidos e carregados, via xilema, para os tecidos aéreos.

Quanto ao intervalo de 20 DAS, o mesmo perfil obtido em 10 DAS continua sendo observado, porém com maior intensidade, onde nitidamente é possível observar a grande quantidade de sinais tanto para pireno (fluorescência de coloração ciano - λ_{em} 455nm) e fenantreno e antraceno (fluorescência de coloração azul escura - λ_{em} 360 ~ 400 nm) em tecidos administrados com inóculo bacteriano, favorecendo assim o potencial da cepa BR 7411 para aumento da absorção dos HPA em solos contaminados. Esse perfil pode ser observado para todas as concentrações utilizadas (Fig. 76 G, K e O).

Contudo, o sentido da translocação dos HPA não se restringiu apenas ao sentido raiz > tecidos vasculares > partes aéreas, foi possível observar pela primeira vez, que os nódulos bacterianos também foram o destino final de parte dos HPA, sendo a fluorescência desses contaminantes detectada em todos os nódulos observados, sendo distribuída nos tecidos condutores (envelopes vasculares) presentes nos nódulos e também nas células periféricas, sendo esses resultados observados nas imagens de secção longitudinal de nódulos de 20 DAS (Fig. 77 E, I e M).

Internamente, observando as imagem das secções transversais dos nódulos, foi possível observar com mais detalhes a localização dos HPA, onde a fluorescência foi observada nas células mais periféricas próximas aos vasos condutores, como também internalizada nas células do nódulo, dentro de estruturas circulares similares a vesículas, sendo o número dessas supostas organelas, diretamente proporcional a concentração dos HPA estudados, sendo mais elevadas quanto maior a concentração (Fig. 77 G, K e O). Estas estruturas podem ser observadas com mais detalhes na figura 78 (A e B) mostrando uma secção transversal de um nódulo pertencente a plantas cultivadas na presença de 300 ppm de HPA total.

Além da identificação dessas estruturas em forma de vesículas no interior dos nódulos, estruturas similares também foram detectadas nas células corticais de raízes logo nos primeiros 10 DAS, sendo número dessas estruturas diretamente relacionado ao tempo e a concentração dos HPA estudos, sendo esse perfil evidenciado com o aumento do número dessas estruturas no intervalo de 20 DAS, e o aumento do número conforme o aumento da concentração de HPA total (Fig. 79). Outro detalhe importante é a coloração da fluorescência dessas supostas organelas, indicando que o HPA majoritário presente nessas estruturas seria o pireno (fluorescência de coloração ciano - λ_{em} 455nm).

Além dos resultados obtidos para 10 e 20 DAS, outros resultados obtidos em 40 DAS também podem ser detacados, como a análise dos tricomas secretores glandular (TSGs) em folhas de alfafa. Os tricomas das folhas das plantas cultivadas em solo controle, exibiram cor hialina quando examinados sob luz visível e ultravioleta diferente da emitida pelos HPA quando analisados sob luz UV (Anexo A Fig. 3 I e J). A presença de substâncias de coloração escura foi detectada nos TSGs de folíolos de

Medicago sativa L. em plantas cultivadas em solo contaminado, com intensa característica de fluorescência dos HPA (Anexo A Fig. 3 K e L).

Em folíolos e cotilédones que apresentavam sintomas visíveis de estresse, na presença de HPA, foram detectadas fluorescências intensas em áreas com lesão tecidual, identificadas por manchas brancas presentes nas folhas (Anexo A Fig. 4 A e B). Outras áreas presentes nos folíolos, contendo coloração mais escura, também mostraram fluorescência intensa, principalmente perto dos estômatos, das células epidérmicas e da cutícula (Anexo A Fig. 4C - E). Os HPA em tecidos da parte aérea de *Medicago sativa* L. foram observados principalmente em folíolos senescentes e cotilédones. Em contraste, os HPA estavam presentes em folhas jovens, em menor extensão, apenas em torno dos estômatos, como indicado pela fraca fluorescência observada (Anexo A Fig. 5).

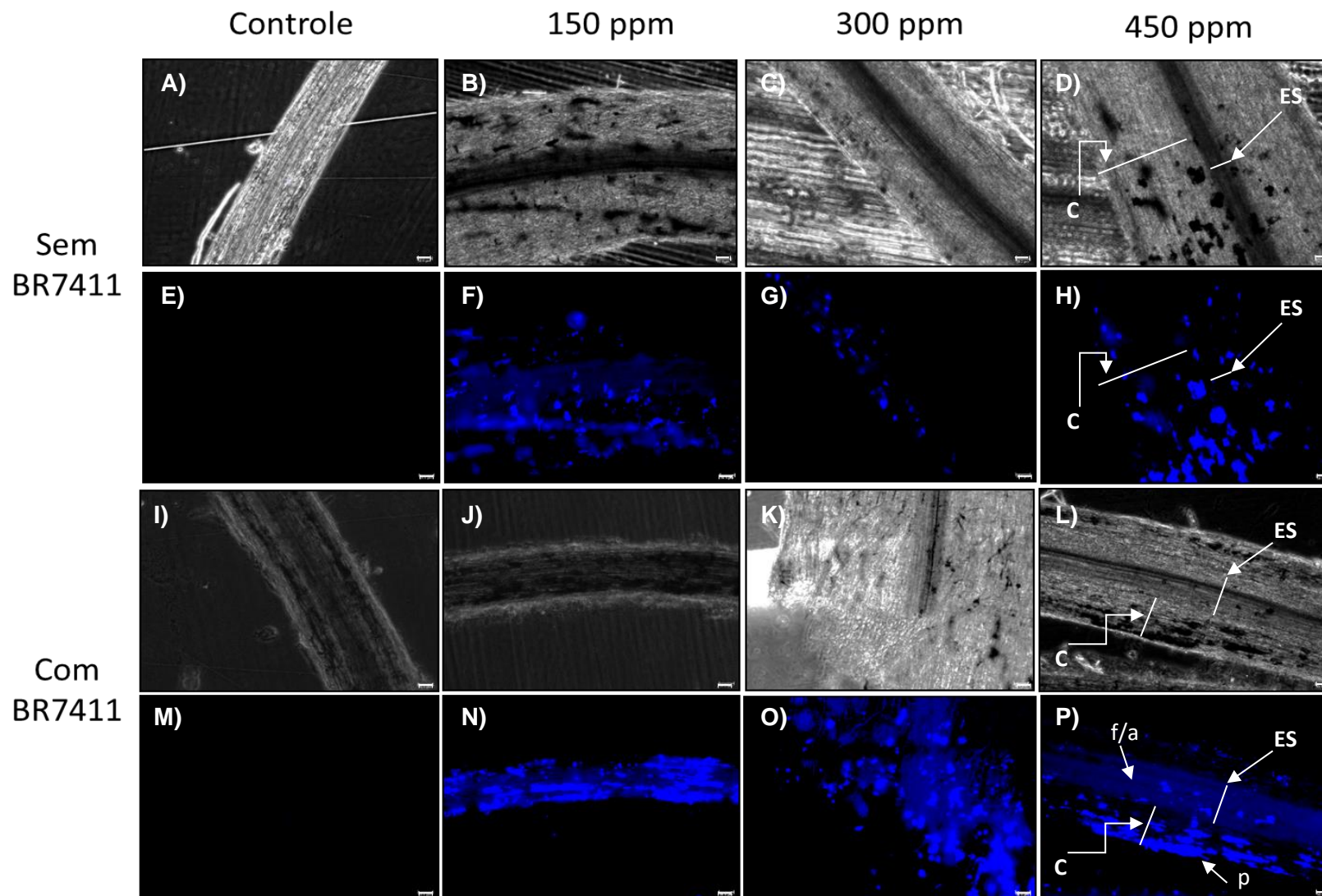


Figura 75. Detecção de HPA em *Medicago sativa* L. cultivadas por 10 DAS na presença e ausência da cepa BR 7411 em diferentes concentrações de HPA. Imagens representam os tecidos vegetais vistos em campo de luz visível (A–D e I–M) e em campo de luz UV (E–H e N–Q). Raízes de alfafa apresentando fluorescência azul escuro (característica dos HPA antraceno “a” e fenantreno “f”) e azul claro (característica do HPA pireno “p”), destaque para a as raízes de alfafas inoculadas com BR 7411 e a presença de maior quantidade relativa de fluorescência detectada, quando comparada ao tratamento sem BR 7411. O valor das barras é de 50 µm. (ES = Estelo) (CX = Córtex)

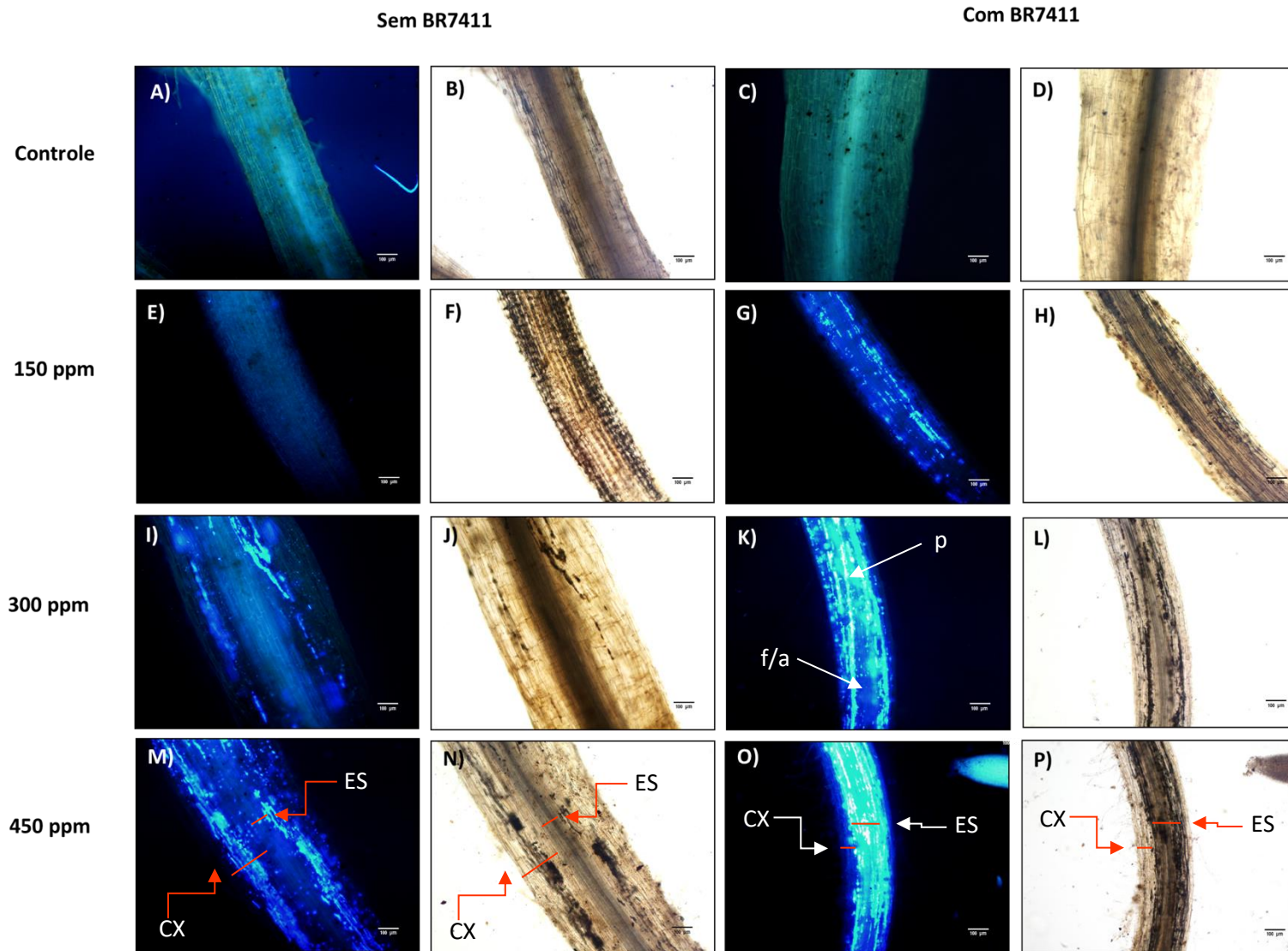


Figura 76. Detecção de HPA em *Medicago sativa* L. cultivadas por 20 DAS na presença e ausência da cepa BR 7411 em diferentes concentrações de HPA. Imagens representam os tecidos vegetais vistos em campo de luz visível (B, F, J, N, D, H, L e P) e em campo de luz UV (A, E, I, M, C, G, K e O). Raízes de alfafa apresentando fluorescência azul escuro (característica dos HPA antraceno “a” e fenantreno “f”) e azul claro (característica do HPA pireno “p”), destaque para a as raízes de alfafas inoculadas com BR 7411 e a presença de maior quantidade relativa de fluorescência detectada, quando comparada ao tratamento sem BR 7411. O valor das barras é de 100 µm. (ES = Estelo) (CX = CórTEX)

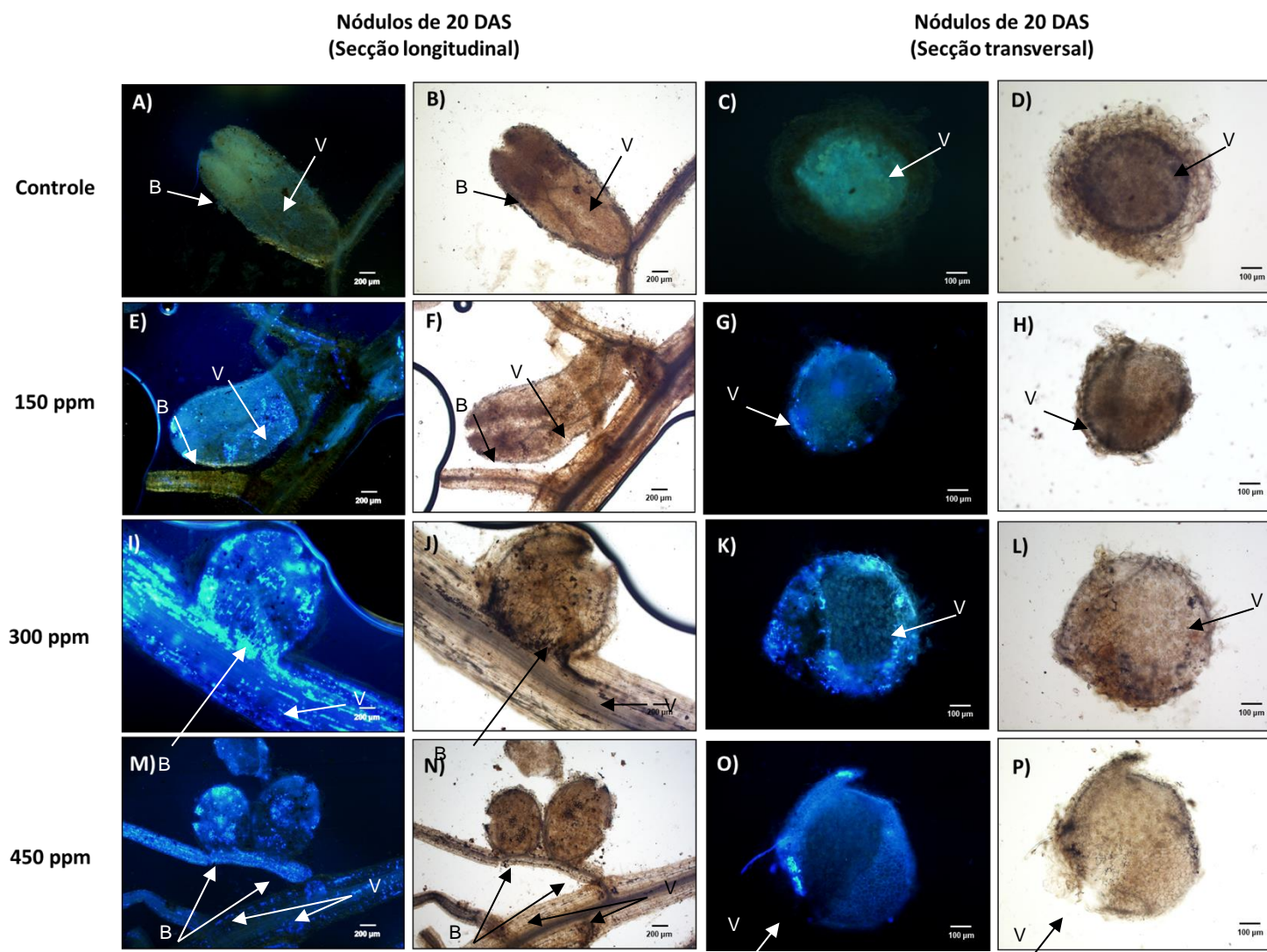


Figura 77. Detecção de HPA em nódulos de *Medicago sativa* L. de 20 DAS em diferentes concentrações de HPA. Imagens representam os tecidos vegetais obtidas em campo de luz visível (B, F, J, N, D, H, L e P) e em campo de luz UV (A, E, I, M, C, G, K e O). Nódulos de alfafa apresentando fluorescência azul escuro (característica dos HPA antraceno “a” e fenantreno “f”) e azul claro (característica do HPA pireno “p”), destaque para o aumento da fluorescência de acordo com o aumento da concentração de HPA. O valor das barras varia de 100 µm (Secção transversal) e 200 µm (Secção longitudinal). (B = Zona contendo bacterióides) (V = Envelope de vascularização dos nódulos).

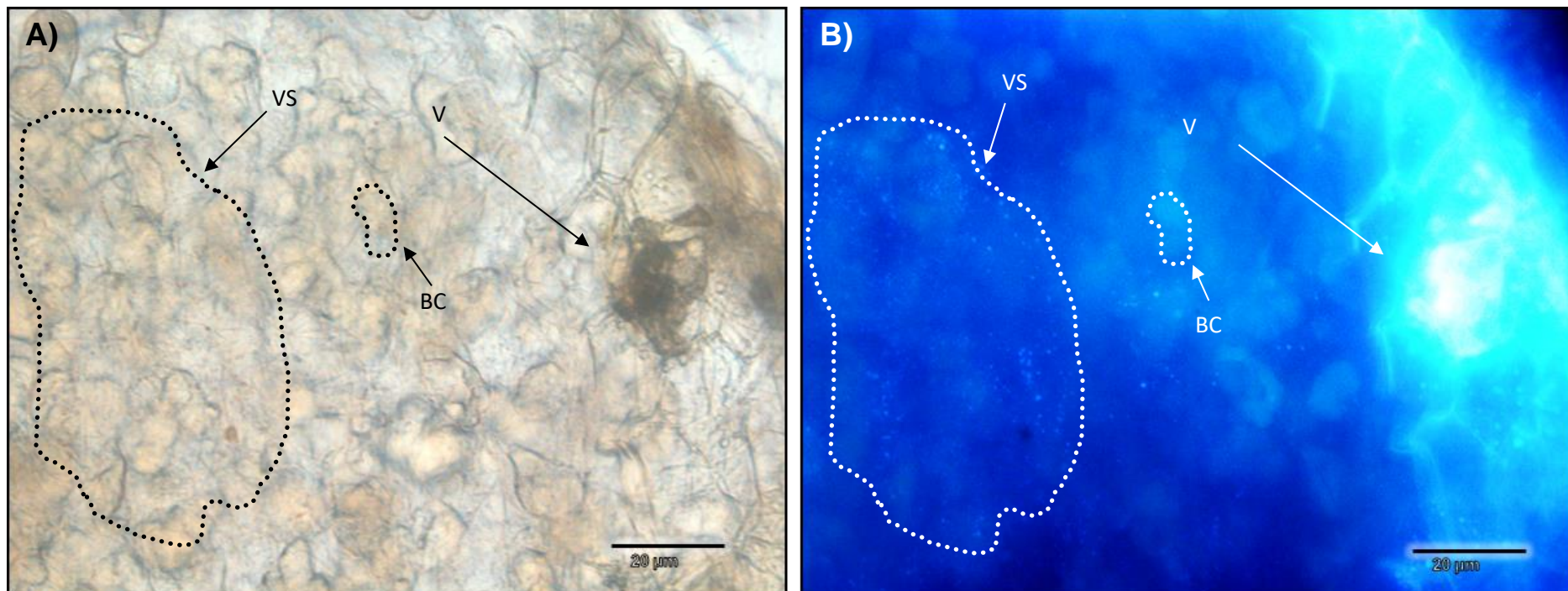


Figura 78. Detalhe do interior do nódulo de *Medicago sativa L.* de 20 DAS na presença de 300 ppm de HPA total. Microscopia de fluorescência de nódulos sob campo de luz visível (A) e em campo de luz UV (B). Destaque para a presença de vesículas (VS) contendo intensos de fluorescência, próximos as células presentes na região simbiótica do nódulo, células estas destacadas das demais por apresentar coloração mais escura dada a presença de bacterióides em seu interior (BC). Destaque também para o envelope de vascularização (V), onde é possível observar a presença de fluorescência intensa característica de pireno, como também outras vesículas ao redor do feixe vascular. O valor das barras é de 20 µm. (BC= Célula contendo possivelmente bacterióides) (V = Envelope de vascularização dos nódulos) (VS = Vesículas).

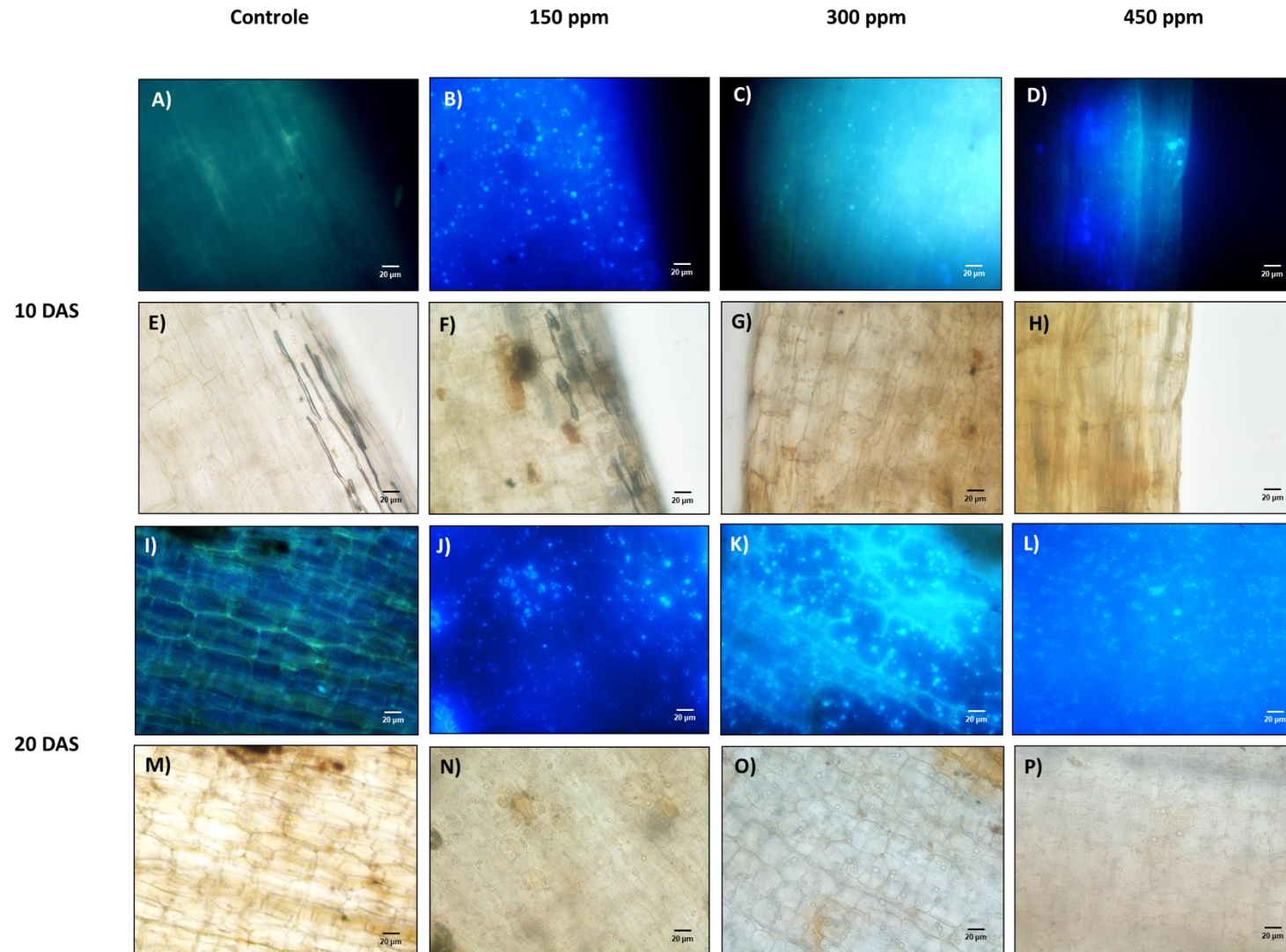


Figura 79. Possíveis estruturas vesiculares, contendo HPA em *Medicago sativa L.* cultivadas por 10 e 20 DAS em diferentes concentrações de HPA. Imagens representam os tecidos vegetais vistos em campo de luz visível (E – H e M – P) e em campo de luz UV (A – D e I – L). Raízes de alfafa apresentando grande número de estruturas vesiculares contendo intensa fluorescência, típica do HPA pireno, em amostras de raízes cultivadas por 10 DAS. Destaque para o aumento dessas estruturas vesiculares com passar do tempo em 20 DAS. O valor das barras é de 20 µm.

CAPÍTULO 6 - DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Potencial da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* como ferramenta para a degradação de HPA.

Nesta etapa foram estudados o potencial de remediação da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, averiguando sua capacidade e oxidação dos HPA estudados (fenantreno, antraceno e pireno, como também, seu crescimento na presença dos HPA e sua capacidade de degradação e utilização dos HPA como fontes de carbono.

A capacidade de oxidação de pireno, antraceno e fenantreno pela cepa BR 7411 foi determinada, de forma qualitativa, pela metodologia de Hanson *et al.*, (1993) sendo positiva pela ocorrência da mudança na coloração do meio de mineral contendo o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) de azul escuro para transparente. Após 4 dias de cultivo, foi possível afirmar que houve diminuição da intensidade da cor azul do DCPIP presente nos poços contendo HPA, quando comparado ao poço controle (contendo apenas a cepa BR 7411 e o DCPIP), indicando a oxidação dos HPA que, possivelmente, está associado a degradação e / ou uso dos HPA como fonte de carbono. O método foi validado utilizando uma fonte de carbono (sacarose) utilizada pela cepa BR 7411, onde após 4 dias de cultivo foi observada a completa descoloração, indicando a oxidação e uso da sacarose como fonte de carbono. De acordo com os resultados, o indicador redox DCPIP não é degradado pela cepa BR 7411, como observado no controle, evidenciando que a diminuição na coloração do meio se dá, exclusivamente, pela oxidação das fontes de carbonos acrescentadas aos meios, ou seja, a oxidação dos HPA e da sacarose.

Já nos ensaios de oxidação dos HPA a cepa BR 7411 apresentou logo de início o potencial para ser utilizada como uma ferramenta de biorremediação, não só pela capacidade de tolerar a presença desses contaminantes mantendo-se viáveis ao final de todo o experimento, como a própria oxidação dos HPA, evidenciado pelo uso do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) em ensaio de Hanson, sendo uma metodologia de baixo custo e com eficiência comprovada por diferentes autores, que destacam o importante papel deste indicador na detecção de microrganismos, como como fungos filamentosos, leveduras e bactérias com potencial para petróleo e

derivados degradantes (HANSON *et al.*, 1993; BIDOIA *et al.*, 2010; LUZ *et al.*, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2017).

Não obstante essa etapa, os perfis de crescimento em meio mineral reforçaram os resultados observados no ensaio, com o aumento das D.O. na presença dos HPA indicando uso desses contaminantes como fontes de carbono, para o crescimento da cepa, destacando os maiores crescimentos quando na presença de pireno, seguido de antraceno e fenantreno. Contudo, embora a cepa BR 7411 tenha sido capaz de crescer na presença dos HPA, os cultivos foram afetados de maneira específica, de acordo com o contaminante utilizado, vide os dados referentes ao quantitativo de unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) durante o transcorrer do experimento. Para o fenantreno, uma queda significativa foi observada durante os primeiros 3 dias de cultivo, reduzindo o número de bactérias em 60 %, essa resposta pode ser um indício na formação de intermediários tóxicos durante o metabolismo desse HPA.

De acordo com a literatura, os HPA no ambiente são transformados e degradados, incluindo transformações causadas pelo solo de forma bastante intensa sob o efeito de fatores físico-químicos (MCCONKEY *et al.*, 1997) e também como resultado da degradação microbiana de hidrocarbonetos (BABOSHIN *et al.*, 2005, MURATOVA *et al.*, 2014). Tratando-se do HPA fenantreno, intermediários metabólicos como a 9,10-fenantrenoquinona formada nos estágios iniciais da metabolização do fenantreno pela cepa *Ensifer meliloti* P221, podem ser considerados mais tóxica para os organismos do que o HPA em sua forma nativa, já outros metabólitos (ácido 1-hidroxi-2-naftóico), também apresentam o mesmo efeito em ensaios de fitorremediação. Onde a maior toxicidade do solo contaminado pode depender exatamente de metabólitos microbianos mais tóxicos, que surgem como resultado da decomposição dos contaminantes, onde notadamente os derivados oxidados desses HPA são por sua vez mais facilmente disponíveis para a microflora do solo (DUBROVSKAYA *et al.*, 2016).

Contudo, mesmo com a hipótese da formação desses intermediários tóxicos, após o intervalo de 3 dias, a população de bactérias cultivadas na presença de fenantreno pode crescer novamente, indicando assim um consumo dos metabólitos tóxicos (que levaria a morte de indivíduos na população), ou um processo de seleção de bactérias presentes na população, que apresentariam maior resistência aos

intermediários tóxicos, sobrevivendo ao estresse até as primeiras 72 horas e reestabelecendo o número de indivíduos da população a partir de 96 h, agora, mais resistentes aos metabolitos tóxicos gerados.

Já para os HPA antraceno e pireno, esse perfil de queda do número de indivíduos em resposta a presença do contaminante não foi observado, indicando assim que os intermediários metabólicos gerados não seriam tóxicos o suficiente para levar a diminuição do número de bactérias, no antraceno os valores permaneceram estáveis durante todo o experimento. Porém, para o pireno, a presença dele não só proporcionou a manutenção do número de indivíduos no cultivo, durante 120 horas, como permitiu o aumento do número de indivíduos a partir de 144 horas, sendo esse aumento de aproximadamente o dobro (1,8 x) se comparado ao controle.

Este padrão de diminuição do número de bactérias, em resposta aos HPA, pode ser explicado pela estrutura química dessas moléculas, onde a presença de regiões de baía e regiões K na estrutura molecular de fenantreno e pireno respectivamente (MURATOVA *et al.*, 2015, ALVES *et al.*, 2018), são mais propensas a sofrer oxidação e possível degradação pelo metabolismo da cepa. Sendo que a molécula de pireno, por ser composta por mais anéis (4) do que o fenantreno (3) necessitaria de mais etapas de oxidação / ativação da molécula, para talvez gerar intermediários metabólicos tóxicos similares ao gerados no metabolismo de fenantreno, favorecendo assim uma resposta mais lenta, se comparada ao fenantreno, ou simplesmente os metabolitos gerados são diferentes e apresentam menor toxicidade a cepa. Já a alteração não significativa no número de bactérias em culturas contendo antraceno, pode ser explicada pelo fato da molécula apresentar uma estrutura linear e, por sua vez, ausente de regiões mais propícias a ataques oxidativos, como as regiões de baía e regiões K, presentes nos outros dois HPA estudados (fenantreno e pireno).

Quando analisada a resposta da cepa BR 7411 aos HPA em cultivos com meio rico (meio 79 com 50 % de sacarose) estudados em suas três concentrações, presentes neste trabalho para os ensaios de fitorremediação com *Medicago sativa L.* (150, 300 e 450 ppm de HPA total), podemos observar a influência da fonte de carbono sacarose, favorecendo um rápido crescimento das cepas em todas as condições testadas, sendo esse um comportamento esperado vide a presença de uma fonte de

carbono como a sacarose, fotossintato importante para o crescimento da cepa, onde estirpes de *Rhizobium* sp. podem apresentar crescimento rápido utilizando uma série de carboidratos como fontes de carbono, tais como: pentoses, hexoses, polióis, ácido orgânicos, dissacarídeos e polissacarídeos, sem a formação de gás (CASTELLANE, 2007, SAMPAIO, 2013). Contudo, a sacarose se destaca por apresentar-se como o principal açúcar a ser deslocado pelos tecidos vasculares da planta, sendo esse por definição, um açúcar osmoticamente ativo nas plantas e importante fonte de carbono para as bactérias alojadas em nódulos.

Contudo, o crescimento da cepa BR 7411 começou a se intensificar após 12 horas de cultivo, causando um atraso de crescimento nas fases iniciais, logo após começar a esgotar as fontes de sacarose nos meios de cultura, e nas primeiras 16, 20 e 24 horas podemos observar o crescimento da cepa BR 7411 quando na presença dos HPA. Como também, a demonstração de forma qualitativa que os HPA foram metabolizados em moléculas mais hidrossolúveis, indicando um possível consumo dos HPA como fonte de carbono em 24 horas, quando na presença de uma fonte de carbono co-metabolizada (sacarose). Esse perfil vai de encontro com os trabalhos de Keum *et al.*, (2008) que demonstraram que a adição de fontes alternativas de carbono, como glicose ou piruvato, aumentaram crescimento de *Sinorhizobium* sp. C4 na presença de HPA como o fenantreno (500 mg em 1,5 L).

Esta resposta de crescimento da cepa BR 7411 também pode ser comparada de forma similar, com os trabalhos de Kaushish *et al.*, (2009) onde foi observado que *B. subtilis* BMT4 (MTCC9447) teve 12 horas de latência quando exposto a 50 g.mL⁻¹ de BaP (Benzo[a]pireno), e após esse tempo seu crescimento foi exponencial. No entanto, esse comportamento pode depender do genótipo bacteriano ou sobre o tipo e combinação de HPA no meio de cultura (ZHONG *et al.*, 2010), quando comparada a cepa BR 7411 com exemplares de *R. tropici*, estudados por González-Paredes *et al.*, (2013) observa-se que a cepa precisa de mais tempo para se adaptar ao HPA (nesse caso, fenantreno ou BaP, como exemplos estudados), sendo necessário uma adaptação de 72 horas de exposição aos HPA, sendo esse tempo 6 vezes maior do que o obtido em nossos estudos (apenas 12 horas). A tolerância e crescimento da cepa BR 7411 se deve ao fato de que essas bactérias estão usando esses contaminantes (compostos orgânicos) como uma fonte de carbono e energia, a esse

respeito, Seo *et al.*, (2009) mencionou que o crescimento de *Burkholderia*, por exemplo, está relacionada com a disponibilidade de HPA na cultura, e também indicou que o crescimento bacteriano diminuiu após cinco dias, tempo em que os contaminantes foram totalmente utilizados como fonte de carbono e energia, como também descrito por Atlas e Bartha (2002).

Tal como nos estudos de González-Paredes *et al.*, (2013) a degradação dos HPA pode estar sendo dirigida pela atividade das bactérias, diretamente no composto químico ou como co-metabolismo, uma vez que o meio de cultura foi complementado com sacarose (50 %) e extrato de levedura para sustentar o crescimento bacteriano, e auxiliar na degradação dos HPA. Os efeitos benéficos de fontes alternativas de carbono como extrato de levedura, acetato, glicose e piruvato, para a degradação de HPA por outros gêneros bacterianos, também pode ser visto em vários estudos (YE *et al.*, 1996; YUAN *et al.*, 2000; TENG *et al.*, 2010 e GONZÁLEZ-PAREDES *et al.*, 2013). Além disso, o enriquecimento do meio de cultura com uma fonte alternativa de carbono permite a indução de enzimas oxidativas, necessárias para degradar os HPA (RENTZ *et al.*, 2005; GONZÁLEZ-PAREDES *et al.*, 2013).

Em relação aos HPA estudados (fenantreno, antraceno e pireno), este estudo mostra pela primeira vez que a bactéria *Ensifer meliloti* BR 7411 pode utilizar esses HPA recalcitrantes como fonte de carbono para o crescimento, em ensaios *in vitro*, onde cultivos complementados com 300 ppm ultrapassaram valores de 16×10^8 UFC.mL⁻¹ indicando uma diferença de 59,4 % em relação ao controle, com um número de bactérias 2,5 vezes maior quando comparado ao meio contendo apenas sacarose como fonte de carbono. Ensaios contendo 150 e 450 ppm apresentaram diferenças de 43,8 % e 38,7 %, respectivamente, quando comparados ao controle, indicando um número de células viáveis de BR 7411 cerca de 1,8 e 1,6 vezes maior que o controle, respectivamente.

Embora existam diferenças entre o crescimento da cepa no meio controle e nos tratados com HPA, estes resultados apontam que a cepa BR 7411 permanece viva ao longo do ensaio e evidencia a capacidade da mesma de resistir a elevadas concentrações desses HPA, principalmente para o fenantreno, que está presente na lista de valores orientadores para solo e água subterrâneas, pertencente a CETESB (2014). A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB estipula valores

de Intervenção, ou concentrações de HPA, que representam risco para a saúde humana, no qual há necessidade de implementar técnicas de remediação e monitoramento. Esses valores de intervenção são de 15 ppm em solos agrícolas, 40 ppm em solos residenciais e de 95 ppm em solos industriais (CETESB, 2014).

Sendo assim, o uso da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, de forma isolada ou como inóculo para o cultivo de alfafas cv. “Crioula” (utilizadas no presente trabalho), seria viável nas condições citadas pela CETESB e baseado nos resultados desta tese, graças a capacidade de sobrevivência dessa cepa na presença dos três HPA estudados, como também a utilização dos mesmos como fonte de carbono. Esta cepa poderia assim, atuar em solos contendo mais de 95 ppm de HPA, destacando-se como uma ferramenta de remediação tanto para solos agrícolas, residenciais e industriais.

A cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, até o presente momento, apresenta pela primeira vez na literatura, a capacidade de degradar fenantreno, antraceno e pireno. Esse comportamento da cepa vai de encontro com os dados obtidos na literatura, onde outras cepas pertencentes ao gênero *Ensifer*. sp (antigamente chamados de *Sinorhizobium* sp.) vem sendo estudados por grupos ao redor do mundo, com enfoque no papel dessas bactérias, para a remediação de ambientes contaminados com petróleo e derivados. Como exemplo, podemos citar trabalhos envolvendo a biorremediação e o emprego de associações microbianas para remediação, com cepas isoladas de ambientes rizosféricos, como *Ensifer meliloti* P221 (IBPPM 383) que foi observada ser capaz de metabolizar os HPA, como também, estimular o desenvolvimento de vegetais expostos à poluição ambiental por fenantreno (DUBROVSKAYA *et al.*, 2016).

Embora o grande número de estudos sobre biorremediação de HPA tenha o foco em cepas como *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijernickia*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Cycloclasticus*, *Gordonia*, *Flavobacterium*, *Halomonas*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodotorula*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* e *Vibrio*, sendo capazes de utilizar HPA como única fonte de carbono e energia (JUHASZ & NAIDU 2000; KANALY e HARAYAMA 2000; JOHNSEN *et al.*, 2005; BABOSHIN *et al.*, 2005; KEUM *et al.*, 2005), as bactérias pertencentes ao grupo dos rizóbios também passam a integrar esses grupos, mas

ainda apresentam as maiores lacunas de conhecimento na literatura, quando se trata de estudos voltados pra remediação de ambientes contaminados com HPA, mesmo com a aplicação bem-sucedida de plantas e suas rizobactérias na fixação de nitrogênio, como também a possível atuação sinérgica na degradação de HPA (AFZAL *et al.*, 2012).

Os primeiros estudos sobre a degradação da HPA por meio de simbiose com microrganismos foram publicados por Keum *et al.*, (2005), onde os autores descreveram a via metabólica de degradação de fenantreno por *Sinorhizobium* sp. Cepa C4. e por Poonthrigpun *et al.*, (2006), examinando o metabolismo de acenaftileno por *Rhizobium* sp. CU-A1. O número de publicações nesta área ainda é limitado, indicando que as vias de degradação da HPA em microrganismos simbióticos são insuficientemente estudadas (MURATOVA *et al.*, 2014). Sendo trabalhos como este, de grande importância para o campo da fitorremediação e da utilização de novas tecnologias que empreguem o uso dos consórcios entre bactérias diazotróficas e plantas.

6.2. Interação entre *Ensifer meliloti* e *Medicago sativa* L. e sua influência no desenvolvimento das plantas em solos contaminados com HPA

Para a autenticação da cepa BR 7411, foi monitorado durante 40 dias o crescimento de *Medicago sativa* L. e o desenvolvimento de nódulos maduros ativos após inóculo de 300 µL (1×10^9 células.mL⁻¹) de BR 7411. Como esperado, os dois controles apresentaram resultados ideais segundo Somasegaran P. & Hoben H. J. (1985). Como controle positivo, plantas cultivadas na presença de nitrogênio apresentaram ótimo crescimento, com presença de folhas com coloração verde escura e sem sinais de estresse aparentes, e não foi possível observar a presença de nódulos, o que é esperado, vide a presença de fontes de nitrogênio prontamente assimiláveis a planta ser um fator inibidor no processo de infecção de rizóbios em leguminosas (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985; RIGHETTI *et al.*, 1986, OLDROYD, 2013; SUZAKI *et al.*, 2015 GAUTRAT *et al.*, 2019). Contudo, este controle não exclui a presença de possíveis microrganismos que sejam capazes de infectar a planta em condições ideais (com ausência de fontes de nitrogênio), sendo assim, o controle de esterilidade também foi efetuado e o resultado também foi promissor, pois que plantas

cultivadas na ausência de nitrogênio e sem o inóculo bacteriano, não foram capazes de sobreviver até o final do ensaio, apresentando severos sinais de deficiência de nitrogênio, como folhas amareladas (clorose), indicando a ausência de microrganismos fixadores de nitrogênio, mostrando que a etapa de desinfecção das sementes foi bem-sucedida.

Foi confirmada a autenticidade do inóculo da cepa BR 7411 em plantas de *Medicago sativa* L. cultivadas na ausência de fonte de nitrogênio. A cepa foi capaz de infectar a planta gerando nódulos em 10 dias, e estes atingindo a maturidade com a produção de leghemoglobina em torno de 20 dias, de acordo com o observado na literatura (OLDROYD, 2013; SUZAKI *et al.*, 2015). Estas plantas apresentaram desenvolvimento de folhas com coloração verde escura, indicando aporte de nitrogênio fixado pela bactéria, podendo assim concluir que, a cepa BR 7411 pode substituir a presença de fertilizantes de origem nitrogenada para os ensaios *in vitro*.

Nos resultados de análise do fenótipo, biometria e biomassa seca de alfafa cultivadas em solos contaminados com HPA e sem o inóculo da cepa BR 7411, foi demonstrado experimentalmente, que plantas cultivadas em solos contaminados apresentavam uma redução no seu tamanho e biomassa, conforme o aumento da concentração dos contaminantes, sendo a redução no tamanho de plantas cultivadas em solos contaminados com poluentes orgânicos, um tema discutido na literatura (ALKIO *et al.*, 2005; MURATOVA *et al.*, 2009). No trabalho de Baek *et al.*, (2004), foi mostrado os efeitos de óleo cru no crescimento de feijoeiro (*Phaseolus nipponensis*) e milho (*Zea mays* L.). A fitotoxicidade dessas espécies elevou-se com o aumento do número de anéis aromáticos do poluente e plantas de *Z. mays* demonstraram maior sensibilidade ao solo contaminado com HPA, quando comparadas com *P. nipponensis*. Estudos realizados por Ekundayo *et al.*, (2001), sobre o efeito do derramamento de óleo em plantas de *Z. mays* L., também revelaram uma redução no crescimento em solos poluídos, usando critérios como a altura, largura do caule e área foliar desse vegetal, para a espécie de *Medicago sativa* L. esse mesmo perfil de crescimento também fora observado em trabalhos anteriores (ALVES, 2014; SALEHI-LISAR & DELJOO 2015 e ALVES *et al.*, 2018).

Uma explicação para a redução no tamanho de plantas cultivadas em solos contaminados com compostos orgânicos, pode ser obtida nos trabalhos de Xu &

Johnson (1995), Hester & Mendelsohn (2000) e Pezeshki *et al.*, (2000). Estes autores relataram que a presença de poluentes orgânicos como petróleo e seus derivados, quando absorvidos pelas raízes dos vegetais, formam uma película que impermeabiliza a superfícies das raízes impedindo a captação de água e sais minerais do solo. Como consequência disto, é observada a diminuição da altura e da área foliar das plantas. Também é verificado o aumento no número de estômatos, como uma estratégia do vegetal para manter-se viva em ambientes contaminados. Por serem compostos lipofílicos, os HPA aqui estudados poderiam facilmente aderir-se nas raízes de *Medicago sativa L.*, comprometendo o aporte de água das plantas, causando a redução de seu tamanho, como resposta a presença de HPA no meio.

Nos trabalhos de Alves, (2014), análises proteômicas feitas com plantas de *Medicago sativa L.* cultivadas na presença de fenantreno, antraceno e pireno, revelaram a ausência de algumas proteínas pertencentes a funções biológicas relacionadas a “Biogênese / degradação da parede celular” em plantas cultivadas em solo contaminado com HPA, podendo estas proteínas estarem relacionadas com a redução no tamanho de *Medicago sativa L.* Uma das proteínas identificadas em amostras de plantas cultivadas em solo controle foi a “*Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 39-like*”, uma pectinesterase. A mesma não foi encontrada em plantas cultivadas em solo contaminado com HPA. As pectinesterases pertencem a uma grande família multigênica e, juntamente com poligalacturonases, participam de uma ampla gama de processos fisiológicos, como o crescimento da planta, defesa e reprodução (ALVES, 2014 e PELLOUX *et al.*, 2007). Vários experimentos têm demonstrado que essas proteínas estão envolvidas, direta e indiretamente, em diversos processos fisiológicos associados com o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta. Alguns de seus papéis incluem o seu envolvimento na extensão e rigidez da parede celular, divisão celular, e crescimento das regiões de entrenó (ALVES, 2014, PELLOUX *et al.*, 2007).

Neste presente trabalho, a análise proteômica quantitativa revelou 18 proteínas mais expressas em condições controle, indicando a presença de outras proteínas relacionadas a “biogênese / degradação da parede celular”, como as “*Fasciclin-like arabinogalactan protein*” (biogênese da parede celular secundária de plantas / adesão celular) apresentando um *fold change* igual a 3.12, indicando uma expressão 3 vezes

maior em plantas cultivadas na ausência dos contaminantes. Esta proteína se faz presente em plantas superiores, e pertencente ao subconjunto de FLAs de domínio único FAZ, que de acordo com a literatura, parece contribuir para as propriedades biomecânicas de caules através do seu impacto sobre a síntese e arquitetura da parede celular secundária (MACMILLAN, *et al.*, 2010). Em várias angiospermas, foi possível observar grande abundância na expressão específica desses genes, em grande parte, em caules submetidos a deposição secundária na parede celular, como demonstrado em *Arabidopsis* (MACMILLAN, *et al.*, 2010) eucalipto (BROWN *et al.*, 2005; ITO *et al.*, 2005; PERSSON *et al.*, 2005), choupo (LAFARGUETTE *et al.*, 2004), zínia (DAHIYA *et al.*, 2006) e algodão (HUANG *et al.*, 2008). Também foi possível identificar proteínas do tipo “*Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase*” (biogênese da parede celular / modificação da parede celular tipo planta envolvida no crescimento de células multicelulares / processo metabólico xiloglucana) apresentando um *fold change* igual a 2.09, indicando uma expressão 2 vezes maior em plantas cultivadas na ausência dos contaminantes. Essa proteína apresenta um papel importantíssimo no metabolismo de xiloglucana nas paredes celulares em dicotiledôneas (HAYASHI, 1989 e HAYASHI & KAIDA, 2011).

Enquanto um aumento no número de cordões de xiloglucano, entre as microfibrilas de celulose nas paredes celulares, aumenta a rigidez das paredes, a degradação dessas amarras faz com que as paredes se afrouxem. Essa degradação pode ocorrer tanto através da integração de oligossacarídeos do tipo xiloglucana, devido a ação da endotransglucosilase ou através de hidrólise direta, devido a ação de “*xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase*” (KAIDA, 2010). A degradação da xiloglucana presente em paredes celulares de álamo, pela expressão transgênica da xiloglucanase, promoveu não só o alongamento acelerado do caule na parede, como também bloqueou o gravitropismo dos caules (NAKAMURA & HAYASHI, 1993; OHMIYA *et al.*, 1995, PARK *et al.*, 2003). A superexpressão da celulase também reduziu o conteúdo de xiloglucana nas paredes, resultando em aumento do volume celular em folhas de *Arabidopsis* sp. e *Paraserianthes falcataria*. A hemicelulose xiloglucana desempenha um papel fundamental no afrouxamento e aperto das microfibrilas de celulose, permitindo que a célula mude sua forma em zonas de crescimento e diferenciação e para manter a sua forma final, após a maturação das células (PARK *et al.*, 2003, HARTATI *et al.*, 2008).

Além disso, as demais proteínas citadas também apresentam relação estreita com outra proteína identificada em amostras controle, contendo um *fold change* superior a 2, relacionada ao crescimento celular, chamada “*Auxin transporter BIG*” (crescimento de células unidimensionais / transportadores / outros transportadores / transportadores impulsionados por potencial eletroquímico). Estas proteínas atuam de forma crucial no transporte da auxina polar, é uma proteína possuidora de um tamanho extraordinário, cerca de 560 kDa, e contém vários domínios putativos do tipo dedo de zinco. Sua expressão pode ser alterada por múltiplos genes regulados por luz e ser suprimida por níveis elevados de auxina, causados pela superexpressão de um gene biossintético de auxina, sugerindo que a distribuição normal desse hormônio é necessária para manter a expressão desses genes em baixo nível, onde inibidores químicos do transporte de auxinas alteram a localização intracelular do transportador de refluxo de auxina PIN1 em mutantes *doc1 / tir3*, apoiando a idéia de que o “*Auxin transporter BIG*” é necessário para o refluxo normal de auxina. (GIL *et al.*, 2001).

A caracterização de proteínas envolvidas no transporte de auxina em plantas superiores tem contribuído de forma importante para o entendimento do crescimento e desenvolvimento de plantas (LUSCHNIG *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 1998 e GÄLWEILER *et al.*, 1998). O ácido indol-3-acético (IAA), a auxina predominante encontrada nas plantas, é conhecido há mais de meio século por ser um regulador de crescimento envolvido na regulação do ciclo de vida das plantas.

Devido ao seu papel crítico sugerido no estabelecimento de gradientes de auxina, assume-se que os transportadores de refluxo de auxina são um alvo principal para eventos regulatórios, envolvidos nos processos de adaptação da planta. Sendo o fenótipo de *Medicago sativa* L. em resposta aos HPA estudadas no presente trabalho, um indício que reforça a possibilidade de participação desses transportadores de auxina do tipo BIG, como proteínas capazes de alterar o crescimento das plantas de *Medicago sativa* L. quando em situações de estresse, visando a integridade da planta e proporcionando maior tolerância aos efeitos nocivos dos HPA, diminuindo o comprimento médio das partes aéreas e radiculares das plantas, fenômeno esse observado também nos trabalhos de Alves, (2014) e Alves *et al.*, (2018).

Como visto nos resultados da análise do desenvolvimento dessas plantas em solos contaminados e na ausência do inóculo de BR 7411, as plantas que foram cultivadas em 150, 300 e 450 ppm de HPA total apresentaram um tamanho muito menor, quando comparado com as plantas controle, sendo observado que a redução no tamanho estava diretamente relacionada com a diminuição do comprimento das regiões de entrenós.

Um fator importante a ser considerado nesse trabalho é a possibilidade de utilização dessas alfafas como fitoindicadores de solos poluídos com HPA, já que quando cultivadas na presença de HPA essas plantas apresentaram uma drástica diminuição no comprimento das regiões de entrenó, e por consequência geram “plantas anãs” facilmente distinguíveis de plantas cultivadas em solo não contaminado (ALVES, *et al.*, 2018).

De acordo com Wilberg, (2006), fitoindicadores de poluição são organismos sensíveis a poluição como fator de estresse, que respondem por meio de alterações dos seus processos vitais (indicadores por meio de resposta) ou pela acumulação do poluente (indicadores por meio de acumulação).

Como organismos sésseis, as plantas estão sempre expostas a estresses do meio em maior intensidade que os animais. Por esta razão podem ser usadas como bioindicadores quanto a uma variedade de substâncias tóxicas. Organismos indicadores respondem às mudanças no meio, de acordo com suas necessidades específicas, por intermédio do declínio, do desaparecimento, ou o contrário, pela abundância no crescimento e no aumento da capacidade de reprodução. Alterações na composição florística e o declínio de algumas espécies são bons indicadores da ocorrência de um estresse de longa duração (LARCHER, 2000).

Vale a pena ressaltar que embora a presença de HPA tenha influenciado no decréscimo da altura média e comprimento médio de partes aéreas e radiculares e nos respectivos valores de biomassa seca, as plantas de alfafa estudadas foram capazes de sobreviver até o final do experimento, indicando que espécies de *Medicago sativa* L. podem tolerar altas concentrações de HPA no solo.

Dentre todas as concentrações de HPA usadas no presente trabalho, os vegetais cultivados em 150 ppm de HPA total mostraram capacidade de

desenvolvimento satisfatório. Sendo capaz de crescer e incorporar biomassa e atingindo valores similares aos do controle, vide ausência de diferença significativa entre os valores de comprimento e biomassa seca durante os 40 dias de ensaio, e com poucos sintomas visuais de estresse. Isto indica que *Medicago sativa L.* seria capaz de desenvolver-se em solos nessas condições, que de acordo com a CETESB, seria viável vide a capacidade de sobrevivência dessas plantas em solos contendo mais de 95 ppm de HPA, podendo ser utilizada como uma ferramenta de fitorremediação para solos agrícolas, residenciais e industriais.

Contudo, neste trabalho também foi possível observar os efeitos benéficos da utilização da cepa BR 7411 na morfologia das plantas de *Medicago sativa L.* como também na redução dos efeitos gerados pela presença dos HPA, como sintomas de estresse, clorose e diminuição das regiões de entrenós e a influência da presença da cepa BR 7411 no crescimento. Podemos observar que a maioria das plantas tratadas com o inóculo da cepa BR 7411 não apresentaram diferença significativa (Holm Sidak $p < 0.0001$), quando comparadas com as plantas controle (regadas com solução nutritiva rica em nitrogênio). Estes resultados mostram que a interação entre *Ensifer meliloti* e *Medicago sativa L.* foi capaz de garantir o aporte de nitrogênio necessário para o crescimento da planta em condições ideais, sem a necessidade da introdução de fontes de nitrogênio exógenas (com fertilizantes, por exemplo). Contudo, neste perfil podemos destacar as plantas cultivadas na presença de 150 ppm de HPA no intervalo de 20 DAS, onde o tratamento com a cepa BR 7411 promoveu um aumento significativo (Holm Sidak $p < 0.0001$) tanto da biomassa como do comprimento médio das partes aéreas de *Medicago sativa L.* inibindo a ação nociva dos HPA vide o fenótipo observado. O aumento da biomassa também pode ser observado nas raízes de *Medicago sativa L.* até a concentração de 300 ppm de HPA durante os primeiros 30 DAS (Holm Sidak $p < 0.0001$).

Geralmente, os solos contaminados são pobres em nutrientes, especialmente nitrogênio, e mal drenados (BENYAHIA & EMBABY, 2016). Neste contexto, plantas leguminosas pertencentes a família Fabaceae são frequentemente apropriadas para fitorremediação do solo, porque eles têm a capacidade potencial de fixar nitrogênio atmosférico, usando suas bactérias simbiotes, além da capacidade de formar micorrizas. Simbioses como a relatada neste presente trabalho, podem melhorar o

crescimento das leguminosas, estimulando a atividade microbiana, aumentando assim a degradação de hidrocarbonetos.

Para plantas de *Medicago sativa* L. sua ampla utilização para fitorremediação de orgânicos (HECHMI *et al.*, 2014; WEI & PAN 2010) e poluentes inorgânicos (BONFRANCESCHI *et al.*, 2009; VAMERALI *et al.*, 2011; ZAEFARIAN *et al.*, 2013) somada aos benefícios gerados pela cepa BR 7411 mostrados nesse trabalho, compõem uma ferramenta eficaz na remediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos recalcitrante, de maneira rápida e permitindo um cenário menos oneroso, vide que a fixação biológica de nitrogênio proporcionada pelo consórcio alfafa e BR 7411, reduziria os gastos com fertilizantes e além de promover maior rendimento para a planta, vide aumento da biomassa, se comparada com tratamentos sem a bactéria e com fertilizantes artificiais (nesse caso, a solução de Hoagland utilizada neste trabalho).

Tendo em vista o papel benéfico da cepa BR 7411 no ganho de comprimento e biomassa das raízes de alfafa, principalmente nas concentrações entre 150 e 300 ppm de HPA total, o uso da cepa BR 7411 se faz interessante, por contribuir com o incremento das capacidades naturais já observadas em plantas de alfafa, como seu sistema radicular fibroso adequado para a rizodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (WANG *et al.*, 2012) e sua contribuição para a fitoestabilização de elementos traços (ZRIBI *et al.*, 2015). Sendo assim, a utilização da cepa BR 7411, em ensaios de fitorremediação de solos contaminados com HPA, apresenta-se como uma estratégia inteligente para a remediação de ambientes contaminados com HPA, sendo capaz de melhorar a saúde dos vegetais e, além disso, reduzir a baixa fertilidade do solo e melhorando assim a fitorremediação do mesmo, vide sua capacidade de bioestimulação, além de poder ser utilizado como componente para novas tecnologias que envolvam o uso da cepa BR 7411 como inoculante (bioaumento) (SAYARA *et al.*, 2010).

6.3. Potencial de remediação de solos contaminados com HPA e o uso isolado e sinérgico das espécies de *Medicago sativa* L. e *Ensifer meliloti* (cepa BR 7411).

Para avaliação do potencial de fitorremediação de *Medicago sativa L.* e a influência da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti*, HPA foram extraídos de solos contaminados com 150 300 e 450 ppm e inoculados, ou não, com a cepa BR 7411 durante 40 DAS. Os extratos foram purificados por cromatografia de adsorção em sílica e analisados e quantificados por técnica de CLAE-FR.

A presença dos tratamentos, tanto isolado como sinérgico, das espécies de *Medicago sativa* e *Ensifer meliloti* foram eficazes na remediação dos solos contaminados de uma forma geral, reduzindo significativamente concentração dos HPA estudados a percentuais de remoção maiores que 50 %, em média, entre as etapas iniciais do experimento (entre 10 e 20 DAS), contudo, o potencial de remediação mostrou-se dependente dos tipos de HPA estudados, a concentração que se encontravam no solo, como também a técnica que fora utilizada para a remediação dos HPA, ou seja, uso isolado da cepa BR 7411, uso isolado da planta *Medicago sativa L.* e por fim, o consórcio entre os dois organismos (cepa BR 7411 e *Medicago sativa L.*).

Analisando os potenciais de remediação de fenantreno, para as três concentrações estudadas (50, 100 e 150 ppm), a utilização da planta de forma isolada, como tecnologia de fitorremediação, nestes ensaios em microcosmos estéreis mostrou-se a mais eficiente na remoção desse contaminante logo nos primeiros 10 dias, em ensaios contendo 50 ppm de fenantreno (150 ppm de HPA total), atingindo a concentração de 10 ppm em apenas 10 dias, sendo essa redução significativa (Tukey $p < 0.0001$) quando comparada com os demais tratamentos para o mesmo intervalo de tempo, culminando em percentuais de remoção de 80 % em 10 DAS e atingindo o percentual de remoção máximo de 90 %, próximo ao final dos experimento em 30 dias.

Esse perfil também pode ser observado, nos outros ensaios feitos com concentrações maiores de fenantreno (100 e 150 ppm), contudo, a resposta se dá de forma mais lenta, conforme aumento da concentração dos HPA no solo. É possível destacar, que as plantas de *Medicago sativa L.* cultivadas em solo contaminado com 100 ppm de fenantreno, promoveram a queda significativa na concentrações do contaminante (Tukey $p < 0.0001$) para níveis abaixo de 40 ppm, logo nos primeiros 10 DAS, atingindo percentuais de remoção oscilando em torno de 60 % em 10 DAS (20 %

a menos que em ensaios feitos a 50 ppm de fenantreno inicial) e alcançando 90 % ao final do experimento em 40 DAS, 10 dias a mais que em ensaios com 50 ppm de fenantreno inicial. Para plantas cultivadas em solo com 150 ppm de fenantreno, a queda significativa da concentração de fenantreno (Tukey $p < 0.0001$) atingiu 70 ppm nos primeiros 10 DAS, representando percentuais de remoção oscilando entre 45 % (35 % a menos que em ensaios contendo 50 ppm de fenantreno inicial) e atingindo os mesmos 90 % ao final do experimento em 40 DAS, observado em solos contendo 100 ppm de fenantreno.

Nos trabalhos de Alves *et al.*, (2014 e 2018) Foi demonstrado experimentalmente que o HPA fenantreno, foi o que obteve os maiores valores no percentual de remoção, em torno de 98 %, indicando que a presença do vegetal em solos contaminados foi de grande importância para a remoção desse contaminante. Nas análises cromatográficas, foi observado que o pico referente ao fenantreno apresentava-se muito próximo a altura da linha de base, indicando claramente a redução na concentração desse HPA quando na presença de *Medicago sativa L.* A eficiência na remoção de fenantreno já era esperada, de acordo com os dados apresentados pela literatura, que relatam a fácil volatilização e degradação deste composto no ambiente, quando comparados com os HPA de maior peso molecular (WILCKE *et al.*, 2000). Tais características puderam ser observadas analisando os dados de concentração e percentual de remoção de fenantreno em solos não cultivados durante 20 DAS, onde estes percentuais atingiram valores em torno de 40 - 60 %, indicando possíveis eventos de volatilização, ou processos físico-químicos como a foto oxidação, que poderiam reduzir a concentração de fenantreno durante o ensaio experimental (ALVES *et al.*, 2018)

Estes resultados mostram que *Medicago sativa L.*, quando exposta a presença de fenantreno, possui maquinário bioquímico para sozinho remediar majoritariamente este contaminante em poucos dias, oscilando potenciais de remoção que variam de 45 % em concentrações mais elevadas (150 ppm) a 80 % quando em concentrações mais baixas (50 ppm). O potencial de fitorremediação de HPA, muitas vezes na literatura, é atribuído a ação conjunta de plantas e microorganismos, sendo o papel protagonista da remediação muitas vezes atrelado aos microorganismos e atribuindo a planta apenas o papel de bioestimular a flora bacteriana da rizosfera, para que a

mesma possa degradar os contaminantes, contudo, estes resultados contribuem de forma positiva para a literatura e os estudos na área da fitorremediação, onde a generalização desses eventos de protagonismo deve ser feita com cautela, vide que as estratégias de remediação adotadas por plantas e microorganismos são influenciadas pelas espécies químicas dos contaminantes em questão, como também de acordo com suas concentrações iniciais e tempo de exposição ao contaminante.

Para fenantreno, os resultados obtidos nesse trabalho indicaram que a ação sinérgica (BR 7411 e *Medicago sativa* L.) promoveu percentuais significativos de remoção dos HPA somente a partir de 30 DAS em ensaios cuja concentração foram de 150 ppm inicial (a maior utilizada neste trabalho), atingindo concentrações em torno de 30 ppm em 30 DAS e percentuais de remoção próximos a 70 %. Nos demais ensaios, o perfil do consórcio (planta x bactéria) não demonstrou ser mais eficiente do que a própria atenuação natural dos HPA, evidenciado pela diminuição das concentrações de fenantreno ao longo dos 40 DAS, para todas as concentrações estudadas (exceto para o tempo de 30 dias em 150 ppm).

Em trabalhos publicados anteriormente, (ALVES, 2014 e ALVES *et al.*, 2018) cultivos de *Medicago sativa* L. em solos estéreis foram capazes de remediar antraceno, fenantreno e pireno, sugerindo a hipótese de que essas plantas possuem maquinário bioquímico para, sozinhas, fitorremediarem esses HPA, embora este fenômeno seja visto com receio por pesquisadores, demais grupos também observaram essas evidências em plantas de *Eichhornia crassipes* (NESTERENKO-MALKOVSKAYA, *et al.*, 2012), onde estas foram capazes de remover 57 % de naftaleno em meio aquático, na ausência de bactérias rizosféricas em apenas sete dias, tendo como característica principal o uso de plantas oriundas de culturas de tecido estéreis, ou seja, livres de microorganismos e até mesmo vírus. Essa característica observada é de grande importância para a fitorremediação, pois é sabido que plantas são capazes de crescer em solos onde os níveis de concentração de poluentes são tóxicos para os microorganismos, evidenciando assim uma capacidade de remediar ambientes contaminados cujas condições impedem a existência desses seres, em outras palavras, essa característica faz com que a fitorremediação atue onde a biorremediação não poderia atuar (USEPA 2000).

Esses dados vão de encontro com os resultados obtidos no presente trabalho, onde vemos que os tratamentos com a bactéria (seja ela isolada ou em consórcio), obtiveram valores mais baixos de remediação do que os observados para os tratamentos contendo somente a planta. A ação isolada da bactéria só obteve percentuais de remoção significativos em intervalos de forma mais tardios, entre 30 e 40 DAS, sendo percentuais superiores a 90 % ao final do experimento (Tukey $p < 0.0001$) e dependentes da concentração do contaminante no solo, onde quanto maior a concentração mais tardia é a resposta dos microrganismos.

Essa resposta lenta para a remoção de fenantreno em solos contaminados pode estar relacionada a hipótese da presença de metabólitos com potencial tóxico, gerados na degradação do fenantreno pela cepa BR 7411 durante o ensaio, discutidos previamente e documentado na literatura (MURATOVA *et al.*, 2015). Estes resultados podem estar relacionados aos dados obtidos em ensaios com meio mineral contaminado com HPA, onde os cultivos de BR 7411, na presença de fenantreno, foram capazes de reduzir, durante os primeiros 3 dias de cultivo, o número de bactérias em 60 %, um perfil similar pode ter acontecido também nos solos nos primeiros dias de contato com os HPA, levando a uma remediação mais lenta do fenantreno e selecionando as cepas mais viáveis para a degradação dos HPA durante os primeiros 20 dias e culminando no máximo de remediação aos 30 e 40 DAS.

Quando analisadas as UFC.g⁻¹ de solo da cepa BR 7411, esses perfis podem ser destacados, onde é possível ver claramente que durante os primeiros 10 DAS, o número de bactérias é bem similar ao número encontrado em condições controle, sendo que, após 10 dias (no tempo de 20 DAS), é observado o aumento significativo do número de indivíduos nas concentrações de 150 e 300 ppm de HPA total (correspondentes a 50 e 100 ppm de fenantreno), indicando um crescimento da cepa em resposta aos contaminantes, de forma direta ou associado a um provável bioestímulo provocado por *Medicago sativa L.*

Analisando os potenciais de remediação de antraceno, para as três concentrações estudadas (50, 100 e 150 ppm), os ensaios contendo a presença de *Medicago sativa L.* (de forma isolada ou em consórcio), mostrou-se a mais eficiente na remoção desse contaminante nos primeiros 10 dias em ensaios contendo 50 ppm de antraceno (150 ppm de HPA total), atingindo a concentração em torno de 10 ppm,

sendo essa redução significativa (Tukey $p < 0.0001$) quando comparada com o solo sem tratamento e com a solo tratado com a bactéria, de forma isolada, culminando em percentuais de remoção próximos a 80 %.

Esses resultados mostraram que as plantas de *Medicago sativa L.* foram mais rápidas na remoção de antraceno do que em ensaios contendo a cepa BR 7411 isolada, fortalecendo assim a hipótese de que, dependendo do contaminante (nesse caso, o antraceno), as plantas teriam um papel chave para removerem quantidades substanciais deste HPA, por si só, sem a contribuição direta dos microrganismos rizosféricos (por bioestímulo por exemplo) nesse início do tratamento, sendo essa ação mais evidente a partir dos 30 dias de ensaio, como observado nos dados de UFC.g⁻¹ de solo, vide que a cepa BR 7411, em 10 dias de exposição ao contaminante, não apresentou diferenças significativas quando comparada com os solos sem tratamento. Esses resultados reforçam os dados relatados na literatura de que solos cultivados apresentam maiores valores de degradação de poluentes orgânicos do que solos sem vegetação (MERKL *et al.*, 2005, LEE *et al.*, 2008; SU & ZHU, 2008; GAO *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2012, ALVES *et al.*, 2018). E que *Medicago sativa L.* realmente é capaz de remediar HPA em solos contaminados (KIRK *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2008 e WANG *et al.*, 2012, ALVES *et al.*, 2018).

Contudo, tal qual ocorre em ensaios com fenantreno, esse perfil de remediação de *Medicago sativa L.* quando na presença de antraceno é afetado pela concentração inicial dos contaminantes e do tempo de exposição ao mesmo, onde conforme ocorre o aumento da concentração inicial de antraceno, o papel da planta dá espaço a ação isolada da bactéria como protagonista do processo de remediação. Como observado em solos contendo 150 de HPA total, onde os tratamentos com *Medicago sativa L.* (com ou sem BR 7411) apresentaram percentuais médios de remoção de antraceno em torno de 80 % logo nos primeiros 10 DAS, já em solos contendo 300 ppm de HPA total esses percentuais caem para em torno de 35 à 40 % nos primeiros 10 DAS. Mas passados 20 DAS, a presença do consórcio planta x bactéria ganha destaque por proporcionar percentuais de remoção próximos a 80 %, enquanto que, para a ação isolada de BR 7411 e *Medicago sativa L.* os percentuais de remoção de antraceno se mantem em torno de 50 %. Por fim, em ensaios contendo 450 ppm de HPA total, o papel de remediação de antraceno fica a cargo da cepa BR 7411, que sozinha, remove

cerca de 40 % dos HPA logo nos primeiros 10 DAS, enquanto que os tratamentos com *Medicago sativa L.* só vão apresentar eficácia mais tardiamente, a partir de 20 DAS. Mas ainda assim, a cepa BR 7411 atinge valores maiores que 95 % de no tempo de 30 DAS.

Dessa forma, a ação da planta removeu o antraceno com maior facilidade e rapidez, sendo essa ação dependente da concentração (quanto maior a concentração, menor a eficiência da planta em remover o antraceno). Contudo, a remoção de antraceno torna-se mais eficiente com o passar do tempo, em tratamentos com a cepa BR 7411 conforme aumento da concentração dos contaminantes, onde em 450 ppm de HPA total esse cenário é melhor observado, onde ensaios com *Medicago sativa L.* (com ou sem BR 7411) apresentaram perfis similares de queda da concentração de HPA ao longo de 40 DAS, com uma tendência a valores mais baixos de concentração de fenantreno em tratamentos com o consórcio. Ainda assim, esses resultados não apresentam diferenças significativas nas concentrações e nem nos percentuais de remoção, quando comparados com o tratamento contendo só *Medicago sativa L.*, já a ação isolada da bactéria promoveu a queda mais rápida de antraceno, logo nos primeiros 10 dias, para perto de 100 mg.kg⁻¹, mantendo esse valor em 20 DAS, e reduzindo ainda mais em 30 DAS e 40 DAS, com valores abaixo de 25 mg.kg⁻¹, culminando como o melhor tratamento, atingindo cerca de 95 % de remoção de antraceno em 30 DAS.

Cabe destacar que o antraceno, dentre todos os HPA estudados nesse trabalho é o que apresenta a maior recalcitrância, mantendo suas concentrações iniciais em solos sem tratamento até final de 40 DAS, sendo o todos os tratamentos de remediação utilizados (planta, bactéria e consórcio) eficazes na remoção do antraceno, destacando assim o potencial dessas ferramentas para a remediação de solos contaminados com antraceno.

Contudo, de acordo com o relatório da CETESB (2014), pela primeira vez foram incluídos os valores orientadores para os solos e águas subterrâneas do estado de São Paulo, referentes ao antraceno, sendo esses valores muito acima do estudado nos ensaios dessa tese, totalizando valores de intervenção de 2300 ppm para áreas agrícolas, 4600 ppm para áreas residenciais e culminando em 10000 ppm para áreas industriais, sendo necessário ainda novos estudos para averiguar a capacidade da cepa BR 7411 e *Medicago sativa L.* em remediar solos com essas características.

Os resultados aqui não excluem a possibilidade da formação de espécies químicas no solo, derivados do antraceno, que apresentam potencial mais tóxico, que por sua vez sejam capazes de serem remediados em ensaios similares, como o Benzo[a]antraceno, cujos valores de intervenção são drasticamente menores se comparados a espécie química aqui estudada, com valores de intervenção de 1.6 , 7 e 22 ppm para solos agrícolas, residenciais e industriais respectivamente (CETESB, 2014). Dessa forma, o potencial para degradação de antraceno pela cepa BR 7411 e *Medicago sativa L.*, apresentado nessa tese, contribuirá para o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias que possam vir a remediar solos contaminados, com essas espécies químicas tóxicas e recalcitrantes.

Quanto ao desempenho das alfafas e da bactéria, analisando os potenciais de remediação de pireno, para as três concentrações estudadas (50, 100 e 150 ppm), a ação sinérgica entre a cepa e planta foi o tratamento que promoveu a remoção de 70 % do pireno logo nos primeiros 10 DAS, sendo possível atingir valores próximos a 80 % ao final 40 DAS, em ensaios contendo 50 ppm de pireno inicial. Não houve diferença entre os tratamentos isolados, porém também foram eficientes na remoção de pireno, com remoção acima de 70 % em 20 DAS e mais de 80 % em 40 DAS, porém o pireno tendeu a ser eliminado mais rapidamente utilizando o consórcio como ferramenta de remediação, quando comparado com os tratamentos isolados.

Esse perfil de remediação se manteve em concentrações mais elevadas de pireno, mas tal qual nos tratamentos contendo fenantreno e antraceno, a concentração dos HPA e os percentuais de remoção de pireno apresentaram valores atenuados conforme o aumento da concentração do contaminante. A ação do consórcio obteve percentuais de remoção de 45 % em 10 DAS, sendo o único tratamento a chegar nesse valor em 10 DAS para a concentração inicial de 100 ppm de pireno inicial, vide que os tratamentos isolados se comportaram como atenuação natural, atingindo máximo de remediação em torno de 65 % ao fim do experimento em 40 DAS. Já na concentração mais alta de pireno, em 150 ppm, os tratamentos isolados apresentaram-se indiferentes, obtendo para esse HPA uma baixa eficiência de remoção, de apenas 5 % de remoção em 10 DAS. Somente a partir de 20 DAS os tratamentos de remediação conseguiram se igualar atingindo potenciais de remoção próximos de 65 %, e a partir de 30 DAS, os tratamentos isolados tornam-se mais

eficientes destacando a cepa BR 7411 com um melhor rendimento ao final do experimento, como remoção média de 85 %.

Dessa forma, o pireno tendeu a ser eliminado mais rapidamente utilizando o consórcio como ferramenta de remediação, nos primeiros dias de análise (10 DAS) sendo esse resultado presente nas concentrações mais baixas, (entre 50 e 100 ppm) contudo, a ação isolada da bactéria apresentou melhor resultado a longo prazo no final de 40 DAS para concentrações mais elevadas, como 150 ppm, onde o pireno tendeu a ser eliminado com mais facilidade, com a ação isolada da cepa BR 7411, onde a mesma eliminou metade do contaminante em 20 DAS e mais de 85 % em 40 DAS.

Para os ensaios com o HPA pireno, os dados encontrados vão de encontro com os dados da literatura, onde demonstram que a utilização de inóculos microbianos pode acelerar a degradação dessas substâncias químicas na rizosfera (LISTE & PRUST, 2006). Onde de forma conjunta, vegetais e microrganismos, podem remediar ambientes contaminados de maneira mais eficiente, aumentando a mobilidade e a biodisponibilidade de poluentes orgânicos (NOVAK *et al.*, 1995; XING & PIGNATELLO, 1998; OLSON *et al.*, 2003; READ *et al.*, 2003).

Esses achados suportam a hipótese de que a cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* e plantas de *Medicago sativa L.*, cultivadas em consórcio ou isoladamente, podem contribuir na degradação da HPA em poucos dias. Além disso, esforços adicionais como feitos nesse trabalho são de grande importância para a área da fitorremediação, pois contribuem elucidando os benefícios no uso desses simbioses bacterianos associados a leguminosas, durante o processo de fitorremediação quando cultivados em consórcio, e seus papéis individuais, quando avaliados os potenciais de remediação em ensaios isolados.

A relevância ecológica desta simbiose em ambientes contaminados também está diretamente ligada com a incorporação de nitrogênio em sistemas contaminados e, conseqüentemente, na melhoria de desintoxicação ou degradação dos HPA em solos contaminados. Por serem bactérias rizosféricas de sucesso, a cepa BR 7411 pode contribuir como uma ferramenta eficaz na remediação pois, de acordo com a literatura e com os resultados presentes nessa tese, a mesma apresenta o potencial

de co-metabolismo, onde a presença de substâncias orgânicas no solo (sejam elas oriundas da planta através de exsudados, ou matéria orgânica de animais) como também as obtidas internamente nos tecidos vegetais (quando em associação simbiótica) pode ser a chave que inicia a degradação dos contaminantes no solo, sendo esse co-metabolismo um produto da coevolução com as plantas, para “lucrar” com presença de exsudados e de substâncias derivadas do solo, onde estes organismos podem utilizar simultaneamente diferentes fontes de carbono (ROMANOV e MARTÍNEZ-ROMERO, 1994).

A degradação bacteriana das substâncias do solo beneficiaria não só as bactérias, mas também as plantas. Flavonóides, por exemplo, encontrados nos exsudados radiculares, podem estimular a expressão gênica bacteriana responsável pela degradação bifenilaspolicloradas, através de dioxigenases (CROWLEY *et al.*, 1997; GILBERT *et al.*, 1997; PHAM *et al.*, 2012), em estudos anteriores, também foi possível observar que o ácido linoléico atuaria como um poderoso estimulante da degradação do pireno e do benzo[a]pireno, e sugeriram que níveis elevados desse ácido graxo, comum nos tecidos vegetais de certas espécies, podem ser um determinante importante para o co-metabolismo desses contaminantes (YI & CROWLEY, 2007). Demonstrando a eficácia da planta na estimulação da biodegradação do HPA, promovendo o fenômeno de rizoremediação, estimulando os processos de degradação microbiana na vizinhança das raízes, principal o processo para remoção de HPA em solo “envelhecidos” (YI & CROWLEY, 2007).

Isto tem sido atribuído a um efeito geral da rizosfera que pressupõe o enriquecimento fortuito de microrganismos degradadores de HPA na rizosfera vegetal, evento este observado nos ensaios contendo o consórcio planta e bactéria nesta tese, onde no tempo de 30 DAS, o número de indivíduos da cepa BR 7411 atingiu cerca de 80 UFC.g⁻¹ de solo. Bem como a possível indução de enzimas que degradam HPA através da secreção de compostos que causam o co-metabolismo destes, além disso, a liberação de surfactantes ou fitoquímicos também contribuem para o aumento da biodisponibilidade dos HPA pouco solúveis, permitindo assim a absorção dos mesmo para dentro dos tecidos vegetais, sendo posteriormente degradados pelo maquinário bioquímico da planta, promovendo assim a bioestimulação, seguida de degradação dos compostos na rizosfera (MIYA *et al.*, 2001; PHILLIPS *et al.*, 2006).

O estudo desses exsudados e compostos orgânicos presentes na rizosfera poderia ser útil, em trabalhos futuros, para o desenvolvimento de critérios para prever quais espécies de plantas são mais eficazes na remediação desses contaminantes, e também pode levar a novas tecnologias para adicionar esses produtos diretamente aos solos, na forma pura ou em resíduos de plantas, para bioestimular microrganismos degradadores da HPA (YI & CROWLEY, 2007). O solo é um depósito de matéria orgânica de plantas ou insetos, contendo lignina, celulose, quitinas, ceras ou compostos fenólicos. Estruturalmente, parte das moléculas derivadas de planta ou inseto podem se assemelhar aos HPA, ou a outros contaminantes (VELA *et al.*, 2002), sendo assim, bactérias rizosféricas como a cepa BR 7411 e a planta *Medicago sativa L.*, capazes de degradar tais substâncias naturais poderiam ser pré-adaptadas para degradar outros compostos similares aos HPA, apresentando o maquinário capaz de degradar essas espécies químicas.

Na presente tese, é mostrado pela primeira vez que, a cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em consórcio com a cv. Crioula de *Medicago sativa L.*, não apenas tolera, mas também é capaz de degradar pireno, antraceno e fenantreno. Como também, a cepa e da planta, isoladamente, serem capazes de degradar esses HPA em microcosmos estéreis, sendo a degradação dependente da espécie química do HPA e da concentração inicial do contaminante presente no solo em estudo, com uma tendência a degradar mais rapidamente compostos com presença de região de baía e região K, como o fenantreno e o pireno, seguido do antraceno (mais recalcitrante), sendo esse perfil também observado em trabalhos prévios (Alves, 2014 e Alves *et al.*, 2018), como também a capacidade da cepa de cometabolizar os três HPA, (em ensaios em meio líquido) com a presença sacarose, e ser capaz de promover a remoção de mais de 90 % dos HPA em todas as concentrações ao final de 40 DAS.

Estratégias envolvendo a aplicação de BR 7411 em cultivos de alfafa, para fitorremediação de HPA, tem sido empregadas de forma muito reduzida (López-Ortiz *et al.*, 2012), mas trabalhos como este mostram que o emprego desta tecnologia poderia ser vantajosa, uma vez que estas bactérias são seguras e capazes de fixar nitrogênio, especialmente quando o nitrogênio é um nutriente limitante em ambientes contaminados.

6.4. Análise proteômica quantitativa de proteínas de baixa abundância (LAPs) de *Medicago sativa* L., cultivada em solos contaminados com HPA e suas proteínas relacionadas a fitorremediação (PRFs).

Tendo em vista a capacidade de desenvolvimento da alfafa em solos contaminados e a sua capacidade de fitorremediação, foi avaliado também o perfil protéico de *Medicago sativa* L. em busca de proteínas que estivessem relacionadas com o processo de fitorremediação, focando principalmente nas proteínas de baixa abundância, enriquecidas pelo processo de depleção de RuBisCO, presentes em tecidos aéreos de *Medicago sativa* L. cultivados em solos contaminados com 300 ppm de HPA total por 20 DAS.

Nestas análises foi observado que a técnica de extração de proteínas com Tris-MGg/NP-40 seguido de depleção da RuBisCO com sulfato de protamina foi muito bem sucedida, permitindo enriquecer as amostras com proteínas de baixa abundância, como também a detecção de várias bandas em géis de poliacrilamida que não eram facilmente detectadas em amostras contendo a RuBisCO não depletada, dessa forma, bandas pertencentes as faixas de entre 45 e 20 kDa e acima de 60 kDa, apresentaram bandas mais nítidas e intensas indicando o enriquecimento de proteínas de baixa abundância.

De acordo com a literatura, é largamente conhecido que a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase (RuBisCO) é a proteína mais abundante presente em plantas, e também a proteína mais abundante do planeta (ELLIS, 1979), o que dificulta a análise profunda do proteoma foliar, sendo assim a técnica empregada nessa tese obteve resultados muito semelhantes a outros autores, reforçando o potencial dessa técnica como eficaz no estudo de proteínas de baixa abundância, como nos trabalhos de Kim *et al.*, (2013) que descreveram o presente método de precipitação de sulfato de protamina para a depleção de RuBisCO. A eficácia da técnica desenvolvida por Kim *et al.*, (2013) pode ser comprovada graças a não detecção da subunidade menor da RuBisCO por análise de transferência de *Western*, em amostras depletadas. Contudo para averiguá-la nesta tese, submetemos as amostras de LAPs a espectrometria de massas (ESI-Q-TOF) e obtivemos o resultado de que as amostras não apresentavam *hits* pertencentes as subunidades menores e maiores da RuBisCO, comprovando assim a eficácia da depleção.

Além disso, de acordo com a ANVISA, as protaminas são proteínas de baixo peso molecular, de caráter básico e ricas em arginina, sendo originalmente extraídas do esperma do salmão e outros peixes da família Salmonidae (JAQUES L. B., 1973). Graças a natureza proteica da protamina, a mesma torna-se uma ferramenta extremamente eficaz nos estudos proteômicos, pois não é um interferente para etapas de espectrometria de massas, substituindo assim, outros agentes utilizados na depleção de RuBisCO que apresenta essa característica nociva, como o polietilenoglicol (PEG) (KIM *et al.*, 2001; XI *et al.*, 2006).

Analisando o perfil protéico das partes aéreas de *Medicago sativa L.* cultivadas em solos contaminados com 300 ppm de HPA na presença e ausência da cepa BR 7411, nota-se que há mudanças no perfil protéico das amostras de LAPs oriundas de tratamentos sem BR 7411. Plantas cultivadas na presença dos HPA apresentaram aumento na intensidade de bandas acima de 20 kDa, contudo as bandas protéicas abaixo dessa marca (20 kDa) foram as que mais se destacaram do controle, podendo serem candidatas a potenciais PRFs, esse aumento das proteínas abaixo de 20 kDa também foi observado em ensaios anteriores para *Medicago sativa L.* (ALVES, 2014), com a identificação de proteínas diretamente relacionadas a degradação de HPA, presentes em bandas mais expressas nas regiões de 50 kDa, 34 kDa e 15 kDa em géis contendo amostras ressuspensas em tampão SDS 10 %, sendo essas bandas mais intensas quando comparadas com bandas protéicas de extratos de plantas cultivadas em solo controle. Um exemplo dessas PRFs foi a Salicilato1-monoxigenase, ou Salicilato hidrolase (EC: 1.14.13.1), uma enzima da família das oxidoredutases, que age sobre doadores emparelhados com a incorporação de oxigênio molecular, tendo NADH ou NADPH como doadores de elétrons, incorporando um átomo de oxigênio para o outro doador, geralmente um substrato orgânico. De acordo com o autor, esta enzima participa de vias metabólicas de degradação de HPA como o 2-metil-naftaleno, naftaleno, antraceno e fluoreno (ALVES, 2014).

Resultados similares foram relatados na literatura no trabalho de Xu *et al.*, (2007), onde foi analisado o perfil protéico de plantas de milho quando submetidas a presença de pireno. Também foi possível observar que as bandas em torno de 50 e 35 kDa foram mais expressas que as bandas do controle, comparadas ao pireno no

ambiente. Sendo assim, o autor sugeriu que essas proteínas também estariam executando um papel majoritário na degradação de pireno.

Nesta presente tese, foi visto pela primeira vez o perfil protéico de plantas cultivadas na presença de HPA e submetidas a inóculos bacterianos de BR 7411, onde analisando a ação da cepa BR 7411 para o perfil protéico das plantas cultivadas na presença e ausência de 300 ppm de HPA, podemos observar a existência de expressões diferenciais de três bandas ao redor de 14,4 e 21,5 kDa (setas 1, 2 e 3) sendo mais expressas na presença do HPA do que comparadas as condições controle, sendo a banda de 14,4 kDa uma região importante, vide que tende a ser mais expressa quando na presença dos contaminantes. Através desses resultados, podemos inferir que essa região de 14,4 kDa, diferencialmente expressa, pode vir a conter proteínas de baixa abundância relacionadas a fitorremediação, ou seja, potenciais PRFs, sendo essas diferenças presentes nessa região dificilmente observada em amostras que não sofreram o processo de depleção da RuBisCO, pois é uma região média onde a subunidade menor da RuBisCO tende a aparecer como majoritária. Dessa forma, a técnica de depleção da RuBisCO permitiu a observação dessas diferenças, e estes dados poderão ser úteis no futuro para etapas de identificação de proteínas relacionadas a fitorremediação, envolvendo o consórcio planta x bactéria endofítica, como também, análises futuras de proteômica quantitativa.

Outro importante destaque foi a análise do perfil protéicos dos extratos contendo a RuBisCO depletada. Geralmente, por se tratar de uma técnica de depleção, essa fração rica em RuBisCO é considerada um resíduo do processo de enriquecimento das LAPs, sendo descartada ao final do experimento (KIM *et al.*, 2013) onde o foco de análise são as proteínas de baixa abundância. Contudo, sabendo que os trabalhos pioneiros de Xu *et al.*, (2007) sugeriram a hipótese de que a proteína RuBisCO poderia ter um papel importante para a remediação de pireno em plantas de milho, foi feita a análise desses extratos ricos em rubisco e foi possível constatar que a hipótese de Xu *et al.*, (2007) estava correta.

Essa conclusão pode ser obtida graças ao aumento significativo da intensidade das bandas da RuBisCO quando na presença de HPA, em plantas sem a presença da cepa BR 7411 (mesma condição utilizada por XU *et al.*, 2007), dando a entender

que a RuBisCO estaria diretamente relacionada a resposta ao contaminante, sendo uma proteína superexpressa naturalmente na presença de HPA. De acordo com os resultados obtidos nos estudos de Xu *et al.*, (2007) o mesmo sugeriu a participação da proteína Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) como sendo possivelmente envolvidas no processo de fitorremediação de pireno. Tal proteína também está envolvida na resposta a outros tipos de estresses ambientais como observado em trabalhos que demonstram alterações na indução da subunidade maior da RuBisCO pela seca e pelo calor em plantas de milho, arroz e trigo (TOUZET, *et al.*, 1996, ROSEN, *et al.*, 2002, SALEKDEH & SIOPONGCO, 2002).

Tendo em vista que a RuBisCO é uma das enzimas chaves do ciclo de Calvin-Benson-Bassham, uma proteína multimérica composta por oito grandes e pequenas subunidades realizando diferentes funções, Xu *et al.*, (2007) sugeriram que a subunidade maior da RuBisCO tinha níveis maiores de expressão na presença de pireno quando comparado com outras proteínas, sugerindo como uma possível proteína relacionada a fitorremediação (PRF). Embora seja desconhecido um papel direto da subunidade maior da RuBisCO na degradação de poluentes orgânicos, os autores sugeriram que a proteína exerça a função de uma dioxigenase, fato esse não comprovado pelo autor. Tal enzima é encontrada em bactérias, transformando compostos como o pireno em subprodutos de degradação como o salicilato.

Contudo, ao utilizar uma técnica que permite separar a RuBisCO do restante das proteínas e comparando os resultados obtidos nessa tese com os obtidos por Xu *et al.*, (2007), podemos complementar a sua hipótese e acrescentar que a subunidade que estaria nitidamente relacionada seria a subunidade menor da RuBisCO, vide seu aumento significativo da expressão observado nas amostras cultivadas na presença de HPA, e não somente a subunidade maior da RuBisCO, sendo a subunidade menor uma potencial proteína relacionada a fitorremediação.

Um fator que poderia reforçar essa hipótese seria o fato de que em plantas inoculadas com a cepa BR 7411, a expressão da subunidade menor da RuBisCO foi diminuída, obtendo bandas protéicas de intensidade similar a do controle sem tratamento. Tendo em vista que a ação conjunta, planta / bactéria, favoreceu uma melhora na fisiologia da planta, aprimorou o potencial de remediação (20 DAS sem solos com 300 ppm de HPA total), e previamente foi comprovada que a cepa possui

potencial para degradar os HPA estudados, sugerindo que a presença da cepa permite que a planta não necessite aumentar sua expressão da subunidade menor em resposta aos HPA, levando seu estado fisiológico a uma normalidade.

De acordo com os trabalhos de Tabita *et al.*, (2008) a RuBisCO tem um problema inato em que o intermediário enediolato de RuBP (Ribulose-1,5-bisfosfato) que geralmente atua como um aceptor de CO₂, também pode ser atacado por outros ligantes, incluindo oxigênio molecular, de tal forma que CO₂ e O₂ competiriam para a formação do intermediário enediolato, no mesmo sítio ativo. Sendo assim, a promiscuidade do intermediário enediol, permite que RuBisCO funcione como uma monooxigenase interna, bem como uma carboxilase, com o único produto, 2-fosfoglicolato (2-PG), formado como resultado da fixação de O₂, no processo de fotorrespiração. Já Peterhansel *et al.*, (2010) aponta que a captação de O₂ pela RuBisCO e o subsequente metabolismo do produto da reação na via fotorrespiratória é o segundo maior fluxo metabólico nas plantas por trás da fotossíntese, com taxas de fluxo em torno de 25 % da taxa fotossintética a 25 °C , dessa forma os fluxos fotorrespiratórios são ainda maiores sob condições de crescimento quente e seco, pois 1) a especificidade de RuBisCO para o CO₂ em relação ao O₂ diminui com a temperatura 2) A solubilidade do O₂ em soluções aquosas como o citoplasma e o estroma do cloroplasto é menos afetada por temperaturas mais altas que a solubilidade do CO₂, e por fim, 3) plantas expostas ao fornecimento limitado de água reduzem as trocas gasosas para minimizar a evaporação. Dessa forma, as concentrações de CO₂ em torno de RuBisCO diminuem rapidamente enquanto o O₂ está disponível em excesso favorecendo a ação monooxigenase sobre a ação carboxilase (PASTENES & HORTON (1996).

Tento em vista que as temperaturas foram mantidas estáveis no ensaio de fitorremediação desta tese, a fotorrespiração por ação da elevação da temperatura estariam descartadas, mas sabendo que a presença de HPA pode diminuir o aporte de água para os tecidos aéreos, como tratado por Xu & Johnson (1995), Hester & Mendelsohn (2000) e Pezeshki *et al.*, (2000), onde a presença de poluentes orgânicos como petróleo e seus derivados, quando absorvidos pelas raízes dos vegetais, formariam uma película que impermeabiliza a superfícies das raízes impedindo a captação de água e sais minerais do solo, o fornecimento limitado de

água reduziria as trocas gasosas para minimizar a evaporação, favorecendo a fotorrespiração e fazendo com que as subunidades da RuBisCO atuassem como monooxigenase.

Contudo, o aumento da expressão das subunidades menor e maior da RuBisCO não poderia ser atrelado a fotorrespiração por limitação de água, pois de acordo com relatos na literatura, a seca pode gerar a diminuição da expressão da RuBisCO (PARRY *et al.*, 2002). A quantidade de RuBisCO nas folhas é controlada pela taxa de síntese e degradação. Mesmo sob estresse hídrico, a holoenzima RuBisCO é relativamente estável, com uma meia-vida de vários dias (WEBBER *et al.*, 1994). No entanto, o estresse hídrico leva a uma rápida diminuição na abundância de transcritos da subunidade pequena da RuBisCO (*rbcS*) o que pode indicar diminuição da síntese (PARRY *et al.*, 2002). Dessa forma, a ação da subunidade menor da RuBisCO poderia ser direta, em relação aos HPA, funcionando como uma monooxigenase capaz de oxidar os HPA ou intermediários metabólicos da degradação do mesmo, como as proteínas pertencentes a rotas de degradação de fase I, relatadas nos estudos de Sandermann, (1999) sobre a teoria do “fígado verde”, onde o mesmo dizia que as plantas parecem conter isoenzimas com especificidade para substratos secundários vegetais ou xenobióticos, atuando na oxidação desses compostos, tornando os mesmos mais solúveis e deslocando os para outros locais dentro da célula para degradação ou conjugação.

Até o presente momento, esse é o primeiro estudo que mostra a resposta da subunidade menor da RuBisCO, oriundas de plantas de *Medicago sativa L.*, a presença de HPA em solos contaminados, utilizando proteômica quantitativa (*Label-free*), sendo o aumento dessas proteínas em resposta ao HPA observados previamente apenas de forma qualitativa na literatura, utilizando SDS-PAGE bidimensional para plantas de *Scirpus triqueter* cultivadas na presença de pireno (ZHANG, *et al.*, 2013). Como também, este é o primeiro estudo a avaliar a influência da bactéria simbiote *Ensifer meliloti* na expressão da subunidade menor da RuBisCO em resposta aos HPA. Propondo assim a hipótese de que a subunidade menor da RuBisCO tenha um papel chave na remediação dos HPA estudados, atuando como uma potencial proteína relacionada a fitorremediação, sendo essa uma nova função atribuída a esta proteína, vide as evidências que mostram que a fotorrespiração não

seria atrelada ao aumento dessa expressão, mas sim a resposta aos HPA. contudo, ainda são necessários estudos mais aprofundados para definir o papel da expressão da RuBisCO tanto em quadros de estresse hídrico, como a resposta aos HPA, pois também existem relatos de que a expressão gênica da subunidade maior da RuBisCo foi aumentada fortemente sob condição de estresse hídrico no tabaco e que o papel putativo desta proteína no mecanismo de tolerância à seca requer mais investigação (GHATAK *et al.*, 2017).

Além disso, para responder de forma quantitativa o papel da RuBisCO e por sua vez, identificar as demais PRFs presentes nas amostras de proteínas de baixa abundância em partes aéreas de *Medicago sativa L.*, foi utilizado a técnica de proteômica quantitativa (*Label-free*), seguida de classificações funcionais das proteínas e suas interações de acordo com suas funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares.

Ao todo, foi possível identificar 709 proteínas (Apêndice A), onde 42 proteínas foram diferencialmente expressas, com *fold change* > 2, entre as duas condições, sendo 24 proteínas identificadas em plantas cultivadas em solo contaminado com 300 ppm de HPA total, como sendo mais expressas nessa condição, e 18 proteínas identificadas como mais expressas em plantas controle.

Dentre as 18 proteínas mais expressas no controle, podemos observar que em sua maioria, as mesmas estão relacionadas a biossíntese da parede celular e crescimento do vegetal como a *Fasciclin-like arabinogalactan protein*, a *Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase* e a *Auxin transporter BIG*, previamente discutidas, quanto sua importância no fenótipo das plantas submetidas a solos contaminados com HPA, onde sua expressão é menor, contribuindo para o surgimento de plantas com as regiões de entrenós menores. Como também podemos encontrar grande número de proteínas associadas a fotossíntese e metabolismo energético, indicando que a presença aos HPA influencia negativamente nesses processos fisiológicos da planta.

Em comparação entre as proteínas mais expressas em amostras controle, 19,14 % de proteínas estavam associada ao metabolismo energético e 9,81 % a fotossíntese, sendo esses valores mais elevados do que os obtidos para as amostras de 300 ppm de HPA total, que obtiveram percentuais de 15,95 % (M. energético) e

5,39 % (Fotossíntese), dando a entender que a presença dos HPA contribuiu negativamente para expressão dessas proteínas relacionadas a fotossíntese e metabolismo energético.

Como apontado em trabalhos anteriores (ALVES, 2014) esses resultados podem estar relacionados com o fenótipo de estresse observado para essas plantas em estudo. Onde as proteínas relacionadas ao metabolismo energético, em sua maioria, foram proteínas pertencentes ao maquinário fotossintético da planta, como subunidades do centro de reação dos fotossistemas I e II (PSI e PSII), que operam em série para realizar as reações de armazenamento de energia. Também foram encontradas proteínas de antena do complexo coletor de luz II (LHCII), responsáveis pela captação de luz e rápida transferência para pigmentos antena adjacentes, intimamente ligados ao centro de reação dos fotossistemas (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Dentre as mais afetadas, podemos destacar a proteína "*Photosystem I subunit O*" ao qual obteve *fold change* infinito em amostras controle, indicando por sua vez, a total ausência dessa proteína em amostras cultivadas em 300 ppm de HPA ou valores muito baixos para serem detectados, e por sua vez, quantificados pela técnica de proteômicas quantitativa. Nos trabalhos de Jensen *et al.*, (2004) foi observado o papel do PSI-O, encontrada principalmente em organismos eucariotos, através de abordagem genética reversa, transformando plantas de *Arabidopsis* com uma construção de RNA de interferência (RNAi) contendo o cDNA do *psaO* sob o controle de um promotor constitutivo forte, onde ao final, o autor apontou que plantas sem PSI-O obtiveram redução de 50 % no estado de transição, indicando um papel para PSI-O no balanceamento da energia de excitação entre os dois fotossistemas I e II, estando assim envolvidos na formação de um domínio no PSI permitindo a interação com o complexo de coleta de luz do tipo II e proteínas ligantes de clorofila a e b. Proteínas estas, também identificadas nesta tese, em amostras controle como proteínas com *fold change* superior a 3,5 ("*Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic*") como também proteínas associadas ao fotossistema II ("*Photosystem II CP47 reaction center protein*") codificadas pelos genes *psbB*, que são proteínas de clorofila que possuem as antenas proximais do fotossistema II (PSII), fornecendo um canal para a transferência de energia de excitação das antenas externas do fotossistema (as proteínas de clorofila intrínsecas de coleta de luz em algas verdes e

plantas superiores, e os ficobilossomos extrínsecos na maioria das cianobactérias e algas vermelhas) para o núcleo do centro de reação (KNOETZEL, *et al.*, 2002) .

Sendo assim, a diminuição da expressão dessas proteínas em plantas cultivadas da presença de HPA afetam diretamente a fotossíntese (SALISBURY & ROSS, 2012). A diminuição do tamanho de *Medicago sativa L.*, como também os sintomas de clorose observados em plantas cultivadas em solo contaminado, podem estar relacionados com o menor número de proteína classificadas para o metabolismo energético e fotossíntese, identificadas em plantas cultivadas na presença de HPA.

Na literatura, cloroplastos são o primeiro alvo de ataques dos HPA. Ahammed, *et al.*, (2012) mostraram que a concentração de clorofilas a, b e carotenóides foram reduzidas pelo tratamento com fenantreno, estando associado a diminuição da síntese de proteínas do metabolismo de clorofila, como “*Mg-protoporphyrin IX chelatase*”, identificada nesta tese como um *fold change* de 2,81, sendo mais expressa em amostras controle e a “*glutamate 1-semialdehyde aminotransferase*”, com *fold change* de 2,07 identificada nas mesmas condições. Rao *et al.*, (2006) afirmam que a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) por fenantreno pode ser o fator responsável pela perda de pigmentos fotossintéticos, induzindo mudanças em seus conteúdos, promovendo mudanças nos processos primários da fotossíntese. As taxas de absorção de CO₂ podem ser reduzidas quando na presença de HPA, levando ao retardo no crescimento e incorporação de biomassa dos vegetais (AHAMMED *et al.*, 2012).

Outro destaque foi a proteína “*Heat shock cognate 70 kDa protein*”, identificada contendo uma maior expressão em amostras controle, com um *fold change* bastante elevado de 11,59. Esta proteína é também conhecida como HSPA8, um membro da família da proteína de choque térmico 70 (Hsp70), estas auxiliam no balanço de enovelamento, montagem e degradação de proteínas em condições fisiológicas e de estresse, (CLÉMENT *et al.* 2011), como também, desempenham um papel importante na desmontagem de grandes complexos macromoleculares como os complexos de origem de replicação de DNA e vesículas revestidas com clatrina (ALAM & ROCHON, 2016). Contudo, em vegetais pouco se sabe sobre as funções fisiológicas da Hsc70, mas na literatura, existem relatos de que a Hsc70 seria importante para função meristemática e tolerância ao choque térmico, metais pesados, raios-g e sal , como

também, seria importante para o fechamento estomático e fornecendo funções essenciais nas plantas para integrar sinais de seus ambientes bióticos e abióticos. (CLÉMENT *et al.*, 2011). Tendo em vista a relação com esses estresses, as Hsc70s a diminuição dessas proteínas em plantas cultivadas em solos contaminados pode estar contribuindo para resposta ao estresse em *Medicago sativa* L., causado pelos HPA estudados nesse trabalho.

As 24 proteínas mais expressas em partes aéreas de plantas cultivadas na presença de 300 ppm de HPA total, foram unidas a um grupo de 30 proteínas, potenciais candidatas a PRFs, detentoras de funções biológicas importantes para a fitorremediação, como “transporte e catabolismo”, “resposta ao estresse”, “metabolismo e resistência a drogas” e “biodegradação e metabolismo dos xenobióticos”, sendo estas funções também detentoras do maior percentual de distribuição em plantas cultivadas na presença dos HPA, quando comparados ao controle. Dentre as 54 candidatas a PRFs em *Medicago sativa* L., proteínas associadas a biodegradação e metabolismos de xenobióticos foram ausente no controle, sendo por sua vez únicas para as amostras cultivadas em solo contaminado.

Dentre as proteínas relacionadas a biodegradação e metabolismos de xenobióticos, foi possível identificar 9 proteínas sendo 2 delas detentoras de um *fold change* maior que 3, sendo as mesmas a “*Vacuolar import/degradation, VID27-like protein*” com *fold change* igual 6,49 e a proteína “*Cytochrome P450 family protein*” com *fold change* igual a 3,53.

As proteínas do tipo VID27 são proteínas citoplasmáticas essenciais para a degradação da FBPase (Frutose 1-6 bisfosfatase), a importação da enzima é feita até vesículas específicas de VID e entregue ao vacúolo para proteólise. Outra via de degradação da FBPase independentemente da proteólise vacuolar ocorre com a poliubiquitinação da FBPase é degradação por proteassoma 26S. (HUANG *et al.*, 1997; HUNG *et al.*, 2000). Em plantas, a ação da FBPase é de extrema importância pra fotossíntese. Nos trabalhos de Tamoi *et al.*, (2011) aumentos na atividade de FBPase levam a um aumento na capacidade de biossíntese de sacarose e eficiência de translocação de sacarose pelos tecidos vegetais aéreos. Na batata transgênica, uma redução de 45 % na atividade da FBPase citosólica não causou nenhuma alteração mensurável no crescimento, rendimento ou atividade fotossintética,

contudo, mais de 80 % de redução levou a uma diminuição na atividade fotossintética e o acúmulo de vários metabólitos. Tendo em vista a ausência de mais estudos elucidando a função “Vacuolar import/degradation, VID27-like protein”, além da atuação dessas proteínas VID-27 na importação e degradação de FBPase, a sua relação com o estresse a presença dos HPA não é bem documentada na literatura, sendo esse até o presente momento, o único a estudo que apresenta o aumento da expressão da proteína “Vacuolar import/degradation, VID27-like protein” em resposta a presença de 300 ppm de HPA total, sugerindo a mesma como uma potencial PRF.

Contudo, o que chama a atenção dessa proteína para ocupar a função de biodegradação e metabolismos de xenobióticos, é a presença de um domínio de interação proteína-proteína (IPP) que vem ganhando destaque em trabalhos recentes (SCHAPIRA *et al.*, 2017) chamado *WD40 repeat (WDR) domain*, presente em humanos, tipicamente denominado como um domínio β -propeller de sete lâminas. É importante ressaltar que o poro central do domínio WDR frequentemente medeia as interações com regiões peptídicas dos principais parceiros de interação (proteínas) e, às vezes, tem tamanho e características físico-químicas apropriadas para a ligação de alta afinidade a pequenas moléculas semelhantes a drogas (SCHAPIRA *et al.*, 2017).

Tendo em vista esses dados, podemos sugerir que talvez os HPA ou compostos derivados, podem estar sendo carregados para dentro de vesículas associadas a essas proteínas VID27 com domínios WD40, internalizando os mesmos em um ambiente longe do citoplasma e capaz de ser carregados para outros destinos dentro da célula, podendo ser conjugado com moléculas orgânicas de diversas naturezas como glicose, fitoquelatinas, metalotioneínas, nicotinaminas, ácidos orgânicos como malato e citrato entre outros compostos mais complexos como GSH (PILON-SMITS, 2005). Tendo em vista a capacidade de ligar monossacarídeos a compostos orgânicos e por sua vez translocar-los para vacúolos específicos, a presença de FBPase em vacúolos do tipo VID27 podem ser capazes de incorporar xenobióticos como HPA, via domínios WD40.

Estudos têm mostrado que as proteínas WD40 fazem parte de um amplo espectro de componentes do citoplasma e nucleoplasma que podem desempenhar papéis-chave em vários processos biológicos importantes, incluindo transdução de sinal, tráfico de proteínas, modificação de cromatina e transcrição. várias proteínas contendo repetição WD40 demonstrou mediar o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas também possui relação com estresses abióticos, associado a sensibilidade ao estresse salino (KONG *et al.*, 2015)

Em plantas, esses domínios estão associados a formação da parede celular, onde atuam como plataformas rígidas que podem interagir com muitos parceiros, um fenômeno conhecido como “*moonlighting*”. Essa promiscuidade explica a ampla gama de processos celulares nos quais eles estão implicados abrangendo desde resposta ao estresse bióticos e abióticos, ao tráfego de vesículas intracelular e regulação transcricional. (GUERRIERO, *et al.*, 2015).

Já a proteína “*Cytochrome P450 family protein*” é uma proteína com vasta citação na literatura, associando-a a capacidade de biodegradação de contaminantes, como os HPA (BISHT *et al.*, 2015). As enzimas Citocromo P450 (CYP) são uma super família de proteínas heme ubíquas que estão envolvidas no metabolismo da fase I e na depuração de numerosos xenobióticos, tais como drogas terapêuticas, herbicidas e contaminantes industriais, sendo mais de 80 % das drogas comercializadas convertidas em compostos relativamente hidrofílicos pelas enzimas CYP no fígado, levando à sua depuração segura do corpo. Embora as enzimas CYP estejam principalmente envolvidas na desintoxicação de xenobióticos, várias enzimas CYP também ativam xenobióticos, como constituintes do tabaco e poluentes industriais, em compostos tóxicos ou carcinogênicos (KUMAR *et al.*, 2012).

Nas plantas, elas atuam diretamente nas etapas de fase I, tornando os contaminantes mais hidrossolúveis e auxiliando na ativação dessas moléculas orgânicas tóxicas, como herbicidas, bifenilas policloradas, HPA, derivados de petróleo e etc, para posteriores etapas de fase II e III de acordo com o conceito do “fígado verde” de Sandermann (ALVES, *et al.*, 2014). A identificação de proteínas CYP450 em *Medicago sativa L.* em resposta a presença de HPA em cultivos em condições assépticas, corrobora com a hipótese de que as plantas possuem maquinário bioquímico para lidar com a degradação desses compostos.

Dentre as demais proteínas detentoras da função de biodegradação e metabolismo de xenobióticos que merecem destaque, é a proteína “*Ion channel protein*” sendo a proteína com a maior expressão presente neste trabalho (*fold change* de 76,48), diretamente ligada a degradação de HPA, pertencente a família das glutatona transferases (GSTs), são ubiquamente encontradas em organismos aeróbicos, de bactérias a humanos (FROVA 2006). GSTs, tornaram-se conhecidas em plantas desde 1970, devido à sua capacidade de fornecer resistência a herbicidas no milho (DIXON & EDWARDS, 2010). Estas enzimas de fase II catalisam a conjugação da glutatona (GSH) (γ -Glu-Cys-Gly) a um substrato eletrofílico, muitas vezes hidrofóbico e tóxico (R-X), tendo como função principal inativar os compostos hidrofóbicos tóxicos que entram prontamente na célula e precisam ser eliminados, como HPA por exemplo, isto produz um peptídeo não - ou menos - tóxico R-SG e H-X (FROVA, 2006). Os substratos de GSTs podem primeiro precisar ser funcionalizados por enzimas de fase I, incluindo o citocromo P450s. A GST catalisa a substituição nucleofílica ou, com menor frequência, a reação de adição do substrato ao grupo sulfidríla (SH) da glutatona. Isso reduz a hidrofobicidade e “marca” o composto para transporte. As bombas dependentes de ATP na membrana vacuolar reconhecem e transportam conjugados para o vacúolo. A bomba de glutatona ou bomba de plantas GS-X é bioquimicamente idêntica à dos mamíferos (LANDA *et al.*, 2010). Estas proteínas podem conjugar metabólitos induzidos pelo estresse, incluindo 4-hidroxinonenal, um alcenóide citotóxico, como também, fitotoxinas produzidas por outras plantas, patógenos ou herbívoros, por exemplo, trigo e milho podem desintoxicar isotiocianatos, produzidos por espécies de *Brassica* sp. (CUMMINS *et al.*, 1997; FROVA 2006, DIXON & EDWARDS, 2010). Em trabalhos anteriores, essa proteína também foi identificada em ensaios proteômicos envolvendo o cultivo de plantas de *Medicago sativa* L. na presença de HPA (ALVES, *et al.*, 2014)

Outro destaque pode ser observado para as proteínas, “*Zinc-binding dehydrogenase family oxidoreductase*” e “*S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase*”, pertencentes as álcool desidrogenases (EC: 1.1.1.1), diretamente relacionadas a biodegradação e metabolismo de xenobióticos como também a degradação de HPA (ALVES, 2014). Essas proteínas são responsáveis por catalisar a redução de compostos carbonílicos a álcoois, e oxidação de álcoois aos compostos carbonílicos (THOMPSON, *et al.*, 2010), exibindo atividade catalítica na presença

NADH ou NADP(H) e suas respectivas formas oxidadas. Nos estudos de Sandermann, (1999) sobre o conceito do “fígado verde”, o mesmo dizia que as plantas parecem conter isoenzimas com especificidade para substratos secundários vegetais ou xenobióticos, sendo proteínas como a álcool desidrogenase participantes em conjunto com outras proteínas vegetais, como a citocromo P450 monooxigenase e as O, N, e S-Glicosiltransferases no processo de detoxificação de poluentes orgânicos.

De acordo com a KEGG, essa proteína atua nas rotas de degradação de vários compostos tóxicos como: Cloroalcanos, Cloroalcenos, Benzoato, Tolueno, Xileno, Dioxina e Naftaleno (um Hidrocarboneto Policíclico Aromático). Proteínas como esta também foram identificadas em trabalhos anteriores, envolvendo a fitorremediação de HPA por *Medicago sativa L.*, além de outras desidrogenases como a “*Acyl-CoA dehydrogenase*”, identificada e classificada como uma proteína relacionada ao metabolismo e degradação de xenobióticos e uma enzima que participa da rota de degradação de benzoato (ALVES, 2014).

Já as “*Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMP dehydrogenase)*” identificadas, podem estar atuando na biossíntese “*de novo*” do nucleotídeo de guanina. Onde estariam envolvidas na manutenção de *pools* celulares de desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos de guanina necessários para a síntese de DNA e RNA. A proteína codificada catalisa a oxidação, dependente de NAD, de inosina-5'-monofosfato em xantina-5'-monofosfato, que é então convertido em guanosina-5'-monofosfato (BUEY *et al.*, 2015). Tendo em vista que os HPA podem ser ativados pelas CYP450 e gerarem diolepóxidos, as guaninas são o principal alvo da ação desses compostos gerando adutos de DNA, essas “*Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMP dehydrogenase)*” podem estar cumprindo um papel importante na manutenção do código genético das plantas de *Medicago sativa L.* a “*Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMP dehydrogenase)*”, de acordo com o KEGG, também apresenta um papel importante no metabolismo de compostos aromáticos, purinas, do tipo fluoruracila, azatioprina e 6-mercaptopurina.

Outra proteína incluída na função de metabolismo e degradação de xenobióticos foi a “*Nucleoside diphosphate kinase*”, sendo o aumento da expressão desta proteína documentada na literatura em plantas de *Arabidopsis thaliana*, submetidas a condições de stress a HPA (LIU *et al.*, 2014). Esta proteína atua na

regulação e sinalização do metabolismo de estresse em plantas, onde sua superexpressão proporciona o aumento da atividade de várias proteínas associadas a estresse oxidativo, como superóxido dismutase [Cu-Zn] (SOD) catalases (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxirredoxinas (POD), glutathiona-S-transferase, glutathiona redutases (LIU *et al.*, 2014).

Proteínas associadas a estresse oxidativo (apresentadas anteriormente) foram identificadas como PRFs nesta tese, sendo mais expressas em plantas cultivadas na presença de 300 ppm de HPA, presentes nas funções de transporte e catabolismos, resposta aos estresse e metabolismos e biodegradação de xenobióticos respectivamente (“*Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)*” / “*Catalase (EC 1.11.1.6)*” / “*Peroxidase (EC 1.11.1.7)*” / “*S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (EC 1.1.1.284)*”). Dentre essas proteínas, destaca-se a “*Peroxidase (EC 1.11.1.7)*” que apresentou um *fold change* de 5,18 em tecidos vegetais cultivados na presença de 300 ppm de HPA. Esta é uma peroxidase classe III (*Horseradish peroxidase*) capaz de ser encontrada no meio extracelular como também ligada à membrana de tecidos vegetais, onde ocorre a oxidação de substratos aromáticos, como pigmentos, fenóis, HPA, BTEX dentre outros, usando H₂O₂ como co-substrato (GONZÁLEZ *et al.*, 2006). O envolvimento de peroxidases na polimerização oxidativa de fenóis é historicamente demonstrado por vários autores (KLIBANOV *et al.*, 1980, BUCHANAN *et al.*, 1997, WRIGHT *et al.*, 1999).

Quanto as proteínas associadas a função de resposta ao estresse, identificadas deste trabalho, pode-se destacar a proteína “*Cold Shock protein 2*”. Tendo em vista que uma quantidade considerável de pesquisas foi realizada para caracterizá-la em bactérias e animais, pouco se sabe sobre sua função nas plantas. A primeira proteína CSP de planta funcionalmente caracterizada foi a CSP de trigo (WCSP1) (KARLSON *et al.*, 2002, SASAKI & IMAI, 2012), que contém regiões ricas em glicina intercaladas com três dedos de zinco. A princípio, o RNAm de WCSP1 é regulado positivamente em resposta ao frio e a proteína correspondente é substancialmente acumulada no tecido da coroa durante a aclimação ao frio prolongado, sendo os níveis dos transcritos WCSP1 não modulados por outras tensões ambientais, como sal, seca e calor, ou tratamento com ácido abscísico (KARLSON *et al.*, 2002, SASAKI & IMAI 2012), sugerindo que a função da WCSP1 é específica para adaptação ao frio.

Contudo, neste trabalho podemos observar que a presença dos HPA promoveu o aumento significativo da expressão dessas proteínas, apresentando valores de *fold change* próximos a 4. Descartando a presença das tensões ambientais apresentadas anteriormente, vide o cultivo ter sido feito em condições controladas, uma hipótese para a explicação do aumento dessa proteína pode ser o fato de que as WCSP1 também apresentam domínios capazes de ligar-se ao DNA e RNA, promovendo a desnaturação desses ácidos nucleicos, em especial a dupla fita de DNA, sendo esse fenômeno descrito *in vitro* e *in vivo* (KARLSON *et al.*, 2002; NAKAMINAMI *et al.*, 2005, 2006, SASAKI & IMAI, 2012). Podendo essa interação com o DNA, estar associada a algum mecanismo de resistência a formação de adutos de DNA via ativação dos HPA por proteínas do tipo CYP450.

Outras proteínas importantes para o controle da tolerância a diversos estresses ambientais, como sal e seca, também foram identificadas, dentre elas destaca-se as “*CASP-like protein*”, um domínio da membrana das estrias de Caspari (CASPs), esta apresentaram-se mais expressas em estudos proteômicos envolvendo a fitorremediação de explosivos (TNT) com capim vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) (DAS *et al.*, 2017). São proteínas de quatro membranas envolvidas na deposição de tiras de Casparina na endoderme de plantas, pela polimerização da lignina (ROPPOLO *et al.*, 2014 DAS *et al.*, 2017). As proteínas CASP-like (CASPL), quando ectopicamente expressas na endoderme, são capazes de integrar o domínio da membrana CASP, o que sugere que CASPLs e CASPs desempenham a função de formar “*scaffolds*” transmembrana. Em *Arabidopsis*, o CASPL é expresso em uma variedade de células, como tricomas, células da zona de abscisão, células capilares periféricas e células do periciclo do polo do xilema (ROPPOLO *et al.*, 2014). CASPLs e CASPs provavelmente desempenham funções similares, ou seja, formam suportes de membrana e recrutam enzimas modificadoras da parede celular, resultando em espessamento da parede celular, seu espessamento pode estar atrelado uma resposta ao estresse pelos HPA.

Por fim, quanto as proteínas relacionadas ao metabolismo e resistência a drogas, podemos observar 4 proteínas mais expressas em plantas cultivadas na presença de 300 ppm de HPA, elas são: “*ATP-binding ABC transporter*”, “*ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH, chloroplastic*”, “*Metal-dependent protein*

hydrolase” e “*Drug resistance transporter-like ABC domain protein*”. Destre estas proteínas, duas apresentaram *fold changes* mais elevados, de 4,75 para as “*ATP-binding ABC transporter*” e 2,26 para as “*ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH, chloroplastic*”.

As “*ATP-binding ABC transporter*” desempenham um papel importante na fitorremediação de xenobióticos. A fim de mitigar o efeito prejudicial dos metais pesados e poluentes orgânicos, as plantas desenvolveram mecanismos de desintoxicação que envolvem compostos quelantes, como metalotioneínas e fitoquelatinas (PC). As primeiras (metalotioneínas) são pequenas proteínas citosólicas ricas em cisteína, encontradas adicionalmente em animais, onde elas servem com um propósito bastante semelhante, enquanto as últimas (fitoquelatinas - PC) são polímeros de glutathione também presentes em fungos, nematóides e algas. Uma vez conjugado com a glutathione, os contaminantes podem ser removidos do citosol e sequestrados com segurança no vacúolo (CLEMENS *et al.*, 1999; CLEMENS, 2001; SZEWCZAK *et al.*, 2011, KANG *et al.*, 2011).

Transportadores ABC similares em *Arabidopsis*, da chamada subfamília ABCC, nomeadamente AtABCC1 e AtABCC2, foram identificados como transportadores de fitoquelatinas vacuolares, sustentando o importante papel de tais sistemas de transporte na resistência a xenobióticos, como também, reforçando neste presente trabalho, o potencial das plantas de *Medicago sativa L.* como fitorremediadoras tanto de compostos orgânicos como metais pesados, como cádmio e zinco (KANG *et al.* 2011). Outras proteínas podem estar contribuindo para essas etapas finais de reações de fase III, como a, “*ATP synthase subunit alpha*” com a segunda maior expressão apresentada nesse trabalho, sendo o valor de *fold change* igual a 41,93.

As “*ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH, chloroplastic*”, cumprem um papel importante na manutenção das proteínas presentes nos cloroplastos, um dos alvos do ataque dos HPA dentro das plantas (ALVES, 2014). As FTSH são complexos de metaloproteases de zinco dependente de ATP, que pertencem a subfamília de proteases AAA (ATPase associada a diversas atividades celulares), sendo estas especiais pois são as únicas ancorado a membrana (KATO *et al.*, 2018). O domínio ATPase de FTSH funciona como uma “*unfoldase*” translocando os substratos para

uma câmara de degradação através de um poro estreito no cloroplasto (KRZYWDA *et al.*, 2002; NIWA *et al.*, 2002 e KATO *et al.*, 2018).

Através deste modo de ação, as FTSH retiram as proteínas integrais da membrana e as degradam, principalmente as danificadas por espécies reativas de oxigênio. Tendo em vista o estresse causado pela presença dos HPA, estas FTSH podem executar um papel protetor para o maquinário bioquímico dos cloroplastos, sendo este estratégico para a sobrevivência de *Medicago sativa L.*, como também pode estar associado a outras proteínas relacionadas ao dobramento eficiente das proteínas, como as HSP70 (*Heat shock protein 70*) e as Chaperonas (*GroEL-like chaperone, ATPase (TCP-1/cpn60 chaperonin family protein)*) ambas identificadas neste trabalho, sendo mais expressas em plantas cultivadas na presença de 300 ppm de HPA total, contendo *fold change* de 2,17 e 2,03 respectivamente.

Outro destaque é a presença de proteínas *“Drug resistance transporter-like ABC domain protein”* com *fold change* variando entre 1,69 e 1,32, relacionadas à resistência a múltiplas drogas, também podem estar executando um importante papel para a remediação dos HPA, vide que estas proteínas apresentam mecanismos onde envolvem a participação de proteínas já mencionadas neste trabalho e que desempenham um papel direto na detoxificação dos HPA seguindo as reações de fase 1, 2 e 3 com: a) ativação de proteínas transmembrana que efluem diferentes substâncias químicas das células; b) ativação das enzimas do sistema de desintoxicação da glutathione; c) alterações dos genes e das proteínas envolvidas na detoxificação dos compostos (CHOI, 2015).

Dentro das redes de interação, obtidas entre as potenciais PRFs, foi possível identificar uma série de proteínas (variando entre 16 a 20) associadas a “resposta a produtos químicos”, “resposta a estímulos abióticos” e “resposta ao estresse”. O que nos permite reforçar a hipótese de que essas proteínas, e seu aumento na expressão, estão diretamente ligados a presença dos HPA estudados, onde dentro desses grupos, proteínas importantes e discutidas nesta tese, apresentariam relação direta com essas respostas e estão criando interações fortes entre si, como as RBCS1A (Subunidade menor da RuBisCO), HSP70 (*Heat Shock protein 70kDa*) HSP60 (*GroEL-like chaperone, ATPase*) ABCC5 e ABC11 (*Drug resistance transporter-like ABC domain protein e ATP-binding ABC transporter*) e DHAR1 (*Ion channel protein*),

dentre outras proteínas relacionadas ao estresse e que possuem valores de *fold change* maiores que 2.

Seguindo com as análises das redes de interações, essas mesmas proteínas além de associadas a resposta ao estresse a produtos químico, também puderam ser analisadas do ponto de vista das funções moleculares, evidenciando que estas proteínas também estariam participando de reações de oxidação e redução, de grande importância para etapas iniciais de ativação dos contaminantes, tornando-os mais hidrofílicos, em etapas de fase I, como também a proteção contra espécies reativas de oxigênio, como observadas para as proteínas como CYP714A2 (*Cytochrome P450 family protein*), CSD1 (*Superoxide dismutase [Cu-Zn]*), CSD2 (*Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic*) CAT (Catalase), HOTA5, (Álcool desidrogenases em geral) além da própria participação da subunidade menor da RuBisCo (RBCS1A), indicada nesse trabalho e na literatura, como uma proteína chave na resposta ao estresse, mas também, em hipótese, atuando como uma possível monooxigenase capaz de oxidar HPA (Xu *et al.*, 2007; Alves, 2014), sendo esse ponto pouco abordado na literatura, carecendo de mais estudos.

Além disso, proteínas atuantes na conjugação desses contaminantes, em etapas de reação de fase II, também formaram interações importantes entre as demais proteínas, como as DHAR1 (*Ion channel protein*), uma GST com a maior expressão vista neste trabalho, e as proteínas SAM1 (*S-adenosylmethionine synthase*) também com elevada expressão em amostras cultivadas na presença de HPA. Como também, proteínas associadas a etapas finais de reação de fase III, com a internalização dos contaminantes em vacúolos, como as proteínas ABCC5 e ABC11 (*Drug resistance transporter-like ABC domain protein e ATP-binding ABC transporter*) e também as proteínas associadas a oxidação dos compostos em paredes celulares e etapas de lignificação, como RCI3 (Peroxidases).

Ainda assim, estas proteínas estudadas como PRFs também apresentaram funções moleculares importantes, como a capacidade de ligação com compostos orgânicos cíclicos e compostos heterocíclicos, sendo essa uma característica importante por se tratar de características compartilhadas com os contaminantes estudados, sendo indício de que estas proteínas respondem ao estresse, estão associadas a reações de oxidação e redução e por fim, são capazes de se ligar a

moléculas que apresentam características estruturais semelhantes aos HPA em estudo.

Um fator importante a ser observado, é a presença de proteínas que obtiveram valores de *fold change* maiores que 2 (marcadas com estrelas), mas não estarem formando ligações na rede de interação. Como muitas dessas interações são baseadas em dados obtidos na literatura, estes resultados podem indicar novos alvos a serem estudados no campo da fitorremediação, indicando assim a presença de relações a serem descobertas, e que poderão ampliar o leque de funções dessas proteínas, tanto do ponto de vista molecular quanto associado a processos biológicos. As localizações da maioria das proteínas relacionadas a fitorremediação, mais expressas na presença de HPA, também corroboram com as regiões onde as enzimas responsáveis pelas reações de fase I, II e III da fitorremediação atuam, como citoplasma, vacúolos, membranas e meio extracelular.

Dentre estas proteínas, podemos identificar a participação de proteínas pertencentes a membrana citoplasmática, sendo o primeiro contato com os HPA antes da internalização das moléculas, estas estão associadas a transdução de sinal e que podem estar sendo induzidas em resposta ao HPA, como as proteínas RABA5b (*fold change* de 1,05), pequenas GTPases que atuam com importantes interruptores moleculares na sinalização de plantas, como também no transporte de vesículas dentro da célula, e também as proteínas XLG3 (*fold change* de 1,08), proteína ligante de nucleotídeo de guanina (proteínas G) também envolvida como modulador ou transdutor em vários sistemas de sinalização transmembrana (YANG, 2002). Por estarem associadas a resposta a produtos químicos e por serem capazes de se ligar a compostos orgânicos cíclicos, estas proteínas podem estar regulando a resposta a presença dos HPA e ativando cascatas de sinalização para a síntese de proteínas associadas a fitorremediação dos HPA.

Outras proteínas importantes identificadas em membranas, foram as proteínas AT1G75280 (“*Isoflavone reductase-like NAD(P)H-dependent oxidoreductase*”) e as APA1 (“*Aspartyl protease family protein, putative*”) importantes para a síntese de fitoalexinas, compostos aromáticos produzidos em resposta a resistência a longo prazo, ou resistência sistêmica adquirida (SAR), envolvendo a comunicação de tecidos danificados pelos agentes causadores do estresse com o resto da planta,

usando hormônios vegetais como ácido jasmônico, etileno, ácido abscísico ou ácido salicílico.

A recepção do sinal através dessas proteínas leva a mudanças globais dentro da planta, que podem induzir genes que protegem a planta, incluindo enzimas envolvidas na produção de fitoalexinas, como a “*Isoflavone reductase-like NAD(P)H-dependent oxidoreductase*”, proteína chave da via do Shikimato. Muitas vezes, se os jasmonatos ou etileno (ambos os hormônios gasosos) são liberados do tecido ferido, as plantas vizinhas também fabricam fitoalexinas em resposta a esses estresses (ARRUDA, *et al.*, 2016). Dentre os hormônios apresentados acima, o ácido salicílico é forte indutor de proteínas associadas a resposta a estresse, como as proteínas AT1G55210 (“*Class 10 PR protein*”), identificadas nesse trabalho com *fold change* > 2 na presença de HPA, já o ácido abscísico, está relacionado como as proteínas AREB3 (“*ABA-responsive protein*”), também identificada neste trabalho, com *fold change* > 2 na presença de HPA, embora não tenham apresentado interações com as demais proteínas, o fato dessas proteínas estarem associadas ao estresse, terem relação com esses hormônios e com a resposta a resistência adquirida (SAR) e serem mais expressas na presença dos HPA, são indícios relevantes de que essas proteínas possam estar associadas em conjunto protegendo a planta contra os efeitos danosos dos HPA.

Não obstante, uma proteína com alta expressão (*fold change* de 13,29) pertencente a rede de interações, também foi identificada, a SAM1 (*S-adenosylmethionine synthase*), um precursor da via de biossíntese de poliaminas e etileno, hormônio vegetal citado anteriormente. Estas proteínas melhoram a tolerância a várias tensões abióticas, a saber: seca, salinidade, toxicidade aos metais pesados, estresse oxidativo, dano por frio, alta temperatura, estresse osmótico e tolerância a inundações (RADADIYA *et al.*, 2016). Estas proteínas também estão relacionadas com a glutatona (GSH), uma importante molécula de tiol que aumenta transitoriamente em plantas durante o estresse, sendo o principal tampão redox celular que mantém o ambiente intracelular reduzido, mantendo, assim, a estrutura e a função das proteínas, como também as Glutationa S-Transferases (GST) como a DHAR1, presente no citoplasma, em membranas de vacúolos e internalizada em vacúolos (discutida previamente), catalisando a conversão de H₂O₂ às custas de GSH,

produzindo assim glutathiona oxidada (GSSG), além de desempenhar um papel importante na conjugação e sequestro de xenobióticos, transporte de flavonoides, desintoxicação de ROS e radicais orgânicos característicos de reações de fase II presentes no citoplasma. (DIXON *et al.*, 2002).

Por último, os componentes celulares como paredes celulares, meio extracelular e vacúolos tornam-se os destinos finais da etapa de degradação dos HPA, nas reações de fase III, caracterizadas por uma série de proteínas associadas a membranas, como ABCC5 e ABCI1 (*Drug resistance transporter-like ABC domain protein e ATP-binding ABC transporter*) sendo algumas delas dependentes da ATP, sintetizadas por ATPA (*ATP synthase subunit alpha*), como as proteínas DET3 (*V-type proton ATPase subunit C*) ATPases vacuolares que apresentam um papel importante em resposta ao estresse, onde compostos podem ser acumulados e sequestrados em vacúolos retirando-os do citoplasma (LÜTTGE, *et al.*, 1997).

O presente estudo, focando na identificação e na quantificação de proteínas de baixa abundância (com exceção das proteínas associadas a RuBisCO) permitiu pela primeira vez observar a presença de proteínas dificilmente identificadas em estudos similares, (como CP450, Transportadores ABC, VID27 dentre outras listadas), como também permitir a quantificação dessas proteínas e apresentar seu aumento de expressão na presença dos HPA. Além disso, não só foi possível identificá-las e quantificá-las, como também percebemos que estas proteínas estão parcialmente relacionadas biologicamente, funcionando como um grupo, sendo estes achados importantes para o futuro dos estudos de fitorremediação, por tratar-se de um passo estratégico para o entendimento das rotas bioquímicas envolvidas na degradação de HPA em *Medicago sativa L.*

Sendo assim, mais estudos devem ser realizados para comprovação da participação dessas proteínas no processo de fitorremediação dos HPA, até o presente momento, são poucos os trabalhos na literatura focados nessa temática, sendo possível citar esforços na área da bioquímica da fitorremediação, nos trabalhos pioneiros de Dumas *et al.*, (2016), visando elucidar o xenoma envolvido com a degradação de fenantreno, em *Arabidopsis thaliana*, indicando resultados a nível de transcriptômica, que vão de encontro com os achados nessa tese com a utilização da

abordagem proteômica quantitativa somada a depleção de RuBisCO e enriquecimento de LAPs.

Os resultados obtidos por Dumas *et al.*, (2016) revelaram o rápido impacto negativo desses HPA no aparato fotossintético e a identificação de eventos moleculares envolvidos na resposta inicial da planta aos contaminantes, revelando processos primários criados para sentir e desintoxicar o HPA, sendo esses genes alvos potenciais para melhoria e engenharia de fitorremediação no futuro. Cerca de 39 genes específicos foram identificados como membros do xenoma de fenantreno, correspondendo a proteínas que executam transformação (CYP alfa / beta-hidrolases; fase 1), a conjugação de xenobióticos (malonil-O-transferase, GST, UGT; fase 2) e a compartimentalização de produtos conjugados no vacúolo ou na parede celular (Transportadores ABC; fase 3). Eles são os mais relevantes candidatos que poderiam estar envolvidos na desintoxicação do fenantreno, segundo os autores e como julgado, devem ser considerados para estudos posteriores.

E também, os recentes esforços pioneiros de Shen *et al.*, (2019) utilizando proteômica quantitativa (iTRAQ) para elucidar as proteínas de cloroplasto de trigo, associadas ao estresse a fenantreno, onde tal qual esta tese, trata-se da primeira análise quantitativa, visando alteração da expressão de proteínas do cloroplasto de plantas sob tratamento com fenantreno, utilizando proteômica quantitativa (iTRAQ). Onde os autores concluíram que a destruição de proteínas estruturais presente nos tilacóides é a razão para a deformação de cloroplastos sob tratamento com fenantreno. Sendo até o momento, o primeiro relato sobre o efeito carcinogênico e teratogênico em células vegetais expostas aos HPA, oferecendo informações importantes sobre a toxicidade em células vegetais expostas a HPA.

A partir dos resultados da presente tese e dos trabalhos de Dumas *et al.*, (2016) e Shen *et al.*, (2019), foi possível construir um modelo que relaciona as LAPs (PRFs), com as etapas do processo de degradação dos HPA (o possível xenoma, referente aos HPA fenantreno, antraceno e pireno) apresentado a seguir na figura 80, destacando as proteínas identificadas, de acordo com sua localização nos componentes celulares e sua possível ação nas reações de fase I, II e III.

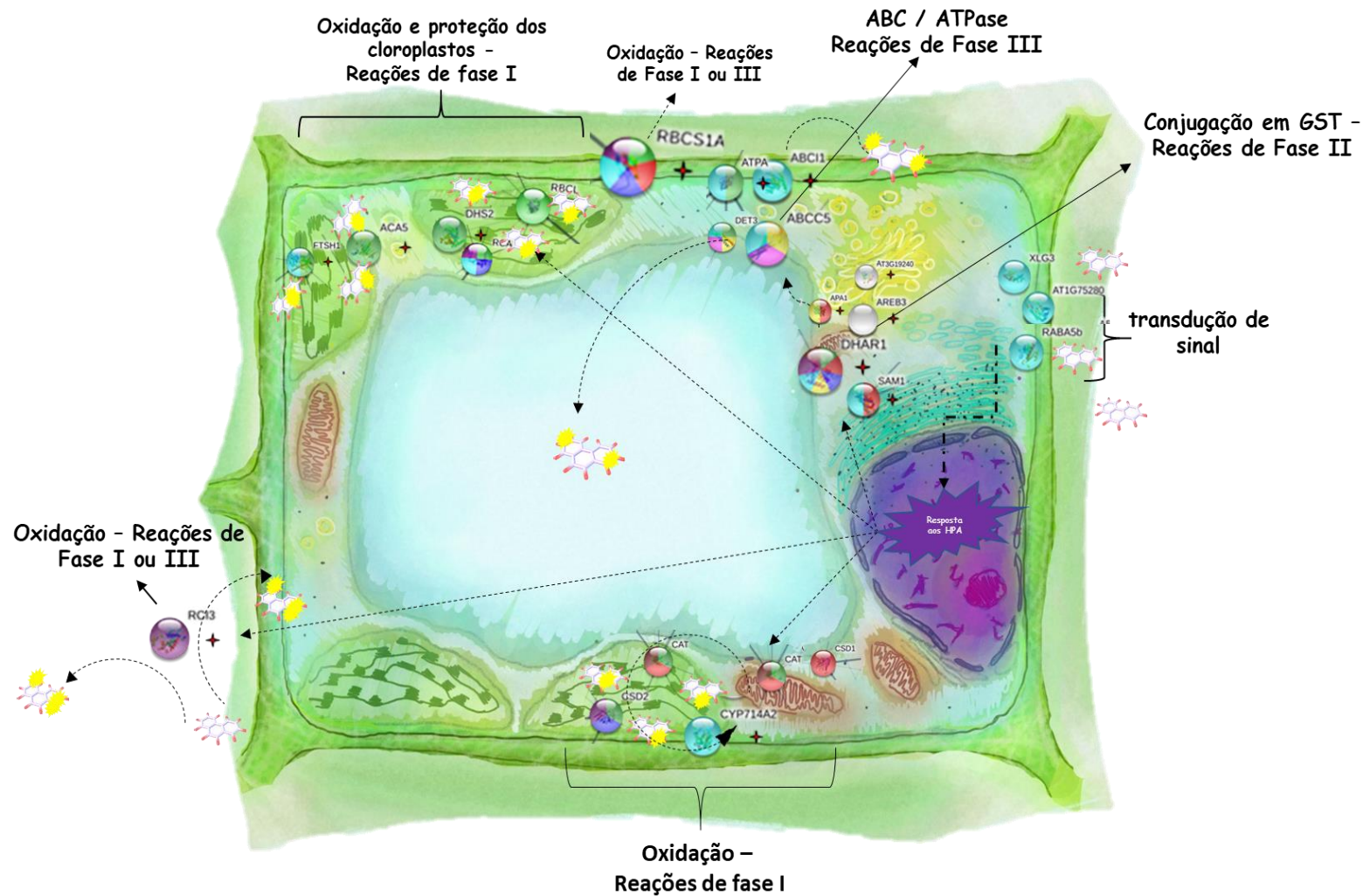


Figura 80) Modelo proposto da localização celular e atuação das LAPs relacionadas a fitorremediação nas reações de fase I, II e III. Proteínas G e proteínas associadas a transporte de vesículas, promovem a transdução de sinal (XLG3 / RABA5b / AT1G7528) reconhecendo a presença dos HPA e desencadeiam as reações de fase I, II e III do metabolismo de degradação dos HPA, tendo a participação proteínas com potencial de oxidação dos HPA, importantes nas reações de fase I, como as Peroxidases de classe III (RC3) CYP450 (CYP71A42) álcool desidrogenases (FTSH1) e supostamente, a participação das subunidades menores da RuBisCO atuando em diversos meios, seja intra como extracelular (RBCS1A). Os HPA oxidados podem ser imobilizados em paredes celulares, através da lignificação (fase III), ou serem conjugados com proteínas do tipo GST (Fase II), destacando a participação de uma delas, identificada como sendo a proteína com maior expressão na presença de 300 ppm de HPA, uma proteína de canal iônico (DHAR1) presente tanto no citoplasma como associado a membranas do vacúolo. A regulação da resposta ao estresse e a participação das GST também é destacado pela presença de proteínas “*S-adenosylmethionine synthase*” precursora de etileno, “*ABA-responsive protein*” associada a estresse e resposta a ácido abscísico e “*Aspartyl protease family protein, putative*”, importantes para a síntese de fitoalexinas, compostos aromáticos produzidos em resposta a resistência a longo prazo, ou resistência adquirida sistêmica (SAR) (SAM1 / AREB3 / APA1 - respectivamente). Por fim, participação de proteínas associadas a transportadores ABC resistentes a droga e ATPases (ABCC5 / DET3 / ABC11 / ATPa), presentes em membranas celulares e de vacúolos, capazes de retirar os produtos da degradação do citosol, sendo a etapa final do metabolismo de degradação de xenobióticos. As estrelas indicam proteínas com *fold change* > 2.

6.5. Avaliação da presença e localização de HPA em tecidos aéreos e radiculares de *Medicago sativa* L. e a influência de da CEPA BR 7411 de *Ensifer meliloti*.

Os resultados referentes a localização dos HPA em plantas de *Medicago sativa* L. em 40 DAS, foram publicados nos trabalhos de Alves *et al.*, 2017 e estão disponíveis no anexo A e serão discutidos a seguir.

O fenantreno, o antraceno e o pireno, semelhantes a outros HPA, são autofluorescentes quando expostos a luz ultravioleta e possuem espectro de emissão de sinal específico, o que permite sua detecção por microscopia de fluorescência (DABESTANI e IVANOV, 1999; WILD *et al.*, 2004; ALKIO *et al.*, 2005, WANG *et al.*, 2010 e ALVES *et al.*, 2017). As técnicas de microscopia de fluorescência aplicada nesse estudo e nos trabalhos de Alves *et al.*, 2017, mostraram a localização / distribuição desses contaminantes através dos tecidos vegetais, confirmando o sequestro por *Medicago sativa* L., sendo todos os HPA confirmados através da extração e análise dos HPA em tecidos aéreos e radiculares, oriundos de plantas de 40 DAS cultivadas na presença de 450 ppm de HPA total, por varredura do espectro de emissão de fluorescência (340-500 nm) (ALVES *et al.*, 2017).

A detecção dos HPA foi observada em estômatos, nas células da epiderme, nos tricomas e em regiões de lesão, além de vasos condutores, sendo a fluorescência mais intensa em órgãos mais antigos, como folhas senescentes e cotilédones, sendo também observado fluorescência tênue em folíolos jovens, captada principalmente nos estômatos. Para os tecidos radiculares, a fluorescência foi em grande parte da raiz, sendo associada ao estelo (composto pelos tecidos vasculares) e ao córtex das raízes. Resultados similares foram observados no trabalho de Wild *et al.*, (2004), que traçou o movimento de antraceno em folhas de milho, usando microscopia de excitação por dois fótons (ALVES, 2014 e ALVES *et al.*, 2017).

Quanto ao destino dos HPA em tecidos vegetais, estes achados corroboraram com a rota de translocação proposta por Alves *et al.*, 2017 em trabalhos anteriores, onde ocorre: 1º) Captação desses HPA pelas raízes, graças às características lipofílicas desses HPA que permitem que sejam difundidos de forma passiva até os tecidos vasculares (ALKIO *et al.*, 2005 e ALVES *et al.*, 2017). 2º) Translocação, em

menor parte, desses HPA para as partes aéreas de *Medicago sativa* L. em folhas senescentes. 3º) Distribuição para regiões próximas aos estômatos e tricomas. 4º) Ao passo que esses HPA vão se acumulando nos tecidos aéreos, regiões de lesão passam a surgir ao redor dos estômatos sendo representadas por regiões caracterizadas pela presença de substâncias de coloração escura, que evoluem para regiões de morte celular (manchas brancas). Esses sintomas foram observados na literatura para plantas de *Arabidopsis thaliana*, quando cultivadas na presença de fenantreno (ALKIO *et al.*, 2005). Contudo, essas plantas apresentaram uma sensibilidade muito maior a presença de HPA quando comparado com os resultados obtidos para essa dissertação, a presença de manchas de coloração branca e escura foi observada em todo o vegetal, sendo grandes o suficiente para serem observadas a olho nu (ALVES *et al.*, 2017).

Outro dado importante, observado em partes aéreas de *Medicago sativa* L. cultivadas em solo contaminado, foi a presença de intensa fluorescência em tricomas. Observando o banco de dados TrichOME (um banco de tricomas vegetais contendo dados “ômicos” comparativos) para plantas do gênero *Medicago* sp., foi possível observar que alfafas geralmente possuem dois tipos de tricomas. 1º) Tricomas glandulares eretos contendo pedúnculo multicelular tipicamente maior que 200 µm de comprimento encimado por uma cabeça glandular composta de algumas células com um diâmetro de cerca de 15 µm, e 2º) Tricomas não glandulares composto por uma célula de base curta e haste alongada unicelular (RANGER & HOWER, 2001). Contudo, um terceiro tricoma, de função desconhecida pode aparecer em plantas de alfafa, esse tricoma presente nas plantas estudadas nessa dissertação é um tricoma secretor glandular (TSG) (DAI, *et al.*, 2010).

Na literatura é discutido que tricomas possuem um papel especial na desintoxicação de poluentes, como observado nos trabalho de Salt, *et al.*, (1995) com os tricomas de *Brassica juncea* sendo capazes de acumular cádmio, e nos estudos de Gutiérrez-Alcala *et al.*, (2000) com a observação de que tricomas de *A. thaliana* apresentam pelo menos, 300 vezes mais glutathione em comparação com outras células epidérmicas, sugerindo um possível e eficiente local de conjugação de xenobióticos. Essa grande produção de glutathione vai de encontro aos resultados obtidos nesta tese em relação as GST (DHAR1), identificadas por técnicas de

proteômica quantitativa (*label-free*) evidenciando o maior nível de expressão (*fold change* de 76,48) observado dentre as proteínas identificadas e amostras de plantas cultivadas na presença de HPA, além das demais proteínas relacionadas a conjugação e reações de fase II discutidas anteriormente.

Em trabalhos que estudaram o transcriptoma de tricomas glandulares de *Medicago sativa L.* pertencentes ao tipo ereto, contendo pedúnculo multicelular e com cabeça glandular, (diferente do observado nos trabalhos de ALVES *et al.*, 2017) foi visto que esses órgãos possuíam em seu interior enzimas importantes para a detoxificação de xenobióticos, sendo estas também identificadas nas análises proteômicas feitas nessa dissertação, como as GST e Citocromos P450, além de Citocormos P450 redutases (AZIZ *et al.*, 2010).

Sendo assim, com as fortes evidências da presença de proteínas relacionadas a fitorremediação (PRF) em tricomas secretores glandulares (TSG), de função desconhecida em plantas do gênero *Medicago sp.*, e a observação da intensa fluorescência de HPA nesses órgãos, demonstrado experimentalmente em trabalhos anteriores por técnicas de microscopia de fluorescência (ALVES *et al.*, 2017), é possível afirmar que esses tricomas são fortes candidatos a apresentar função ativa na fitorremediação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, sendo sítios de conjugação e degradação de HPA.

Valendo a pena salientar que esses resultados poderão ser muito importantes para o futuro da fitorremediação. Tendo em vista que por técnicas de engenharia genética esses tricomas podem ser facilmente incorporados em plantas cuja utilização para a alimentação humana e de outros animais (de interesse econômico ou não) é escassa (RANGER *et al.*, 2005), impedindo a incorporação desses HPA na cadeia alimentar, sendo esse o principal desafio da fitorremediação na atualidade (VERKLEIJ *et al.*, 2009). Os estudos de Alves *et al.*, (2017), apresentado nesta tese foi o primeiro trabalho na literatura a avaliar a presença de HPA em tecidos de *Medicago sativa L.* por técnicas de microscopia de fluorescência, sendo o primeiro também a propor uma função fisiológica para os tricomas secretores glandulares observados para esta espécie (ALVES *et al.*, 2017).

Podemos observar que o tráfego dos HPA para os tecidos aéreos começou bem rápido, logo nos primeiros 10 DAS atingindo os cotilédones. A intensidade da fluorescência também aumentou conforme a concentração dos contaminantes utilizados, sendo os sinais de fluorescência mais evidentes (intensos) nos tecidos oriundos de plantas cultivadas na presença de 450 ppm de HPA total. Quanto a influência da cepa BR 7411, as bactérias promoveram uma absorção mais elevada dos HPA, vide os sinais de fluorescência mais intensos, para todos as concentrações (150, 300 e 450 ppm), se comparadas com plantas cultivadas na ausência da cepa BR 7411, absorvendo assim maior quantidade de contaminante para os tecidos aéreos. Esse mesmo perfil de aumento também foi visível nas raízes tratadas com a cepa BR 7411, onde os HPA foram detectados nas regiões periféricas da raiz, como também nos vasos condutores de seiva (estelo), que conduzem esses contaminantes para as partes aéreas do vegetal, que por sua vez, apresentaram intensa fluorescência em decorrência desse transporte, se comparado com as plantas que não foram submetidas ao inóculo da cepa BR 7411.

Uma hipótese para esse aumento na absorção de HPA em plantas inoculadas, pode ser explicada pela capacidade dessas bactérias de aumentar a biodisponibilidade desses contaminantes, através de surfactantes, ou pela capacidade previamente comprovada de metabolizar esses HPA e torná-los mais facilmente assimiláveis pelo vegetal, diminuindo suas constantes K_{oa} permitindo que sejam internalizados mais rapidamente pelo vegetal (ALVES *et al.*, 2017). O coeficiente de partição octanol-água (K_{oa}) tem sido comumente usado para descrever a absorção de HPA em sistemas água/solo-planta (TAN *et al.*, 2017). Alguns trabalhos na literatura, mostram uma relação negativa entre a absorção dos HPA pelas raízes e suas respectivas K_{oa} (WANG *et al.*, 2012). Nos trabalhos de Tan *et al.*, 2017, é possível observar essa correlação linear negativa onde quanto maior a K_{oa} mais difícil a absorção dos HPA pela planta estudada (*Kandelia obovata*), esses perfis também foram observados na presente tese, como também publicados em trabalhos anteriores (ALVES *et al.*, 2017 e 2018) evidenciando uma ordem na absorção dos HPA, e por consequência, degradação dos mesmo, começando pelo HPA fenantreno, seguido de pireno e por último o antraceno (ALVES *et al.*, 2018). Outros estudos também mostram que além da relação da absorção com a K_{oa} , as plantas também mostraram a capacidade de absorção ativa desses compostos (ZHAN *et al.*, 2010 e ZHAN *et al.*,

2015), corroborando com a o potencial dessas plantas de sequestrarem esses contaminantes e degradarem os mesmos através de seu metabolismo celular, discutido nesta tese.

Um fato importante destacado pela técnica de microscopia de fluorescência foi o monitoramento do trajeto dos HPA dos tecidos radiculares até os tecidos aéreos sob influência da cepa BR 7411. Como proposto em trabalhos anteriores, os HPA seguem um trajeto em vegetais, partindo das raízes, passando pelos vasos condutores do xilema e chegando até os tecidos aéreos, tendo como destino uma série de estruturas como células guarda dos estômatos, cloroplastos, células da epiderme e tricomas variados (ALKIO *et al.*, 2015 e ALVES *et al.*, 2017), contudo, a presença da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* contribuiu para outros destinos possíveis desses HPA. Nas raízes de *Medicago sativa L.*, que apresentaram formação de nódulos, estruturas formadas pela interação da planta com o simbiote fixador de nitrogênio, *Ensifer meliloti*, foram analisados por microscopia de fluorescência e observado que os HPA foram encontrados perfazendo o trajeto de translocação desses contaminantes para dentro dos nódulos, sendo esta uma região onde é encontrado a células vegetais repletas de bacterióides de *Ensifer meliloti* (SUZAKI *et al.*, 2015).

Tendo em vista o potencial destas bactérias para a degradação dos HPA apresentados nessa tese, estes resultados apresentam de maneira preliminar, que os nódulos também podem ser órgão destinados a degradação de contaminantes como os HPA, vide a concentração desses compostos nos nódulos e o aumento da intensidade de fluorescência desses HPA, quando comparado com outras partes da raiz, e posterior metabolização desses contaminantes pelos bacterióides. Por tratar-se de um fato inédito na literatura, a detecção dos HPA em nódulos de leguminosas carece de referências que possam embasar esses achados, cabendo apenas gerar as hipóteses de que esses nódulos, vastamente conhecidos como órgãos responsáveis pela fixação de nitrogênio (SUZAKI *et al.*, 2015), possam também executar a função de órgãos capazes de sequestrar os HPA e concentrar os mesmos, tornando-os disponíveis para o o consumo dos bacterióides como fonte de carbono. Sendo essa hipótese, um ponto de partida importante para o melhor entendimento do destino desses contaminantes em leguminosas detentoras de nódulos.

Outros padrões importantes quanto ao destino dos HPA estudados foram observados, quanto ao monitoramento do tráfego dos contaminantes pelos sistemas de venações (nervuras presentes nas folhas) de alfafa. Nos resultados, foi possível observar de forma repetida, que a chegada dos HPA nestes tecidos teve início partindo da nervura central, em cotilédones e algumas folhas unifolioladas, sendo transferidos posteriormente para regiões específicas na planta. Estas regiões encontram-se entre as nervações secundárias e os pontos de terminação vascular (característico de venações reticuladas), próximas a porção central delimitada pela nervura central e a margem do limbo, sendo essas regiões o marco inicial do contato dos contaminantes com o tecido fotossintético propriamente dito em alfafas. Nesse local, os HPA são “despejados”, sendo esse fenômeno evidenciado pela fluorescência azul típica dos HPA, como também o aumento do sinal de fluorescência vermelha, indicativa da clorofila, presente nos cloroplastos nestas regiões terminais, cuja a tendência após 20 DAS, é de que os sinais de HPA, hora difusos no parênquima, passem a se tornar mais concentrados no interior das células. Essa janela temporal, mais curta em plantas inoculadas com BR 7411 quando comparadas com plantas sem inóculo, provavelmente ocorre pelo potencial de aumento da biodisponibilidade desses HPA, graças à atuação de bactérias presentes no solo e eliminação de ácidos aromáticos e fosfolípidios surfactantes são capazes de aumentar a mobilidade e a biodisponibilidade de poluentes orgânicos (NOVAK *et al.*, 1995; XING e PIGNATELLO, 1998; OLSON *et al.*, 2003; READ *et al.*, 2003).

De acordo com o trabalho de revisão desenvolvido por ROTH-NEBELSICK *et al.*, (2001) sobre o transporte de substâncias em folhas, os aspectos mecânicos, o transporte e a distribuição eficiente de substâncias, são as principais tarefa do sistema de feixes vasculares. Esse sistema de venação consiste em grandes veias longitudinais (denominadas veias laterais) que correm mais ou menos em paralelo, veias longitudinais menores (denominadas veias intermediárias), que também correm em paralelo, e veias cruzadas (denominadas veias transversais), conectando as diferentes veias longitudinais. O deslocamento longitudinal da água da base da folha para a ponta ocorre através das veias laterais. A dispersão local da água ocorre através das veias intermediárias, que são fornecidas pelas veias laterais através de veias transversais. Em dicotiledôneas (classe de *Medicago sativa* L.), tanto o tráfego de substâncias via xilema, como a velocidade da água em sistemas venosos foi

estudado desde os anos 80, utilizando corantes fluorescentes (ROTH-NEBELSICK *et al.*, 2001). Nesses estudos, o fluxo de água entra na folha através da nervura central, levando a distribuição de água para os secundários e finalmente, a dispersão lateral da água, onde os valores de pressão tornam-se mais negativos com o aumento da distância do ponto de entrada da água (no pecíolo), para os destinos finais (dispersão lateral), onde a velocidade do fluxo também acompanha, de forma direta, a diminuição da pressão.

Sabendo que o transporte dos HPA das raízes até as partes aéreas se dá via xilema, acompanhando o fluxo da seiva bruta, o trajeto do HPA segue as leis similares ao do transporte da água e dos sais minerais, apresentadas anteriormente. O tráfego tende a seguir esse caminho, concentrando-se em determinadas células no parênquima clorofiliano, conforme ocorre a diminuição da pressão, os HPA são acumulados nesses pontos de terminação e entrando em contato com as células do parênquima clorofiliano.

Observando esse fenômeno e somando-se aos resultados da análise protômica obtidos nessa tese, esse momento pode estar representando a etapa onde os HPA começam a ser reconhecidos pelas células, e serem internalizados após início da transdução de sinal e desencadeamento da resposta a presença dos HPA, aumentando assim a expressão das proteínas associadas ao processo de degradação dos HPA. O fato desse fenômeno ocorrer de forma repetida em outras terminações do sistema de venação, tornam esses grupos de células um alvo de estudo futuro, dentre todas as outras presentes no limbo, para melhor compreensão do processo envolvendo a degradação dos HPA.

Além disso, o acúmulo do sinal de fluorescência da clorofila, e por sua vez, de cloroplastos nessas regiões, também corroboram com os dados obtidos nesta tese, em relação a identificação de proteínas relacionadas a fitorremediação, que obtiveram aumento da sua expressão, na presença dos HPA, pertencentes a cloroplastos, incluindo as Catalases, SOD-[Cu-Zn], FTSH, além das proteínas associadas a RuBisCO (sub. menor, maior e RuBisCO Ativase), principalmente comprometidas com a manutenção da integridade do maquinário bioquímico dentro dos cloroplastos, por tratar-se de uma organela alvo do ataque dos HPA (ALKIO, *et al.*, 2015, DUMAS *et al.*, 2016, ALVES, *et al.*, 2017 e SHEN *et al.*, 2019). Outro indício que reforça o papel

dos cloroplastos como alvo prioritário desses HPA, mas também em hipótese como ferramentas importantes na remediação dos HPA, foi o acúmulo da fluorescência dos HPA nessas organelas, evidenciado pela presença de fluorescências intensas em forma de bastonete dentro das células do parênquima clorofiliado em alfafa, além disso, a exposição a luz concentrada também permitiu a diminuição da fluorescência dos HPA em poucos segundos, tanto nos cloroplastos como em regiões da parede celular, indicando assim que a degradação desses HPA pode estar relacionada a uma série de reações envolvendo proteínas dependentes na luz para o seu funcionamento.

Outro fator importante envolvendo o decaimento gradativo da fluorescência dos HPA, foi a permanência da fluorescência da clorofila, indicando assim, que não houve danos aparentes ao aparato fotossintético de forma sistêmica, corroborando assim com a hipótese de que a presença da luz ou organelas e proteínas dependentes da mesma, podem ter sido responsáveis pela rápida transformação dos HPA em outra substância que não mais apresenta fluorescência, em outras palavras, as proteínas com superexpressão em cloroplastos citadas anteriormente.

Embora esse fenômeno tenha sido descrito até o presente momento, como o primeira evidência do papel direto da luz na degradação dos HPA em cloroplastos e paredes celulares, através de proteínas específicas, é importante salientar que muitos trabalhos descrevem uma série de danos ao aparato fotossintético das plantas quando na presença dos HPA, como também a deformação dos cloroplastos e das membranas tilacóides e diminuição da expressão de proteínas envolvidas na fotossíntese e na síntese de pigmentos fotossintéticos, sendo necessário assim um maior esforço para testar essa hipótese e aferir com mais certeza essa degradação dos HPA em cloroplastos e paredes celulares, quando na presença de luz concentrada, e como ela está relacionada aos danos aos cloroplastos descritos na literatura. (ALKIO, *et al.*, 2015, DUMAS *et al.*, 2016, ALVES, *et al.*, 2017 e SHEN *et al.*, 2019).

Por fim, outro fenômeno importante foi a detecção de estruturas similares a vesículas, presentes tanto em nódulos como na região cortical das raízes, contendo sinais intensos de fluorescência dos HPA, indicando assim que estes contaminantes estavam sendo internalizados em vesículas, e que poderiam estar relacionadas a processos de degradação dos HPA, como em etapas de reação de fase II, como

também relacionados ao transporte dessas substâncias para serem utilizadas como fonte de carbono por bacteróides, presentes nos nódulos, vide a presença dessas vesículas ser maior na região onde encontram-se localizados os simbioses. Além disso, o número dessas estruturas também aumentava conforme aumento da concentração dos contaminantes. Estes são os primeiros relatos dessas estruturas sendo visualizados em raízes de *Medicago sativa L.*, como também dentro dos nódulos. Na literatura, estruturas similares podem ser vistas, mas não em plantas (vide a ausência de estudos mais detalhados, sendo o os obtidos nessa tese de caráter inédito), e sim em hifas de fungos filamentosos da espécie *Pythium ultimum*, (FURUNO *et al.*, 2012). Neste estudo, os autores observaram o transporte de fenantreno através das hifas do micélio desse fungo, devido ao fluxo de vesículas citoplasmáticas após a absorção em conteúdos de natureza lipídica, sendo essa a principal forma de transporte desses HPA dentro do fungo, onde a difusão que é feita para o citoplasma, com o auxílio de filmes aquosos que se formam fora das hifas, demonstram ter menos influência no transporte dessas substâncias.

Todavia, o processo e transporte dos HPA através dessas vesículas em alfafa pode apresentar similaridades com o que ocorre em fungos, onde para entrar no citoplasma micelial e para ser transportado pelas vesículas, os HPA precisam 1º) atingir a superfície celular (ou seja, estar biodisponível), 2º) passar pela parede celular para o citoplasma, (HAMILTON *et al.*, 2001) e 3º) difundir para dentro do citoplasma em associação com vesículas. Embora a difusão através da membrana plasmática tenha sido proposta como sendo a etapa limitante da taxa de captação celular de hidrocarbonetos de hidrofobicidade variável, Verdin *et al.*, (2005) observaram que a captação e armazenamento de HPA no fungo filamentoso *Fusarium solani* era independente da estrutura química, onde técnicas de microscopia de excitação por dois fótons indicaram que os HPA se acumulam em vesículas lipídicas que, provavelmente, consistem em um núcleo hidrofóbico de lipídios de armazenamento neutro, envolvido por uma monocamada de fosfolipídios com proteínas incorporadas (VAN AARLE & OLSSON, 2003).

Se esse sistema de transporte de HPA, via vesículas lipídicas associadas a proteínas incorporadas pertencente a fungos filamentosos, ocorrer em plantas como *Medicago sativa L.*, é possível que proteínas associadas a formação de vesículas, e

que por sinal, apresentaram-se mais expressas em estudos de proteômica quantitativa, realizados nessa tese, possam estar contribuindo diretamente para o transporte desses HPA nas células vegetais, como as proteínas “*Vacuolar import/degradation, VID27-like protein*” dentre outras proteínas associadas com a transdução de sinal, como as proteínas G (XLG3 e AT1G7528) e transporte de vesículas (RABA5b).

Estudos como estes demonstram a eficácia da técnica de microscopia de fluorescência como ferramenta útil para detectar e monitorar esses HPA em tecidos de plantas. Contudo, limitações no que diz respeito a quantificação precisa dos HPA estudados estão presentes, essas limitações também foram observadas por outros autores como nos trabalhos de Wang *et al.*, (2010). Assim, estudos detalhados e abrangentes precisam ser realizados no futuro, em combinação com novas técnicas de visualização, por exemplo, microscopia de varredura confocal a laser de dois fótons (WANG *et al.*, 2010) ou MALDI-MSI, que promoverão a visualização da distribuição espacial dessas pequenas moléculas em tecidos específicos, como os abordados nessa tese (CALDWELL E CAPRIOLI, 2005; REYZER e CAPRIOLI, 2007; YE *et al.*, 2013; TAKAHASHI *et al.*, 2015).

Com o objetivo de resumir o tráfego dos HPA pelos tecidos vegetais, como também os achados relacionados ao destino desses contaminantes em plantas em associação simbiótica com cepas de BR 7411, discutidos nessa tese, um modelo foi proposto na ilustração a seguir (Fig. 81), indicando os diferentes destinos dessas moléculas em plantas de alfafa.

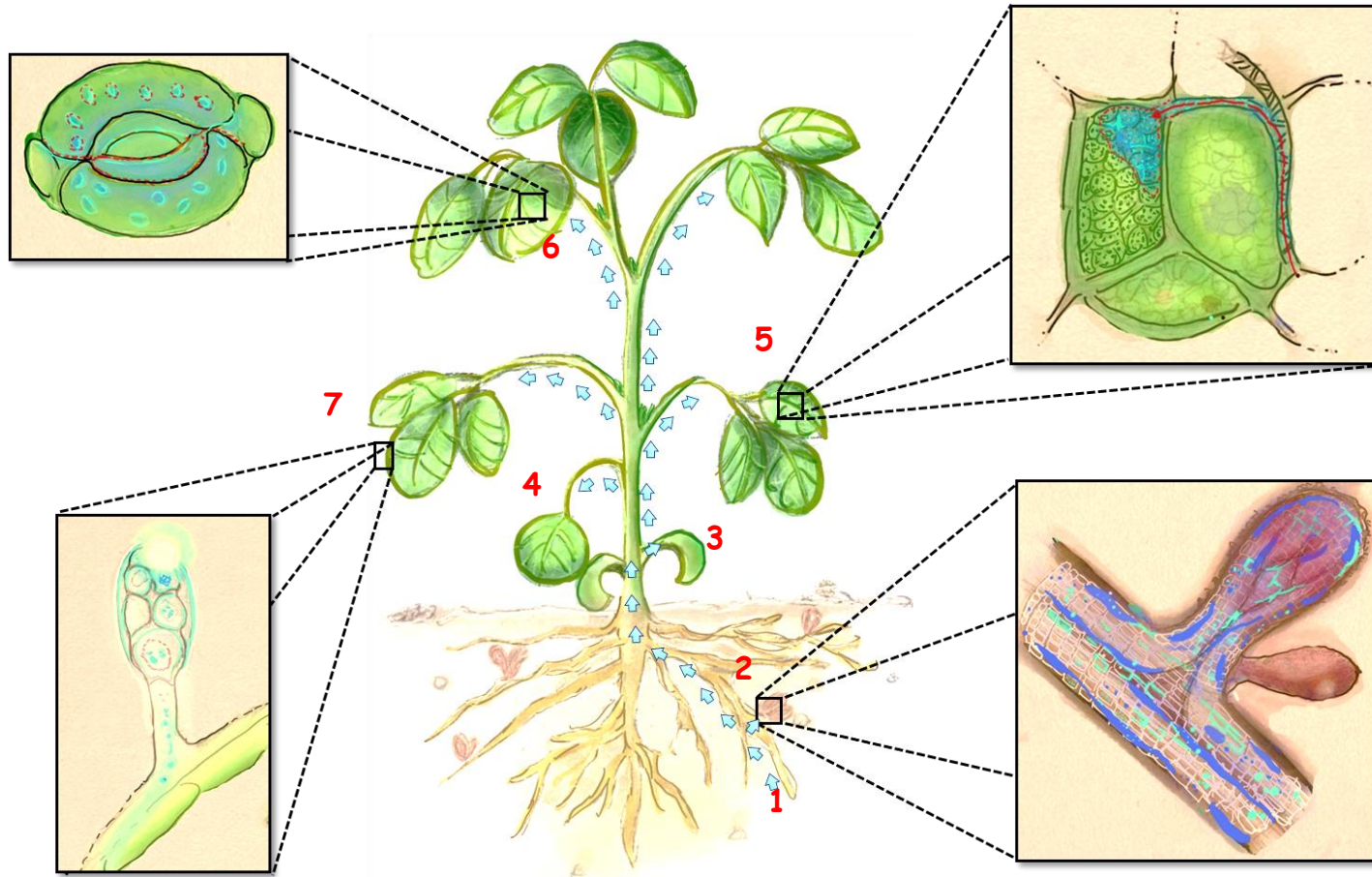


Figura 81) Destino dos HPA nos tecidos de *Medicago sativa L.* observados por microscopia de fluorescências. O trajeto dos HPA (setas) tem início nas raízes (1), onde são absorvidos e internalizados no xilema e nas células adjacentes, onde são metabolizados em vesículas e vacúolos, podendo ser internalizados em nódulos, onde supostamente são metabolizados pelos bacteróides (2). Já no xilema, os HPA são transportados para os cotilédones (3) logo nos primeiros dias, onde são metabolizados pelo maquinário bioquímico das células (por serem órgão caducos, são um destino estratégico, pois os contaminates irão se acumular nessas folhas, que cairão com o tempo). Com o passar dos dias, os HPA atingem as folhas unifolioladas (4) e também as folhas trifolioladas (5, 6 e 7), onde os HPA se concentram em regiões específicas, como nas células do limbo foliar, sendo despejados em pontos de terminação vascular, (5), onde as células do parênquima clorofiliano iniciam o metabolismo dos HPA, também são concentrados em estômatos (6) principalmente nas células guarda, e por fim, nos tricomas secretores glandulares (7), onde supostamente apresentam-se como sítios de degradação e conjugação desses HPA, e tal qual os cotilédones, também são órgãos caducos (facilmente destacáveis). Os detalhes em azul, presentes nas caixas de aumento, representam a fluorescência dos HPA.

CAPÍTULO 7 - CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- A cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* e a planta *Medicago sativa L.* (Cv. Crioula) apresentaram potencial para serem utilizados como ferramentas de remediação de solos contaminados com os HPA, fenantreno, antraceno e pireno.
- A cepa BR 7411 se destacou como sendo capaz de utilizar HPA como única fonte de carbono, sendo esse resultado inédito para esta cepa em particular.
- Os ensaios de autenticação da cepa BR 7411 mostraram que a mesma foi capaz de infectar as plantas de alfafa de forma eficiente, garantindo a sobrevivência das plantas na ausência de fontes exógenas de nitrogênio, gerando nódulos ativos até os primeiros 20 DAS.
- A cepa BR 7411 promoveu um crescimento satisfatório das plantas cultivadas na ausência de nitrogênio. Sendo observada diferença significativa em 20 DAS, com aumento no comprimento das partes aéreas de *Medicago sativa L.*, em relação ao controle sem o tratamento com a cepa BR 7411.
- *Medicago sativa L.* atingiu percentuais maiores que 85 % de remoção de HPA nos tempos de 20 DAS mostrando uma tendência em remover os HPA numa sequência definida (fenantreno > pireno > antraceno) dependente de suas concentrações.
- Resultados preliminares da influência do inóculo da cepa BR 7411 revelaram uma melhora na saúde das plantas em todas as concentrações utilizadas de HPA, conferido maior resistência aos efeitos tóxicos dos contaminantes. Essa resposta positiva pode estar atrelada a ação sinérgica entre a cepa BR 7411 e a planta na degradação dos HPA.
- Foi possível detectar, pela primeira vez, HPA em tecidos vegetais de *Medicago sativa L.* por técnicas de microscopia de fluorescência. A presença da cepa BR 7411 contribuiu para aumento da absorção dos HPA para todas as concentrações, vide intensidade da fluorescência dos HPA nos órgãos analisados, comparados com as plantas não tratadas com a cepa BR 7411.
- A presença de HPA em nódulos mostrou, pela primeira vez, que esses órgãos podem exercer não só a função de FBN como a de sítio de remediação desses HPA, vide que a cepa BR 7411 apresentou a capacidade de metabolizar esses compostos em ensaio de Hanson.

- Quanto a análise proteômica, foi possível identificar 54 candidatas a PRF e dentre elas, a RuBisCO pode ter um papel importante na remediação desses compostos, sendo até agora, o primeiro estudo a analisar o proteoma de *Medicago sativa L.* (quantitativo e qualitativo) na presença de HPA, em busca de PRF.

CAPÍTULO 8 – PERSPECTIVAS FUTURAS

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho destacou o potencial de *Medicago sativa L.* e da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* para a remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como também a identificação de potenciais proteínas relacionadas a fitorremediação, e confirmação da presença desses HPA em tecidos aéreos e radiculares de alfafas cultivadas em solo contaminado. Contudo, novos estudos visando a bioquímica e a fisiologia desses vegetais, em consórcio com bactérias fixadoras de nitrogênio (e com potencial para a degradação de HPA), fazem-se necessários para o melhor entendimento dos mecanismos utilizados pelas alfafas e BR 7411 na remediação de HPA.

Como perspectivas futuras, mais experimentos de proteômicas quantitativa, aliada a depleção da RuBisCO, deverão ser realizados nas amostras contendo a presença de BR 7411 em diferentes tempos de ensaio e concentrações de HPA, com o intuito de identificar potenciais PRFs, tanto nos tecidos aéreos como em raízes de alfafa e exsudatos radiculares, vide estarem em contato direto com os HPA no solo, em busca de proteínas que possam estar atuando na remediação desses contaminantes na rizosfera desses vegetais. Tendo em vista a presença de HPA nos tecidos de *Medicago sativa L.*, devem ser realizadas análises quantitativas desses contaminantes, a partir de amostras de HPA extraídas de tecidos aéreos e radiculares.

Efetuar o monitoramento destes HPA, utilizando técnicas de microscopia de fluorescência, como também, aliando as técnicas de imageamento com a análise proteômica e metabolômica, em busca de proteínas e metabolitos de degradação presentes nas regiões onde são encontradas as fluorescências do HPA, utilizando imageamento por espectrometria de massas (MALDI - MSI). Esses dados serão de suma importância para a determinação dos mecanismos de fitorremediação das alfafas, como a fitoextração e fitodegradação, por exemplo.

Por fim, espera-se que estes estudos futuramente possam fornecer informações que contribuam de forma satisfatória para área da fitorremediação, como a produção de espécies vegetais geneticamente modificadas, que sejam capazes de corrigir todos os HPA prioritários, ou ainda, o desenvolvimento de produtos para a fitorremediação direta de solos contaminados de forma mais eficaz e sustentável.

CAPÍTULO 9 - BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

ALAM, S. B., & ROCHON, D. (2016). Evidence that Hsc70 Is Associated with Cucumber Necrosis Virus Particles and Plays a Role in Particle Disassembly. *Journal of Virology*, 91(2).

ALVES, W.S. (2014). Estudos de fitorremediação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por *Medicago sativa* L. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) Rio de Janeiro.

ALVES, W.S.; MANOEL, E.A.; SANTOS, N.S.; NUNES, R.O.; DOMICIANO, G.C.; & SOARES, M.R. (2017). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Medicago sativa* L. by fluorescence microscopy. *Micron*. Vol. 95, p. 23–30.

ALVES, W.S.; MANOEL, E.A.; SANTOS, N.S.; NUNES, R.O.; DOMICIANO, G.C.; & SOARES, M.R. (2018). Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by cv. Crioula: A Brazilian alfalfa cultivar. *International Journal of Phytoremediation*. Vol. 20(8), p. 747–755.

AEBERSOLD, R. & MANN, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. Vol. 422, p. 198-207.

AFZAL M.; YOUSAF S.; REICHENAUER T.G.; SESSITSCH A. (2012). The inoculation method affects colonization and performance of bacterial inoculant strains in the phytoremediation of soil contaminated with diesel oil. *Int J Phytorem*. Vol. 1, p. 35–47.

AGRAWAL, G.K., & RAKWAL, R. (2008). *Plant Proteomics: Technologies, Strategies, and Applications*. Hoboken, NJ: Wiley & Sons. p. 808.

AHAMMED, G. J.; WANG, M-M.; ZHOU, Y-H.; XIA X-J.; MAO, W-H.; SHI, K. & YU, J-Q. (2012). The growth, photosynthesis and antioxidant defense responses of five vegetable crops to phenanthrene stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 80, p. 132-139.

AHN S.G.; KIM S.A.; YOON J.H.; VACRATIS P. (2005). Heat-shock cognate 70 is required for the activation of heat-shock factor 1 in mammalian cells. *Biochem J*. Vol. 392, p. 145–152.

AKCHA, F.; IZUEL, C.; BUDZINSKI, H.; BURGEOT, T. & NARBONNE, J.F. (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. Vol. 49, p. 269-287.

ALKIO M.; TABUCHI T.M.; WANG X.; CÓLON-CARMONA A. (2005). Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition

and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56(421), p. 2983–2994.

ARRUDA R.L.; PAZ A.T.S.; BARA, M.T.F.; CÔRTEZ, M.V.C.B.; FILIPPI, M.C.C.; & CONCEIÇÃO, E.C. (2016). An approach on phytoalexins: function, characterization and biosynthesis in plants of the family Poaceae. *Ciência Rural*. Vol. 46(7), p. 1206-1216.

AZEVEDO, D.A.; SANTOS, C.Y.M. & NETO, F.R.A. (2002). Identification and seasonal variation of atmospheric organic pollutants in Campo dos Goytacazes, Brazil. *Atmospheric Environment*. Vol. 36, p. 2383-2395.

AZIZ, N.; PAIVA, N.L.; MAY, G.D.; DIXON R.A. (2005). Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes. *Planta*. Vol. 221, p. 28-38

AZUMA, M.; TOYOTA, Y.A. & KAWATO, S. (1996). Naphthalene – a constituent of Magnólia flowers. *Phytochemistry*. Vol. 42, p. 999-1004.

BABOSHIN, M.A.; BASKUNOV, B.P.; FINKEL'SHTEIN, Z.I.; GOLOVLEV, E.L., AND GOLOVLEVA, L.A. (2005). The microbial transformation of phenanthrene and anthracene, *Microbiology (Moscow)*. Vol. 74(3), p. 303–309.

BAEK, K.H.; KIM, H.S.; OH, H.M.; YOON, B.D.; KIM, J. & LEE, I.S. (2004). Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *Journal Environmental Science and Health*. Vol. 39, p. 2465-2472.

BANJOO D.R. & NELSON P.K. (2005). Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1066, p. 9–18

BARAN S. & OLESZCZUK P. (2003). The Concentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sewage Sludge in Relation to the Amount and Origin of Purified Sewage. *Polish Journal of Environmental Studies*. Vol. 12(5), p. 523-529

BARAN, S. & OLESZCZUK, P. (2002). Chromatography determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in sewage sludge, soil, and sewage sludge amended soils. *Polish Journal of Environmental Studies, Olsztyn*. Vol. 11(6), p. 609-615.

BARNABAS, I.J.; DEAN, J.R.; TOMLINS, W.R. & OWEN, S.P. (1995). Experimental design approach for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using supercritical carbon dioxide. *Analytical Chemistry, Amsterdam*. Vol. 67, p. 2064-2069.

BARNES, R.F.; MILLER, D.A. & NELSON, C. J. (1995). *Forages*. Vol. 1: A introduction to Grassland Agriculture. Iowa State University Pres, Ames, Iowa, USA.

BARRA, R.; POPP, P.; QUIROZ, R.; BAUER, C.; CID, H. & TUMPLING, W.V. (2005). Persistent toxic substances in soils and waters along an altitudinal gradient in the Laja river basin, central southern Chile. *Chemosphere*. Vol. 58, p. 905-915.

BENEDETTI C.E.; COSTA C.L.; TURCINELLI, S.R. & ARRUDA P. (1999). Differential Expression of a Novel Gene in Response to Coronatine, Methyl Jasmonate, and Wounding in the *Coi1* Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. Vol. 116, p. 1037-1042.

BENNER, B.A. (1998). Summarizing the effectiveness of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from natural matrix environmental samples. *Analytical Chemistry*, Amsterdam. Vol. 70, p. 4594 - 4601.

BENYAHIA, F., & EMBABY, A. (2016). Bioremediation of Crude Oil Contaminated Desert Soil: Effect of Biostimulation, Bioaugmentation and Bioavailability in Biopile Treatment Systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 13(2), p. 219.

BERSET J.D.; EJEM M.; HOLZER R.; LISCHER P. (1999). Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 383, p. 263-275.

BEVERIDGE, A. J. & OLLIS, D. L. (1995). A theoretical study of substrate-induced activation of diene lactone hydrolase. *Protein Engineering Design & Selection*. Vol. 8(2), p. 135-42.

BÍCEGO, C.M.; TANIGUCHI, S.; YOGUI, G.T.; MONTONE, R.C.; SILVA, D.A.M.; LOURENÇO, R.A.; MARTINS, C.C.; SASAKI, S.T.; PELLIZARI, V.H. & WEBER, R.R. (2006). Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 52(12), p. 1804-1816.

BIDOIA, E.D.; MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.M. (2010). Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Méndez-Vilas. Vol. 2, p. 1277-1288.

BINKOVÁ, B.; GIGUÈRE, Y.; RÖSSNER-JR, P.; DOSTÁL, M. & SRÁM. R. (2000). The effect of dibenzo[a,h]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21WAF1 proteins and cell cycle distribution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Vol. 471(1-2), p. 57-70.

BISHT, S.; PANDEY, P.; BHARGAVA, B.; SHARMA, S.; KUMAR, V., & SHARMA, K. D. (2015). Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 46(1), p. 7–21.

BJELLQVIST B.; EK K.; RIGHETTI P.G.; GIANAZZA E.; GÖRG A.; WESTERMEIER R. & POSTEL W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. Vol. 6 (4) p. 317-339.

BLACKSTOCK, W.P. & WEIR, M.P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*. Vol. 17, p. 121-127.

BONFRANCESCHI B.A.; FLOCCO C.G.; DONATI E.R. (2009). Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in a hydroponic environment. *J Hazard Mater*. Vol. 165(1-3), p. 366-71.

BRADFORD, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. 72, p. 248-254.

BRADY, C.A.L.; GILL, R.A. & LYNCH, P.T. (2003). Preliminary evidence for the metabolism of benzo(a)pyrene by *Plantago lanceolata*. *Environ. Geochem. Health*. Vol. 25, p. 131-137.

BRINCH U.C.; EKELUND F.; JACOBSEN C.S. (2002). Method for Spiking Soil Samples with Organic Compounds *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. Vol. 68(4), p. 1808–1816.

BRITO, E.M.S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M.A.C.; WASSERMAN, J.C.A. & DURAN, R. (2006). Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*. Vol. 15(8), p. 752-762.

BRITO, E.M.S.; VIEIRA, E.D.R.; TORRES, J.P.M.; & MALM, O. (2005). Persistent organic pollutants in two reservoirs along the Paraíba do sul-Guandu river system, Rio de Janeiro, Brazil, *Química Nova*. Vol. 28(6), p. 941-942.

BROWN, D.M.; ZEEF, L.A.H.; ELLIS, J.; GOODACRE, R.; TURNER, S.R. (2005) Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell*. Vol. 17, p. 2281–2295.

BRUNETE-SÁNCHEZ, C.; MIGUEL, E. & TADEO, J. L. (2007). Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam. Vol. 1148, p. 219-227.

BUCHANAN I.D.; NICELL J.A. (1997). Model development for horseradish peroxidases catalysed removal of aqueous phenol. *Biotechnol Bioeng.* Vol. 54(3) p. 251–61.

BUEY, R. M., LEDESMA-AMARO, R., BALSERA, M., DE PEREDA, J. M., & REVUELTA, J. L. (2015). Increased riboflavin production by manipulation of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in *Ashbya gossypii*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* Vol. 99(22), p. 9577–9589.

BULL, A.T. (1992). Degradation of hazardous wastes. In: *The treatment and handling of wastes.* (Bradshaw AD, Southwood R, Warner F, Eds) Chapman and Hall, London, p. 155-166.

BURKEN, J. G. (2003). Uptake and metabolism of organic compounds: Green-liver model. em MCCUTCHEON S.C. & SCHNOOR J.L. (2003) (Eds.), *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants* (p. 59-84). Hoboken: Wiley Interscience, Inc.

CALDWELL, R.L.; CAPRIOLI, R.M., (2005). Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol. Cell Proteom.* Vol. 4(4), p. 394–401.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI L.; RIGHETTI, P.G. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* Vol. 25(9), p. 1327–1333.

CASTELLANE, T.C.L. (2007). Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono. 2007. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CASTRO, L.M.D. & GARCÍA-AYUSO, L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta, Amsterdam.* Vol. 369, p. 1-10.

CAVALIERI E.L.; HIGGINBOTHAM S.; RAMAKRISHNA N.V.; DEVANESAN P.D.; TODOROVIC R.; ROGAN E.G.; SALMASI S. (1991). Comparative dose-response tumorigenicity studies of dibenzo[alpha,l]pyrene versus 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene, benzo[alpha]pyrene and two dibenzo[alpha,l]-pyrene dihydrodiols in mouse skin and rat mammary gland. *Carcinogenesis.* Vol. 12, p. 1939 – 1944.

CETESB (2005). Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Online em http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp.

CETESB (2012). FIT- Fixa de Informação Toxicológica - Estireno. Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental.

CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A. & OUDOT, J.; 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology*. vol. 155, p. 587 – 595.

SCHAPIRA, M., TYERS, M., TORRENT, M., & ARROWSMITH, C. H. (2017). WD40 repeat domain proteins: a novel target class? *Nature Reviews Drug Discovery*. Vol. 16(11), p. 773–786.

CHAUDHRYL Q.; BLOM-ZANDSTRA M.; GUPTA S.; JONER E.J. (2005) Utilising the Synergy between Plants and Rhizosphere Microorganisms to Enhance Breakdown of Organic Pollutants in the Environment *ESPR – Environ Sci & Pollut Res*. Vol. 12(1), p. 34 – 48.

CHEN R.; HILSON P.; SEDBROOK J.; ROSEN E.; CASPAR T.; MASSON PH. (1998). The *Arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci*. Vol. 95, p.15112 – 15117.

CHOI C.H. (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int*. Vol. 5 p. 30.

CLEMENT, M.; LEONHARDT, N.; DROILLARD, M.-J.; REITER, I.; MONTILLET, J.-L.; GENTY, B.; LAURIÈRE C.; NUSSAUME L.; NOEL, L. D. (2011). The Cytosolic/Nuclear HSC70 and HSP90 Molecular Chaperones Are Important for Stomatal Closure and Modulate Abscisic Acid-Dependent Physiological Responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. Vol. 156(3), p. 1481–1492.

CLOUGH T.; KEY M.; OTT I *et al.*, (2009). Protein quantification in label-free LC-MS experiments. *J Proteome Res*. Vol. 8, p. 5275–5284.

CROWLEY, D.E.; ALVEY, S.; GILBERT, E.S. (1997) Rhizosphere ecology of xenobiotic-degrading microorganisms. In *ACS Symposium Series*; Kruger, E. L., Anderson, T. A., Coats, J. R., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC. Vol. 644, p. 20-38.

CUMMINS, I., COLE D., *et al.*, (1997). "Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl." *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. 59(1), p. 35-49.

CUNNINGHAM, S.D. & OW, D.W. (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol*. Vol. 110, p. 715-719.

D'AGOSTINHO, A. & FLUES, M., (2006). Determinação do Coeficiente de Distribuição (Kd) de Benzo(α)pireno em Solo por Isotermas de Sorção – Química Nova. Vol. 29 (4), p. 657-661.

DABESTANI, R. & IVANOV, I. (1999). A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. Photochemistry and Photobiology. Vol 70, p. 10-24.

DAHIYA, P.; FINDLAY, K.; ROBERTS, K; MCCANN, M.C. (2006). A fascicli-domain containing gene, ZeFLA11, is expressed exclusively in xylem elements that have reticulate wall thickenings in the stem vascular system of *Zinnia elegans* cv. Envy. Planta. Vol. 223, p. 1281–1291.

DAI, X.; WANG, G.; YANG, D. S.; TANG, Y., BROUN, P. MARKS, M. D.; SUMNER, LW.; DIXON R. A. & ZHAO P. X. (2010). TrichOME: A Comparative Omics Database for Plant Trichomes. Plant Physiology. Vol. 152, p. 44-54.

DAMERVAL, C.D.; DE VIENNE, M.; ZIVY H. THIELLEMENT. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis. Vol. 7, p 52-54.

DAS, P.D.S. & DATTA R. (2017). Proteomic profiling of vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*) under 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) stress. GeoHealth. Vol 1, p. 66–74.

DAVIES, J.I. & EVANS, W.C. (1964). Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. Biochem Journal. Vol. 91 (2), p. 251–261.

DENISSENKO, M.F.; PAO, A.; TANG, M. & PFEIFER, G.P. (1996). Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. Science. Vol. 247, p. 430-432.

DiGIOVANNI, J. (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. Pharmacol Ther. Vol. 54(1), p. 63-128.

DIXON, D.P. & EDWARDS, R. (2010). The Arabidopsis Book - Glutathione Transferases. American Society of Plant Biologists. Vol. 8.

DIXON, D.P.; LAPHORN, A.; *et al.*, (2002). "Plant glutathione transferases." Genome Biology. Vol.3(3).

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. (1999) Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: EMBRAPA.

DOBSON, M.C. & MOFFAT, A.J. (1995). A Re-evaluation of Objections to Tree Planting on Containment Landfills. Waste Management & Research. Vol. 13(6), p. 579.

DUBROVSKAYA, E.V.; POZDNYAKOVA, N.N.; MURATOVA, A.Y.; *et al.* (2016). Changes in phytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in the course of microbial degradation. *Russ J Plant Physiol.* Vol. 63, p. 172.

DUMAS A-S.; TACONNAT L.; BARBAS E.; RIGAILL G.; CATRICE O.; BERNARD D.; BENAMAR A.; MACHEREL D.; AMRANI A.E.; BERTHOMÉ R. (2016). Unraveling the early molecular and physiological mechanisms involved in response to phenanthrene exposure. *BMC Genomics.* Vol. 17, p. 818.

DUNFORD, H.B. (1999). Peroxidases in chemistry and biology II. Everse J, Everse KE, Grisham MB (eds.), Boca Raton: CRC Press. p. 1-24.

EDWARDS R.; DIXON D.P.; CUMMINS I.; BRAZIER-HICKS M; SKIPSEY M. (2011). New perspectives on the metabolism and detoxification of synthetic compounds in plants. P. Schröder and C.D. Coliins (eds.), *Organic Xenobiotics and Plants: From Mode of Action to Ecophysiology, Plant Ecophysiology* Vol. 8.

EKUNDAYO, E.O.; EMEDE, T.O. & OSAYANDE, D.I. (2001). Effects of crude oil spillage on growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in soils of midwestern Nigeria. *Plant Foods Hum. Nutr.* Vol. 56, p. 313-324.

ELLIOTT M.H.; SMITH D.S.; PARKER C.E.; *et al.*, (2009) Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom.* Vol. 44, p. 1637–1660

ELLIS, R.J. (1979). The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences.* Vol. 4(11), p. 241–244.

ESCHENBACH, A.; KISTNER, M.; BIERL, R.; SCHAEFER, G. & MAHRO, B. (1994). Evaluation of a new, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. *Chemosphere,* Vol. 28(4), p. 683-692.

EVANS C.; NOIREL J.; OW S *et al.*, (2012). An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Anal Bioanal Chem.* Vol. 404, p. 1011–1027.

FAN S.; LI P.; GONG Z.; REN W.; HE N. (2008). Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere.* Vol. 71, p. 1593–1598.

FANG, J. & BARCELONA, M. J. (2003). Coupled oxidation of aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide *Chemosphere.* Vol. 50, p. 105-109.

FAZIO, T. & HOWARD, J.W. (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. In: *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, ed. Bjørseth, A., Marcel Dekker, New York, 1983. Vol.1, p. 461.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, New York, NY. Vol. 246, p. 64-71.

FERNANDES, M.B.; BRICKUS, L.S.R.; MOREIRA, J.C.; & CARDOSO, J.N. (2002). Atmospheric BTX and polyaromatic hydrocarbons in Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere*. Vol. 47, p. 417-425.

FERRO, A.; KENNEDY, J.; DOUCETTE, W.; NELSON, S.; JAUREGUI, G.; MC FARLAND, B. & BUGBEE, B. (1997). Fate of benzene in soils planted with alfalfa: uptake, volatilization, and degradation. Em: KRUGER, E.L.; ANDERSON, T.A.; COATS, J.R. (Eds.) *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. Washington, D.C.: American Chemical Society. ACS Symposium Series. Vol. 664, p. 223–237.

FLOCCO, C.G.; LO BALBO, A.; CARRANZA, M.P.; & GIULIETTI A. M. (2002). Removal of Phenol by Alfalfa Plants (*Medicago sativa L.*) Grown in Hydroponics and its Effect on Some Physiological Parameters. *Acta Biotechnol.* Vol. 22, p. 43-54.

FOTH, H.; KAHL, R.; KAHL, G.F. (1988). Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food Chemistry & Toxicology*. Vol. 26, p. 45-51.

FROVA, C. (2006). "Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives." *Biomolecular Engineering*. Vol. 23(4), p. 149-169.

FURUNO, S.; FOSS, S.; WILD, E.; JONES, K.C.; SEMPLE, K.T.; HARMS, H.; & WICK, L. Y. (2012). Mycelia Promote Active Transport and Spatial Dispersion of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*. Vol. 46(10), p. 5463–5470

GÄLWEILER L.; GUAN C.; MULLER A.; WISMAN E.; MENDGEN K.; YEPHREMOV A.; PALME K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science*. Vol. 282, p. 2226–2230.

GAO Y.; WU S.C.; YU X.Z.; WONG M.H. (2010). Dissipation gradients of phenanthrene and pyrene in the Rice rhizosphere. *Environmental Pollution*. Vol. 158, p. 2596 - 2603.

GAO, Y.Z. & ZHU, L.Z. (2004). Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*. Vol. 55, p. 1169-1178.

GARBAN, B.; BLANCHOUD, H.; MOTALAY-MASSEI, A.; CHEVREUIL, M. & OLLIVON, D. (2002). Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmospheric Environment*. Vol. 36, p. 5395-5403.

GAUTRAT P.; MORTIER V.; LAFFONT C.; DE KEYSER A.; FROMENTIN J.; FRUGIER F.; GOORMACHTIG S. (2019). Unraveling new molecular players involved

in the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*, Journal of Experimental Botany. Vol. 70(4), p. 1407–1417.

GHATAK, A.; CHATURVEDI, P.; & WECKWERTH, W. (2017). Cereal Crop Proteomics: Systemic Analysis of Crop Drought Stress Responses Towards Marker-Assisted Selection Breeding. Frontiers in plant science. Vol. 8, p. 757

GIAVALISCO, P.; NORDHOFF, E.; LEHRACH, H.; GOBOM, J. & KLOSE, J. (2003). Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. Electrophoresis. Vol. 24, p. 207-216.

GIL, P.; DEWEY E.; FRIML J.; ZHAO Y.; SNOWDEN K.C.; PUTTERILL J.; PALME K.; ESTELLE M.; & CHORY J. (2001). BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in Arabidopsis. Genes & Development. Vol. 15(15), p. 1985–1997.

GILBERT, E.S.; CROWLEY, D.E. (1997). Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 63, p. 1933-1938.

GILL, S.S. AND TUTEJA N. (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signal Behav. Vol. 5, p. 26-33.

GLISOVIC, T.; BACHORIK, J.L.; YONG, J.; DREYFUSS, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. FEBS Letters (Elsevier). Vol. 582 (14), p. 1977-1986.

GOMES, A.O. & AZEVEDO, D.A. (2003). Aliphatic and aromatic hydrocarbons in tropical recent sediments of Campo dos Goytacazes, RJ, Brazil. Journal Brazillian Chemistry Society. Vol. 14(3), p. 358-368.

GONZÁLES-PAREDES Y.; ALARCÓN A.; FERRERA-CERRATO R.; ALMARAZ J. J.; MARTÍNEZ-ROMERO E.; CRUZ-SÁNCHE J.S.; MENDONZA-LÓPEZ M.R.; EERNESTO O.O. (2013). Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. Applied Soil Ecology. Vol. 63, p. 105– 111.

GONZÁLEZ P.S.; CAPOZUCCA C.E.; TIGIER H.A.; MILRAD S.R.; AGOSTINI E. (2006). Phytoremediation of phenol from wastewater, by peroxidases of tomato hairy root cultures Enzyme and Microbial Technology. Vol. 39, p. 647–653

GÖRG, A.; WEISS, W.; AND DUNN, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics Vol. 4, p. 3665–3885.

GRAVES, P.R. & HAYSTEAD, T.A.J. (2002). Molecular Biologist's Guide to Proteomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, DC. Vol. 66, p. 39-63.

GREENBLATT, M.S.; BENNETT, W.P.; HOLLSTEIN, M. & HARRIS, C.C. (1994). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Research*. Vol. 54, p. 4855-4878.

GRIMALT, J.O.; MARFIL, C. & ALBAIGÉS, J. (1984). Analysis of hydrocarbons in aquatic sediments. I. Sample handling and extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, New York. Vol. 18, p. 183-194.

GRIMMER G.; BRUNE H.; DEUTSCH-WENZEL R.; NAUJACK K.W.; MISFELD J., TIMM J. (1983). On the contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons to the carcinogenic impact of automobile exhaust condensate evaluated by local application onto mouse skin. *Cancer Letters*. Vol. 21(1), p. 105-113.

GUERIN, T. (1999). The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues from a clay soil using sonication and a Soxhlet procedure: a comparative study. *Journal of Environmental Monitoring*, London. Vol.1, p. 63-67.

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J.-F.; & EZCURRA, I. (2015). WD40-Repeat Proteins in Plant Cell Wall Formation: Current Evidence and Research Prospects. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 6.

GUPTA R.; WANG Y.M.; AGRAWAL G.K.; RAKWAL R.; JO I.H.; BANG K.H.; e KIM S.T. (2015) Time to dig deep into the plant proteome: a hunt for low-abundance proteins. *New Frontier of Plant Science*. Vol. 6(22), p. 1-3.

GUTIÉRREZ-ALCALA, G.; GOTOR, C.; MEYER, A. J.; FRICKER, M.; VEGA J. M. & ROMERO, L. C. (2000). Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 97, p. 11108-11113.

GYGI S.P.; RIST B.; GERBER S.A. *et al.*, (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. Vol. 17, p. 994–999

GYGI, S.P.; CORTHALS, G.L.; ZHANG, Y.N.; ROCHON, Y.; AND AEBERSOLD, R. (2000). Evaluation of twodimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 97, p. 9393–9395.

HAFNER, W. D.; CARLSON, D.L.& R. A. HITES. (2005). Influence of local human population on atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations. *Environmental Science & Technology*. Vol. 39(19), p. 7374-7379.

HALL, M.; FORRESTER, L.M.; PARKER, D.K.; GROVER, P.L. & WOLF, C.R. (1989). Relative contribution of various forms of cytochrome P450 to the metabolism of benzo[a]pyrene by human liver microsomes. *Carcinogenesis*. Vol. 10, p. 1815-1821.

HAMILTON, J.A., JOHNSON, R.A., CORKEY, B., KAMP, F. (2001). Fatty acid transport - The diffusion mechanism in model and biological membranes. *J. Mol. Neurosci.* Vol. 16 (2-3), p. 99-108.

HARDCASTLE, J. I.; BALL, J. C.; HONG, G.; MARKEN, F.; COMPTON, R. G.; BULL, S. D. & DAVIES, S. G. (2000). Sonoelectrochemical and sonochemical effects of cavitation: correlation with interfacial cavitation induced by 20 kHz ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry.* Vol. 7, p. 7-14.

HARITASH, A.K & KAUSHIK, C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials.* Vol. 169, p. 1-15.

HARTATI, S., SUDARMONOWATI, E., PARK, Y.W., KAKU, T., KAIDA, R., BABA, K., AND HAYASHI, T. (2008). Overexpression of poplar cellulase accelerates growth and disturbs the closing movements of leaves in sengon. *Plant Physiol.* Vol. 147, p. 552-561.

HARVEY P.J., CAMPANELLA B.F., CASTRO P.M.L., HARMS H., LICHTFOUSE E., SCHAFFNER A.R., SMRCEK, S. & WERCK-REICHHART D. (2002). Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science and Pollution Research.* Vol. 9, p. 29-47.

HARVEY, R. G. (1991). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenesis.* Cambridge University Press, Cambridge, England.

HAYASHI, T. (1989). Xyloglucans in the primary-cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 40, p. 139-168.

HAYASHI, T., & KAIDA, R. (2011). Functions of Xyloglucan in Plant Cells. *Molecular Plant,* Vol. 4(1), p. 17-24.

HECHMI N.; AISSA N.B.; ABDENACEUR H.; JEDIDI N. (2014). Phytoremediation efficiency of a pcp contaminated soil using four plant species as mono- and mixed cultures. *Int J Phytorem.* Vol. 16(7-12), p. 1241-56.

HEDLUND, B.P; GEISELBRECHT, A.D. & STALEY, J.T. (2001). Marinobacter strain NCE312 has a Pseudomonas-like naphthalene dioxygenase. *FEMS Microbiology Letter.* Vol. 201, p. 47-51.

HELALAH M.I.H., AL-OMAIR A., NISAR A., GEVAO B. (2005). Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* Vol. 1083, p 153-160

HESTER, M. W. & MENDELSSOHN, I. A., (2000). Long-term of a Louisiana brackish marsh plant community from oil – spill impact: vegetation response and mitigating effects of marsh surface elevation. *Marine Environmental Research*, Vol. 49, p. 233-254.

HIGA, L.M., CARUSO, M.B., CANELLAS, F., SOARES, M.R., OLIVEIRA-CARVALHO, A.L., CHAPEAUROUGE, D.A., ALMEIDA, P.M., PERALES, J., ZINGALI, R.B. & Da POIAN A T. (2008). Secretome of HepG2 cells infected with dengue virus: implications for pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1784, p. 1607-1616.

HOAGLAND, D.R. AND ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Berkeley, Circ.* Vol. 347, p. 1-39, 1950.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B. & HARRIS. C.C. (1991). P53 mutations in human cancers. *Science*. Vol. 253, p. 49-53.

HUANG P.H., CHIANG H.L., (1997). Identification of novel vesicles in the cytosol to vacuole protein degradation pathway. *J Cell Biol.* Vol. 136, p. 803-810.

HUANG, G.Q., XU, W.L., GONG, S.Y., LI, B., WANG, X.L., XU, D. AND LI, X.B. (2008). Characterization of 19 novel cotton FLA genes and their expression profiling in fiber development and in response to phytohormones and salt stress. *Physiol. Plant.* Vol. 134, p. 348–359.

HUNG G.G., BROWN C.R., CARTER D., CHIANG H., ELCO C., McCANN J. (2001). A novel membrane-associated protein Vid27p regulates import of fructose-1,6-bisphosphatase into VID vesicles. Personal Communication to SGD. *Journal of Cell Science*. Vol. 115, p. 655-666.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER Work Groups (2010). Benzo [a] Pyrene. *IARC Monographs – 100F* (1973, 1983 e 2010). p. 111-144.

ITO K. & AKIYAMA Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 59, p. 211–231.

ITO, S., SUZUKI, Y., MIYAMOTO, K., UEDA, J. AND YAMAGUCHI, I. (2005) AtFLA11, a fasciclin-like arabinogalactan-protein, specifically localized in sclerenchyma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol. 69, p. 1963–1969.

JAQUES L. B. (1973). Protamine--antagonist to heparin. *Canadian Medical Association journal*. Vol. 108(10), p. 1291–1297.

JENSEN, P. E., HALDRUP, A., ZHANG, S., & SCHELLER, H. V. (2004). The PSI-O Subunit of Plant Photosystem I Is Involved in Balancing the Excitation Pressure between the Two Photosystems. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279(23), p. 24212–24217.

JERINA, D.M.; THAKKER, D.R. & YAGI, H. (1978). Carcinogenicity of benzo(a)pyrene derivatives: the bay region theory. *Pure and Applied Chemistry*. Vol. 50, p. 1033-1044.

JOHNSEN, A.R., KARLSON, U., (2005). PAH degradation capacity of soil microbial communities. Does it depend on PAH exposure? *Microb. Ecol.* Vol. 50, p. 488–495.

JONER, E.J.; CORGIE, S.C.; AMELLAL, N. & LEYVAL, C. (2002). Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 34, p. 859-864.

JONHNSON D.L., MAGUIRE K.L., ANDERSON D.R., McGRATH, S.P., (2004). Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 36, p. 33–38.

JUHASZ, A.L. & NAIDU, R., (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* Vol. 45, p. 57–88.

KAIDA, R., SUGAWARA, S., NEGORO, K., MAKI, H., HAYASHI, T., AND KANEKO, T.S. (2010). Acceleration of cell growth by xyloglucan oligosaccharides in suspension-cultured tobacco cells. *Mol. Plant.* Vol. 3, p. 549–554.

KANALY, R.A. & HARAYAMA, S., (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* Vol.182, p. 2059–2067.

KANG J, PARK J, CHOI H, BURLA B, KRETZSCHMAR T, LEE Y, MARTINOIA E. (2011). Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book*. Plant ABC Transporters. The arabidopsis book, 9, e0153.

KARAS, M. & HILLENKAMP, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10.000 daltons. *Analytical Chemistry*, Columbus, OH. Vol. 60(20), p. 2299-2301.

KARLSON D., NAKAMINAMI K., TOYOMASU T., IMAI R. (2002). A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, p. 35248–35256.

KATO Y & SAKAMOTO W. (2018). FtsH Protease in the Thylakoid Membrane: Physiological Functions and the Regulation of Protease Activity. *Front Plant Sci.* Vol. 9, p. 855.

KAUSHISH, L.M., BAHUGUNA, A., DANGWAL, K., GARG, V., (2009). Degradation of benzo[a]pyrene by novel strain *Bacillus subtilis* BMT41 (MTCC9447). *Braz. J. Microbiol.* Vol. 40, p. 884–892.

KEUM Y.S., SEO J.S., LI Q.X. (2005). Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 35, p. 2685–2693.

KEUM, Y.S., SEO, J.S., LI, Q.X., KIM, J.H., (2008). Comparative metabolomics analysis of *Sinorhizobium* sp. C4 during the degradation of phenanthrene. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. Vol. 80, p. 863–872.

KIM Y.J., LEE H.M., WANG Y.M., WU J.N., KIM S.G., KANG K.Y., PARK K.H., KIM Y.C., CHOI I.S., AGRAWAL G.K., RAKWAL R. e KIM S.T. (2013). Depletion of abundant plant RuBisCO protein using the protamine sulfate precipitation method. *Proteomics*. Vol. 13, p. 2176–2179

KIM, S. T., CHO, K. S., JANG, Y. S., AND KANG, K. Y. (2001). Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*. Vol. 22, p. 2103–2109.

KIPOPOULOU, A. M. & SAMARA, E. M. (1999). Bioconcentration of Polycyclic Aromatics Hydrocarbons in an Industrial Area. *Environmental Pollution*. Vol. 106, p. 369-380.

KIRK J.L., KLIRONOMOS J.N., LEE H., TREVORS J.T. (2005). The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*. Vol. 133, p. 455–465.

KLIBANOV AM, ALBERTI BN, MORRIS ED, FELSHIN LM. (1980). Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters. *J Appl Biochem*. Vol. 2, p. 414–421.

KLOSE J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*. Vol. 26(3), p. 231-43.

KNOETZEL, J., MANT, A., HALDRUP, A., JENSEN, P. E., & SCHELLER, H. V. (2002). PSI-O, a new 10-kDa subunit of eukaryotic photosystem. *FEBS Letters*. Vol. 510, p. 145-148.

KONG, D., LI, M., DONG, Z., JI, H., & LI, X. (2015). Identification of TaWD40D, a wheat WD40 repeat-containing protein that is associated with plant tolerance to abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, Vol. 34(3), p. 395–410.

KORTE, F.; KVESITADZE, G.; UGREKHELIDZE, D.; GORDEZIANI, M.; KHATISASHVILI, G.; BUADZE, O.; ZAALISHVILI, G. & COULSTON, F. (2000): Review. Organic toxicants and plants. *Ecotox Environ Safety*. Vol. 47, p. 1-26.

KRAHN, M. M.; YLITALO, G. M.; JOSS, J. & CHAN, S-L (1991). Rapid, semiquantitative screening of sediments for aromatic compounds using sonic

extraction and hplc/fluorescence analysis. *Marine Environmental Research*, Barking. Vol. 31(3), p. 175-193.

KRAMERS, P.N.G. & VAN DER HELIDEN, C.A. (1988). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): carcinogenicity data and risk extrapolation. *Toxicological and Environmental Chemistry*. Vol. 16, p. 41-351.

KRISHNAN, H.B., AND NATARAJAN, S.S. (2009). A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. *Phytochemistry*. Vol. 70, p. 1958–1964.

KRZYWDA S., BRZOZOWSKI A.M., KARATA K., OGURA T., WILKINSON A.J. (2002). Crystallization of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* Vol. 58, p. 1066–1067.

KUIPER I., LAGENDIJK E.L., BLOEMBERG G.V. and LUGTENBERG B.J.J. (2004) Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol. 17(1), pp. 6–15.

KUMAR S, JIN M, WEEMHOFF JL. (2012) Cytochrome P450-Mediated Phytoremediation using Transgenic Plants: A Need for Engineered Cytochrome P450 Enzymes. *J Pet Environ Biotechnol*. Vol. 3(5), p. 100-127.

LA VOIE E.J., CAI Z.W., METSCHER C.L., WEYAND E.H. (1994). Tumorigenic activity of fluoranthene, 2-methylfluoranthene and 3-methylfluoranthene in newborn CD-1 mice. *Carcinogenesis*. Vol.15, p. 2131-2135.

LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Vol. 227, p. 680-685.

LAFARGUETTE, F., LEPLÉ, J.C., DEJARDIN, A., LAURANS, F., COSTA, G., LESAGEDESCAUSES, M.C. AND PILATE, G. (2004). Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytol*. Vol. 164, p. 107–121.

LAHA, S. & LUTHY, R.G. (1992). Effects of non-ionic surfactants on the solubilisation and mineralisation of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol Bioeng*. Vol. 40, p. 1367-1380.

LANDA, P.; STORCHOVA H.; *et al.*, (2010). "Transferases and transporters mediate the detoxification and capacity to tolerate trinitrotoluene in *Arabidopsis*." *Functional & Integrative Genomics*.

LANDMEYER, J.E. (2012). *Introduction to Phytoremediation of Contaminated Groundwater. Historical Foundation, Hydrologic Control, and Contaminant Remediation*. Springer.

- LARCHER, W. (2000). *Ecofisiologia vegetal*. Ed. Rima, São Carlos. p. 455-458.
- LATIMER, J. S., & ZHENG, J. (2003). The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment. *Ecological and Environmental Toxicology Series*. p. 7–33.
- LAU E.V., GAN S. and NG H. K. (2012) Extraction Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils. *International Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 2010, p. 9.
- LEE S-H.; LEE W-S.; LEE C-H. & KIM, C. J-G. (2008). Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 153, p. 892-898.
- LEE, H.-B; DOOKHRAN, G. & CHAU, A. S. Y. (1987). Analytical reference materials. Part VI. Development and certification of a sediment reference material for selected polynuclear aromatic hydrocarbons. *The Analyst, London*. Vol. 112(1), p. 31-35.
- LEVINE, A.J.; WU, M.C.; CHANG, A.; SILVER, A.; ATTIYEH, E.F.; LIN, J. & EPSTEIN, C.B. (1995). The spectrum of mutations at the p53 locus. Evidence for tissue-specific mutagenesis, selection of mutant alleles, and a “gain of function” phenotype. *Annals of the New York Academy of Science*. Vol. 768, p. 111-128.
- LI, J.H.; GAO, Y.; WU, S.C.; CHEUNG, K.C.; WANG X.R. & WONG, M.H. (2008). Physiological and biochemical responses of Rice (*oryza sativa* L.) To phenanthrene and pyrene. *International Journal of Phytoremediation*. Vol. 10, p. 106-118.
- LISTE H.H. & PRUTZ I. (2006). Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere*. Vol. 62, p. 1411–1420.
- LIU, H., WEISMAN, D., TANG, L., TAN, L., ZHANG, W., WANG, Z., HUANG Y., LIN W., LIU X. & COLÓN-CARMONA, A. (2014). Stress signaling in response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in *Arabidopsis thaliana* involves a nucleoside diphosphate kinase, NDPK-3. *Planta*. Vol. 241(1), p. 95–107.
- LO, M.T. & SANDI, E. (1978). Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. *Residue Reviews*. Vol. 69, p. 35-86.
- LÓPEZ-ORTIZ, C., FERRERA-CERRATO, R., ALARCÓN, A., ALMARAZ-SUÁREZ, J.J., MARTÍNEZROMERO, E., MENDOZA-LÓPEZ, M.R. (2012). Establishment and physiological responses of the symbiosis *Rhizobium tropici*-*Leucaena leucocephala* in presence of phenanthrene and naphthalene. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. Vol. 28 (4).
- LORS, C.; DAMIDOT, D.; PONGE, J-F. & PÉRIÉ, F. (2012). Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. *Environmental Pollution*. Vol. 165, p. 11-17.

LUQUE DE CASTRO, M. D. & JIMÉNEZ-CARMONA, M. M. (2000). Where is supercritical fluid extraction going? *Trends in Analytical Chemistry*, Amsterdam. Vol. 19(4), p. 223-228.

LUQUE-GARCÍA, J.L. & LUQUE DE CASTRO, M. D. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, Amsterdam. Vol. 22(1), p. 41-47.

LUSCHNIG C., GAXIOLA R.A., GRISAFI P., FINK G.R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Dev.* Vol. 12, p. 2175–2187.

LÜTTGE, U., & RATAJCZAK, R. (1997). The Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Plant Vacuolar ATPase. *The Plant Vacuole*. Vol. 25, p. 253–296.

LUZ, C.C., SANTOS, E.A., SANTOS, M. O. S., MUSSY, M. Y., YAMASHITA, M., & BASTOS, W. R. (2011). Estudos de biodegradação de óleo diesel por consorcio microbiano coletado em Porto Velho- RO, Amazônia. *Quimica Nova*. 34(5), p. 775-779.

MA B., WANG J., XU M., HE Y., WANG H., WU L., XU J. (2012). Evaluation of dissipation gradients of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice rhizosphere utilizing a sequential extraction procedure. *Environmental Pollution*, 162, 413 – 421.

MACEK, T.; MACKOVA, M. & KAS, J. (2000). Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol Advances* 18, p. 23-34.

MACLEOD, W. D.; BROWN, D. W.; FRIEDMAN, A. J.; BURROWS, D. G.; MAYNES, O.; PEARCE, R. W.; WIGREN, C. A. & BOGAR, R. G. (1985). Standard analytical procedures of the National Oceanic Atmospheric Administration (NOAA), National Analytical Facility, 1985-1986: Extractable toxic organic compounds. 2. ed. Seattle: National Marine Fisheries Service. (NOAA Technical Memorandum, NMFS F/NWC-92), p. 121.

MACMILLAN, C. P., MANSFIELD, S. D., STACHURSKI, Z. H., EVANS, R., & SOUTHERTON, S. G. (2010). Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *The Plant Journal*, 62(4), 689–703.

MANGEON, A. JUNQUEIRA, R. M. & SACHETTO-MARTINS, G. (2010). Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav.* 5(2), p. 99-104.

MATERA, A. G.; TERNS, R. M.; TERNS, M. P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Nature Publishing Group) 8 (3), p. 209-220.

MCCONKEY, B., DUXBURY, C., DIXON, D., AND GREENBERG, B. (1997). Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: effects of phenanthrene and its primary photoproduct, phenanthrenequinone, *Environ. Toxicol. Chem.* vol. 16, pp. 892–899.

McCUTCHEON, S.C. & SCHONOR, J.L. (2003). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. John Wiley & Sons (Eds.). New Jersey, p. 987p

MEAGHER, R. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr Op Plant Biol* 3, p. 153-162.

MEIRE R.O., AZEREDO A.. TORRES J.P.M. (2007). Aspectos Ecotoxicológicos De Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. *Oecol. Bras.*, 11 (2): 188-201.

MEIRELES, K. G. X. (2007). *Aplicações da Proteômica na Pesquisa Vegetal*. Embrapa Gado de Corte Campo Grande, MS. (Documentos 165 ISSN 1983-974X), p. 7-40.

MEJARE. M. & BULOW, L. (2001). Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol* 19, p. 67-73.

MELLENDEZ-COLON V.J.; LUCH A.; SEIDEL A.; BAIRD W.M. (2000). Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites, *Carcinogenesis* 20: 1885-1891.

MENICONI, M.F.G.; GABARDO, I.T.; CARNEIRO, M.E.R.; BARBANTI, S.M.; SILVA, G.C. & MASSONE, C.G. (2002). Brazilian Oil Spills Chemical Characterization—Case Studies. *Environmental Forensics*, 3(3-4), p. 303-321.

MERKL N., SCHULTZE-KRAFT R., INFANTE C. (2005). Phytoremediation in the tropics e influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental Pollution*, 138, 86 – 91.

MEYER, P.A. & ISHIWATARI, R. 1993. Lacustrine organic geochemistry – an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry*, 20. p. 867-900.

MIYA, R. K.; FIRESTONE, M. K. (2001). Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *J. Environ. Qual.* 2001, 30, 1911-1918.

MODICA, R.; FIUME, M.; GUAITANI, A. & BARTOSEK, I. 1983. Comparative kinetics of benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration. I. Study with single compounds. *Toxicology Letters*, 18: 103-109.

MOREL. J. L.; CHAINEAU C. H.; SCHIAVON, M. & LICHTFOUSE, E. (1999). The role of plants in the remediation of contaminated soils. In: Ph Baveye (Eds): Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment. Kluwer Acad Publ, London p. 429-449.

MORSELLI, L.; SETTI L.; IANNUCILLI, A.; MALY, S.; DINELLI, G. & QUATTRONI, G. (1999) Supercritical fluid extraction for the determination of petroleum hydrocarbons in soil. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 845, n. 1-2, p. 357-363.

MÜLLER A., GUAN C., GALWEILER L., TANZLER P., HUIJSER P., MARCHANT A., PARRY G., BENNETT M., WISMAN E., PALME K. (1998). AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J.* 17:6903–6911.

MURAD, A. M., SOUZA, G. H. M. F., GARCIA, J. S., & RECH, E. L. (2011). Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MSE. *Journal of Separation Science*, 34(19), 2618–2630. doi:10.1002/jssc.201100238

MURATOVA, A. Y.; GOLUBEV, S. G.; DUBROVSKAYA, E. V.; POZDNYAKOVA, N. N.; PANCHENKO, L. V.; PLESHAKOVA, E. V., CHERNYSHOVA, M. P. & TURKOVSKAYA O. V. (2015). Remediating abilities of different plant species grown in diesel-fuel-contaminated leached chernozem. *Applied Soil Ecology* 56, p. 51-57.

MURATOVA, A., POZDNYAKOVA, N., MAKAROV, O., BABOSHIN, M., BASKUNOV, B., MYASOEDOVA, N., GOLOVLEVA, L., AND TURKOVSKAYA, O. (2014). Degradation of phenanthrene by the rhizobacterium *Ensifer meliloti*, *Biodegradation*. vol. 25, pp. 787–795.

MURATOVA, A.YU., KAPITONOVA, V.V., CHERNYSHOVA, M.P., TURKOVSKAYA, O.V., (2009). Enzymatic activity of alfalfa in a phenanthrene-contaminated environment. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 58, 317–322.

NAKAMINAMI K., SASAKI K., KAJITA S., TAKEDA H., KARLSON D., OHGI K., IMAI R. (2005). Heat stable ssDNA/RNA-binding activity of a wheat cold shock domain protein. *FEBS Lett.* 579, 4887–4891.

NAKAMURA, S., AND HAYASHI, T. (1993). Purification and properties of extracellular endo-1,4-b-glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant Cell Physiol.* 34, 1009–1013.

NANJO Y, NOURI MZ, KOMATSU S (2011) Quantitative proteomic analyses of crop seedlings subjected to stress conditions; a commentary. *Phytochemistry* 72:1263–1272.

NEFF, J.M. (1979). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment Sources, fate, and biological effects. Applied Science Publishers, London.

NEFF, J.M. (1984). Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 319, p. 132-136.

NEILSON KA, ALI NA, MURALIDHARAN S et al. (2011) Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 11:535–553

NESTERENKO-MALKOVSKAYA, A.; KIRZHNER, F., ZIMMELS, Y. & ARMON. R. (2012). *Eichhornia crassipes* capability to remove naphthalene from wastewater in the absence of bacteria. *Chemosphere* 87, p. 1186-1191.

NETTO, A.D.P.; DIAS, J.C.M.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L.F. & BAREK, J. (2000). Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica, *Química Nova*, 23(6) p. 765-773.

NIDHI R., VIPUL B.P., BHAVIKA D., LALIT M., & MAHESH K.M. (2016). Abiotic stresses alter expression of S-Adenosylmethionine synthetase gene, polyamines and antioxidant activity in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Legume Research*, 39 (6): 905-913

NISHIGIMA, F.N.; WEBER, R.R. & BÍCEGO, M.C. (2001). Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of Santos and Cananeia, SP, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 42, p. 1064-1072.

NIWA H., TSUCHIYA D., MAKYIO H., YOSHIDA M., MORIKAWA K. (2002). Hexameric ring structure of the ATPase domain of the membrane-integrated metalloprotease FtsH from *Thermus thermophilus* HB8. *Structure* 10 1415–1423. 10.1016/S0969-2126(02)00855-9

NOORDMAN, W. & JANSSEN, D. (1995). Desorption of adsorbed organic pollutants stimulated by biosurfactants. In: Van Den Brink W, Bosman R, Arendt F (Eds): *Contaminated soil '95*. Kluwer Acad Publ, London, p. 1319-1322.

NOVAK J.M., JAYACHANDRAN K., MOOMAN, T.B., WEBER, J.B. (1995). Sorption and binding of organic compounds in soils and their relation to bioavailability. *Soil Science Society of America (SSSA) Special Publication* 43, Madison, pp. 13–31.

O'FARRELL, P. H., (1975). O'Farrell, P. H., *J. Biol. Chem.* 1975,250, 4007–4021. *Journal Biological Chemistry*. v. 250, p. 4007-4021.

OHMIYA, Y., NAKAMURA, S., SAKAI, F., AND HAYASHI, T. (1995). Purification and properties of wall-bound endo-1,4-b-glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant Cell Physiol.* 36, 607–614.

OKERE, U.V. & SEMPLE, K.T. (2012). Biodegradation of PAHs in 'Pristine' Soils from Different Climatic Regions. *J Bioremed. Biodegrad.* S1:006, p. 2155-6199.

OLD WM, MEYER-ARENDT K, AVELINE-WOLF L *et al.*, (2005) Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* 4:1487–1502.

OLDROYD G.E.D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*. 11, 252–263.

OLSON P.E., REARDON K.F., PILON-SMITS E.A.H. (2003). Ecology of rhizosphere bioremediation. *em: McCUTCHEON, S.C., JERALD, L., SCHNOOR, J.L. (Eds.), Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants. John Wiley and Sons, Hoboken, pp. 317–353.*

ONG SE, BLAGOEV B, KRATCHMAROVA I *et al.*, (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1:376–386.

PAGE, D.S.; BOEHM, P.D.; DOUGLAS, G.S.; BENICE, A.E.; BURNS, W.A. & MANKIEWICZ, P.J. (1999). Pyrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in sediments record past human activity: A case study in Prince William Sound, Alaska. *Marine Pollution Bulletin*, 38, p. 247-266.

PANDEY, A. & MANN, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 405, p. 837-846.

PAOLA S. GONZÁLEZ, CRISTIAN E. CAPOZUCCA, HORACIO A. TIGIER SILVIA R. MILRAD, ELIZABETH AGOSTINI (2006). Phytoremediation of phenol from wastewater, byperoxidases of tomato hairy root cultures *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) 647–653.

PARK, Y.W., TOMINAGA, R., SUGIYAMA, J., FURUTA, Y., TANIMOTO, E., SAMEJIMA, M., SAKAI, F., & HAYASHI, T. (2003). Enhancement of growth by expression of poplar cellulase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 33, 1099–1106.

PARRY M.A.J., ANDRALOJC P.J., KHAN S., LEA P.J., KEYS A.J. (2002). Rubisco Activity: Effects of Drought Stress, *Annals of Botany*. 89 (7): 833–83.

PASTENES, C., & HORTON, P. (1996). Effect of High Temperature on Photosynthesis in Beans (I. Oxygen Evolution and Chlorophyll Fluorescence). *Plant Physiology*, 112(3), 1245–1251.

PATHAK, D.; ASHLEY, G. & OLLIS, D. (1991) Thiol protease-like active site found in the enzyme diene lactone hydrolase: localization using biochemical, genetic, and structural tools. *Proteins*. V. 9(4):267-79.

PATTERSON, S. D., AND AEBERSOLD, R. H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* 33, 311–323. doi: 10.1038/ng1106.

PEIXOTO, F. B. S., PEIXOTO, J. C. D. C., ASSUNÇÃO, E. N. DE, PEIXOTO, E. M., PEREIRA, J. O., & ASTOLFI-FILHO, S. (2017). Petroleum biodegrading and co-resistance to antibiotics by *Serratia marcescens* strain isolated in Coari, Amazonas. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 39(4), 489.

PELLOUX, J.; RUSTERUCCI, C. & MELLEROWICZ, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12, p. 267–277.

PEREIRA S.M.; HEITMANN, D.; REIFENHÄUSER, W.; MEIRE, R.O.; SANTOS L.S.; TORRES J.P.M.; MALM, O. & KÖRNER, W. (2007). Persistent organic pollutants in atmospheric deposition and biomonitoring with *Tillandsia usneoides* (L.) in an industrialized area in Rio de Janeiro state, southeast Brazil – Part II: PCB and PAH. *Chemosphere*, 67, p. 1736-1745.

PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B. & MIGUEL, A.H. (2002). Measurements of semivolatile and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in a bus station and an urban tunnel in Salvador, Brazil. *Journal of Environmental Monitoring*, 4, p. 558-561.

PÉREZ S., GUILLAMÓN M., BARCELÓ D. (2001) Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants. *Journal of Chromatography A*, 938 57–65.

PERSSON, S., WEI, H.R., MILNE, J., PAGE, G.P. AND SOMERVILLE, C.R. (2005) Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102, 8633–8638.

PEZESHKI, SR., HESTER, MW., LIN, Q. and NYMAN, JA., (2000). The effects of oil spill and clean up on dominant US ulf coast marsh macrophytes: a review. *Environmental Pollution*, vol. 108, no. 2, p. 129-139.

PHAM, C.T., KAMEDA, T., TORIBA, A., TANG, N., HAYAKAWA, K., (2012). Characteristics of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in Hanoi-Vietnam, as a typical motorbike city. *Polycycl. Aromat. Comp.* 32, 296–312.

PHILLIPS, L. A.; GREER, C. W.; GERMIDA, J. J. (2006). Culture-based and culture-independent assessment of the impact of mixed and single plant treatments on rhizosphere microbial communities in hydrocarbon contaminated flare-pit soil. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2823-2833.

PILON-SMITS E.A.H. (2005) Phytoremediation. *Annual Reviews in Plant Biology* 56:15-39.

PIMENTEL I.C., DIONÍSIO J. A. SIGNOR D. (2016). Guia prático de biologia do solo – Cap. III, Protocolo I - Contagem de Bactérias pelo Método de Semeadura em

Superfície. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Núcleo Estadual do Paraná. pg. 20.

PUNGALENDHI, P. & MANOHARAN, S. (2010). Chemopreventive Potencial of Genistein and Daidzein in Combination during 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene (DMBA) Induced Mammary Cascinogenesis in Sprague-Dawley Rats. *Pakistan Journal of Biological Sciencies*. 13(6), p. 279-286.

QUEIROZ, S.C.N; FERRACINI, V.L & SOUZA, D.R.C. (2009). Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo. *Embrapa Meio Ambiente, Documentos 79*, p. 1516-4691.

RADADIYA N., PAREKH V.B, DOBARIYA B, MAHATMA L., MAHATMA M.K. (2016). Abiotic stresses alter expression of S-Adenosylmethionine synthetase gene, polyamines and antioxidant activity in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Legume Research-An International Journal*. Vol. 39, p. 905-913

RANGER, C. M. & HOWERB, A. A. (2001) Glandular Morphology from a Perennial Alfalfa Clone Resistant to the Potato Leafhopper. *Crop Science* 41, p. 1427-1434.

RANGER, C. M.; WINTER, R.E.; ROTTINGHAUS, G. E.; BACKUS, E. A.; JONHSON, D. W. (2005). Mass spectral characterization of fatty acid amides from alfalfa trichomes and their deterrence against the potato leafhopper. *Phytochemistry*. 66, p. 529-41.

RAO, K. V. M.; RAGHAVENDRA, A. S. & REDDY, K. J. (2006). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer.

RAPPSILBER, J.; MANN, M. & ISHIHAMA, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*. vol.2 no.8, p. 1896-1906.

RASKIN I.; KUMAR P.B.A.N.; DUSHENKOV S.; SALT D.E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol*. 5: 285–90.

RASSINI, J. B.; FERREIRA, R. P. & CAMARGO, A. C. (2008). Cultivo e estabelecimento da alfafa. Em: *Cultivo e utilização da alfafa nos trópicos*. Embrapa pecuária sudeste, São Carlos, SP, p. 39-51.

RASSINI, J. B.; PRIMAVESI, A.C.; PRIMAVESI, O.; TUPY, O.; LÊDO, F. J. S.; FERREIRA, R. P.; BOTREL, M. A. & ALVIM, M. J. (2003). *Cultivo da Alfafa*, Embrapa Pecuária Sudeste. Sistema de Produção, 1 ISSN 1679-1495 Versão Eletronica Jan/2003.

READ D.B., BENGOUGH A.G., GREGORY P.J., CRAWFORD J.W., ROBINSON D., SCRIMGEOUR C.M., YOUNG I.M., ZHANG K., ZHANG X. (2003). Plant roots release

phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. *New Phytol.* 157, 315–326.

REINDL, S. & HÖFLER, F. (1994). Optimization of the parameters in supercritical fluid extraction of polynuclear aromatic hydrocarbons from soil samples. *Analytical Chemistry*, Amsterdam, v. 66, p. 1808, 1994.

RENTZ, J.A., ALVAREZ, P.J.J., SCHNOOR, J.L., (2005). Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: implications for phytoremediation. *Environ. Pollut.* 136, 477–484.

REYZER, M.L. & CAPRIOLI, R.M., (2007). MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11 (1), 29–35.

RIGHETTI, T.L., CHARD, C.H., & BACKHAUS, R.A. (1986). Soil and environmental factors related to nodulation in *Cowania* and *Purshia*. *Plant and Soil*, 91(2), 147–160.

RODRIGUES, N. E. & EROLES, S. F. (2008). Morfologia da Alfafa. Em: Cultivo e utilização da alfafa nos trópicos. Embrapa pecuária sudeste, São Carlos, SP, p. 17-36.

RODRIGUES, S.P.; VENTURA, J.A.; ZINGALI, R.B. & FERNANDES, P. M. B. (2009). Evaluation of Sample Preparation Methods for the Analysis of Papaya Leaf Proteins through Two-dimensional Gel Electrophoresis. *Phytochemical. Analysis* 20, p. 456-464.

ROMANOV, V. I AND MARTINEZ-ROMERO, E. (1994). Sucrose transport and hydrolysis in *Rhizobium tropici*. *Plant and Soil* 161: 91-96.

ROPPOLO D., BOECKMANN B., PFISTER A., BOUTET E., RUBIO M.C., DÉNERVAUD-TENDON V., VERMEER J.E.M., GHEYSELINCK J., XENARIOS I., & GELDNER N. (2014). Functional and evolutionary analysis of the CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEIN family, *Plant Physiol.*, 165(4), 1709–1722.

ROSE, N.L. & RIPPEY, B. (2002). The historical record of PAH, PCB, trace metal and fly-ash particle deposition at a remote lake in north-west Scotland. *Environmental pollution*, 117, p. 121-132.

ROSEN, R., BUTTNER, K., BECHER, D., NAKAHIGASHI, K., YURA, T., HECKER, M. & *et al.*, (2002). Heat shock proteome of *Agrobacterium tumefaciens*: Evidence for new control systems. *J. Bacteriol.* 184, p. 1772-1778.

ROSS PL, HUANG YN, MARCHESE JN *et al.*, (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3:1154–1169

ROTH-NEBELSICK, A. *et al.*, (2001). Evolution and Function of Leaf Venation Architecture: A Review. *Annals of Botany*, 87(5), 553–566. doi:10.1006/anbo.2001.1391

RUSSELLE, M. (2001). After an 8000-year journey, the “Queen of Forages” stands poised to enjoy renewed popularity. *American Scientist*, May June 2001.

SALEHI-LISAR, S.Y., & DELJOO, S. (2015). The physiological effect of fluorene on *Triticum aestivum*, *Medicago sativa*, and *Helianthus annuus*. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1).

SALEKDEH, G. H. & SIOPONGCO, J. (2002). A proteome approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Res.* 76, p. 199–219.

SALISBURY, F. B. & ROSS, C. W. (2012). *Fisiologia das plantas*. Tradução da 4ª edição norte-americana. Editora CENGAGE Learning.

SALT D.E.; SMITH R.D.; RASKIN I. (1998). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:643–68

SALT, D. E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N. P. B. A.; DUSHENKOV, V. & ENSLEY, B.D.; *et al.*, (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13, p. 468-74.

SALT, D. E.; PRINCE, R.C.; PICKERING, I. J. & RASKIN, I. (1995). Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* 109, p. 1427-1433.

SAMPAIO, FERNANDA BUENO. (2013) Isolados de rizóbios capturados por genótipos silvestres de feijoeiro: obtenção, morfologia e uso de fontes de carbono. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos.

SANDERMANN, H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* 17, Elsevier Science Publishers, (UK). p. 82-83.

SANDERMANN, H. (1994): Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics* 4, 225-241.

SANDERMANN, H. (1999). Plant Metabolism of Organic Xenobiotics. Status and Prospects of the 'Green Liver' Concept. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* Volume 36, p. 321-328.

SANDIM V., PEREIRA D.A., KALUME D., OLIVEIRA-CARVALHO A.L., ORNELLAS A.A., SOARES M.R., ALVES G. e ZINGALI R.B. (2015). Proteomic analysis reveals

differentially secreted proteins in the urine from patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2015, 1–15.

SANTOS, C.Y.M.; AZEVEDO, D.A.A. & NETO, F.R.A. (2004). Atmospheric distribution of organic compounds from urban areas near a coal-fired power station. *Atmospheric Environment*, 38, p. 1247-1257.

SARAVANAN, R. & ROSE, J. K. C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, v. 4, p. 2522-2532.

SASAKI K., & IMAI R. (2012) Pleiotropic Roles of Cold Shock Domain Proteins in Plants. *Front Plant Sci.* 2011; 2: 116.

SAUVAIN, J. J. & VU DUC, T. (2001) Development of an analytical method for the simultaneous determination of 15 carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic nitrogen heterocyclic compounds. Application to diesel particulates. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, Berlin, v. 371, n. 7, p. 966-974.

SAYARA, T., SARRÀ, M., & SÁNCHEZ, A. (2009). Optimization and enhancement of soil bioremediation by composting using the experimental design technique. *Biodegradation*, 21(3), 345–356.

SCHEELE G.A. (1975). Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 250, 5375-5385.

SEHRAWAT, A., ABAT, J. K., AND DESWAL, R. (2013). RuBisCO depletion improved proteome coverage of cold responsive S-nitrosylated targets in *Brassica juncea*. *Front. Plant Sci.* 4:342.

SHEN, Y., LI, J., GU, R., ZHAN, X., & XING, B. (2019). Proteomic analysis for phenanthrene-elicited wheat chloroplast deformation. *Environment International*, 123, 273–281.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V. & MANN, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. vol.1 no.6, p. 2856-2860.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O. & MANN, M.; (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* 1996, 68, p. 850-858.

SHORT, J. W.; LINDBERG, M. R.; HARRIS, P. M.; MASELKO, J. M.; PELLA, J. J. & RICE, S. D. 2004. Estimate of oil persisting on beaches of Prince William Sound, 12 years after the Exxon Valdez oil spill. *Environ. Sci. Technol.* 38. p. 19-25.

SILLIMAN J. E.; MEYERS P. A. & EADIE, B. J. 1998. Perylene: an indicator of alteration processes or precursor materials? *Organic Geochemistry*, 29: 1737–1744.

SILO-SUH, L.; SUH, S. J.; SOKOL, P. A. & OHMAN, D. E. (2002). A Simple alfalfa seedling infection model for *Pseudomonas aeruginosa* strains associated with cystic fibrosis shows AlgT (Sigma-22) and RhIR contribute pathogenesis *Proc. Natl. Sci. USA* 99, p. 15699-15704.

SISINNO, C. L. S.; PEREIRA NETTO, A. D.; REGO, E. C. P. & LIMA, G. S. V. (2003). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 671-678.

SIVASANKAR S., SHELDERICK B. & ROTHSTEIN S. J. (2000). Expression of Allene Oxide Synthase Determines Defense Gene Activation in Tomato. *Plant Physiology*, Vol. 122, p. 1335-1342.

SÖHNGEN N.L. (1913). Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und nergiequelle für Mikroben. *Zentr Bacteriol Parasitenk* , Vol. 37, p. 595–609.

SOLHAUG A.; REFSNES M.; LÅG M.; SCHWARZE P.E.; HUSØY T.; HOLME J.A. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells, *Carcinogenesis*. 25(5): 809-19.

SOMASEGARAN P. & HOBEN H. J. (1985). Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. doi: 10.1007/978-1-4613-8375-8.

SOUZA, R.C. (2008). Metodologia para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos e solos periféricos à represa São Pedro – Juiz de Fora, MG. Dissertação de mestrado, UFJF, Instituto de ciências exatas, departamento de química.

STACEY, G.; McALVIN, C. B.; KIM, S-Y.; OLIVARES J. & SOTO, M. J. (2006). Effects of Endogenous Salicylic Acid on Nodulation in the Model Legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, Vol. 141, p. 1473-1481.

STEVENSON, F. (1994): *Humus chemistry*, 2nd edition. J Wiley and Sons, NY.

STORMER, K. (1908). *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg.*, 20 : 282-286.

SU Y.H. & ZHU Y.G. (2008) Uptake of selected PAHs from contaminated soils by rice seedlings (*Oryza sativa*) and influence of rhizosphere on PAH distribution. *Environmental Pollution*, 155, p. 359-365.

SUN F., LITTLEJOHN D., GIBSON M.D. (1998). Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. *Analytica Chimica Acta*, 364, 1-11

SUZAKI T., YORO E., KAWAGUCHI M. (2015). Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 316, 111–158.

SZEWCZAK A., ZIOMKIEWICZ I, JASIŃSKI M. (2011). Hiring cell gatekeepers – ABC transporters in plant biotechnology. *BioTechnologia* vol. 92(2) C pp. 132-139 C 2011

TAIZ L. & ZEIGER E. (2009). *Fisiologia Vegetal*. Editora Artmed 4^a edição.

TAKAHASHI, K., KOZUKA, T., ANEGAWA, A., NAGATANI, A., MIMURA, T.,(2015). Development and application of a high-resolution imaging mass spectrometer for the study of plant tissues. *Plant Cell Physiol*. 56 (7), 1329–1338.

TAMOI, M., HIRAMATSU, Y., NEDACHI, S., OTORI, K., TANABE, N., MARUTA, T., & SHIGEOKA, S. (2011). Increase in the activity of fructose-1,6-bisphosphatase in cytosol affects sugar partitioning and increases the lateral shoots in tobacco plants at elevated CO₂ levels. *Photosynthesis Research*, 108(1), 15–23.

TAN, H., LI, R., ZHU, Y., & ZHANG, Y. (2017). In situ quantitative and visual investigation of the retention of polycyclic aromatic hydrocarbons on the root surface of *Kandelia obovata* using a microscopic fluorescence spectral analysis method. *Talanta*, 167, 86–93.

TANAKA, K., IDO, Y., AKITA, S., YOSHIDA, Y., YOSHIDA, T (1987). “Detection of High Mass Molecules by Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry” *Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*, pp.185–188.

TENG Y., SHEN Y., LUO Y., SUN X., SUN M., FU D., LI Z., CHRISTIE P. (2011) Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1271–1276

TENG, Y., LUO, Y., PING, L., ZOU, D., LI, Z., CHRISTIE, P., (2010). Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil. *Biodegradation* 21, 167–178.

TERVAHAUTA A.I., FORTELIUS C., TOUMAINEN M., ÅKERMANN M-L., RANTALAINEN K., SIPILÄ T., LEHESRANTA S. J., KOISTINEN K.M., KÄRENLAMPI S., YRJÄLÄ K. (2009) Effect of birch (*Betula* spp.) and associated rhizoidal bacteria on

the degradation of soil polyaromatic hydrocarbons, PAH-induced changes in birch proteome and bacterial community. *Environmental Pollution*, 157, 341–346.

THELEN JJ, PECK SC (2007) Quantitative proteomics in plants: choices in abundance. *Plant Cell* 19:3339–3346

THELEN, J. J., & PECK, S. C. (2007). Quantitative proteomics in plants: choices in abundance. *The Plant cell*, 19(11), 3339–3346.

THOMPSON, C.; FERNANDES, C.; De SOUSA, O.; De FREITAS, L.; SALZANO, F. (2010). Evaluation of the impact of functional diversification on Poaceae, Brassicaceae, Fabaceae, and Pinaceae alcohol dehydrogenase enzymes. *Journal of molecular modeling* 16 (5), p. 919-928.

TORRES, J.P.M.; MALM, O.; VIEIRA, E.D.R.; JAPENGA, J. & KOOPMANS, G.F. (2002). Organic micropollutants on river sediments from Rio de Janeiro, Southeast Brazil, *Caderno de Saúde Pública*, 18 (2), p. 477-488.

TOUZET, P. DeVIENNE, D. HUET, J.C. & OUALI, C. (1996). Amino acid analysis of proteins separated by two-dimensional electrophoresis in maize: isoform detection and function identification. *Electrophoresis* 17, 1393-1401.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, (2014). Priority Pollutant List 40 CFR Part 423, Appendix A.

USEPA - UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, (2000). Introduction to Phytoremediation. Cincinnati- Ohio, (EPA/600/R-99/107).

VAMERALI T., BANDIERA M., MOSCA G. (2011). In situ phytoremediation of arsenic- and metalpolluted pyrite waste with field crops: effects of soil management. *Chemosphere* 83(9):1241-8.

VAN AARLE, I. M. & OLSSON, P. A. (2003) Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (11), 6762–6767

VAN DELFI J. H.; STEENWINKED M.S.; VAN ASTEN J.G., (2001). Biological Monitoring the Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of Coke Oven Workers in Relation to Smoking and Genetic Polymorphisms for GSTM1 and GSTT1, *Ann Occup Hyg* 45, 395-408.

VASCONCELLOS, P.C.; ZACARIAS, D.; PIRES, M.A.F.; POOL, C.S. & CARVALHO, L.R.F. (2003). Measurements of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particles from the metropolitan area of São Paulo City, Brazil. *Atmospheric Environment*, 37(21), p. 3009-3018.

- VELA, S., HÄGGBLUM, M. M., & YOUNG, L. Y. (2002). Biodegradation of aromatic and aliphatic compounds by rhizobial species. *Soil Science*, 167(12), 802–810.
- VERDIN, A.; LOUNES-HADJ-SAHRAOUI, A.; NEWSAM, R.; ROBINSON, G.; DURAND, R. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ. Pollut.* 133, 283–291
- VERKLEIJ, J. A. C.; GOLAN-GOLDHIRSHB, A.; ANTOSIEWISZC D. M. SCHWITZGUÉBEL, J-P. & SCHRÖDER, P. (2009). Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany* 67, p. 10-22.
- VINCENT, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Programme handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- VINCENT, J. M., P. S. NUTMAN, AND F. A. SKINNER. (1979). The identification and classification of *Rhizobium*. Identification methods for microbiology, 2nd ed. Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. 14:49-69.
- WANG M.C., CHEN Y.T., CHEN S.H., CHANG CHIEN S.W., SUNKARA S.V. (2012) Phytoremediation of pyrene contaminated soils amended with compost and planted with ryegrass and alfalfa. *Chemosphere*; 87(3):217-25.
- WANG, W.; TAI, F. & CHEN, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *J. Sep. Sci.* 31, p. 2032-2039.
- WANG, Z., LIU, Z., YANG, Y., LI, T., & LIU, M. (2012). Distribution of PAHs in tissues of wetland plants and the surrounding sediments in the Chongming wetland, Shanghai, China. *Chemosphere*, 89(3), 221–227.
- WEBBER A.N., NIE G.Y., LONG S.P. (1994). Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynthesis Research* 39: 413–425.
- WEI S.Q., PAN S.W. (2010). Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *J Soil Sediment* 10(5):886-894.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Map Production: Public Health Information and Geographic information Systems (GIS). Disponível em: < http://www.who.int/gho/phe/outdoor_air_pollution/en/ >. 2012. Acesso em: 06 de jan. 2014.
- WIKTOROWICZ JE, ENGLISH RD, WU Z et at. (2012) Model studies on iTRAQ modification of peptides: sequence-dependent reaction specificity. *J Proteome Res* 11:1512–1520

WILBERG, D. Q. (2006). A Espécie *Trifolium repens* L. como Bioindicadora de Estado de Biorremediação do Solo Contaminado com Óleo Diesel. Dissertação (Mestrado em Ciências). Curitiba.

WILCKE, W.; AMELUNG, W.; MARTIUS, C.; GARCIA, M.V.B. & ZECH, W. (2000). Biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Amazonia forest. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 163, p. 27-30.

WILD, E.; DENT, J.; BARBER, J. L.; THOMAS G. O. & JONES, K. C. 2004. A novel analytical approach for visualizing and tracking organic chemicals in plants. *Environmental Science and Technology* 38, 4195-4199.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; et al (1995). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13, p. 19-50.

WILSON, S. & JONES K. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) - A review. *Environ Pollut* 81 p. 229-249.

WONG, M. K. & WILLIAMS, J. P. B. (1980). A study of three extraction methods for hydrocarbons in marine sediment. *Marine Chemistry, Amsterdam*, v. 9, p. 183-192.

WRIGHT H, NICELL JA. (1999) Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Biores Technol.* 70:69–79

WRIGHT, M.S.; LAX, A.R.; HENDERSON, G. & CHEN, J. (2000). Growth response of *Metarhizium anisopliae* to two Formosan subterranean termite nest volatiles, naphthalene and fenchone. *Mycologia*, 92, p. 42-45.

XING B. & PIGNATELLO J.J. (1998). Competitive sorption between 1,3-dichlorobenzene or 2,4 dichlorophenol and natural aromatic acids in soil organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 32, 614–619.

XU S.Y., CHEN Y.X., WU W.X., ZHENG S.J., XUE S.G., YANG S.Y. and PENG Y.J. (2007). Protein Changes in Response to Pyrene Stress in Maize (*Zea mays* L.) Leaves. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (2): 187–195.

XU, J. G. & JOHNSON, R. L., (1995). Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediate and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant and Soil*, vol. 173, no. 11, p. 3-10.

YANG Z. (2002). Small GTPases. *The Plant Cell*. 14 (suppl 1) S375-S388; DOI: 10.1105/tpc.001065

- YE, B., SIDDIQI, M.A., MACCUBBIN, A.E., KUMAR, S., SIKKA, H.C., (1996). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* 30, 136–142.
- YE, H., GEMPERLINE, E., VENKATESHWARAN, M., CHEN, R., DELAUX, P.M., HOWES PODOLL, M., ANÉ, J.M., LI, L., (2013). MALDI mass spectrometry-assisted molecular imaging of metabolites during nitrogen fixation in the *Medicago truncatula* *Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant J.* 75 (1), 130–145.
- YI, H., & CROWLEY, D. E. (2007). Biostimulation of PAH Degradation with Plants Containing High Concentrations of Linoleic Acid. *Environmental Science & Technology*, 41(12), 4382–4388.
- YOUNG, N.D. *et al.*, (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* doi: 10.1038/nature10625.
- YUAN, S.Y., WEI, S.H., CHANG, B.V., (2000). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* 41, 1463–1468.
- ZAEFARIAN F., REZVANI M., ARDAKANI M.R., REJALI F., MIRANSARI M. (2013). Impact of Mycorrhizae Formation on the Phosphorus and Heavy-Metal Uptake of Alfalfa. *Commun Soil Sci Plan* 44(8):1340-1352.
- ZAGORCHEV, L., SEAL, C.E., KRANNER, I. & ODJAKOVA, M. (2013). A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 7405-7432
- ZHAN, X., MA, H., ZHOU, L., LIANG, J., JIANG, T., & XU, G. (2010). Accumulation of phenanthrene by roots of intact wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: passive or active uptake? *BMC Plant Biology*, 10(1), 52.
- ZHAN, X., YI, X., YUE, L., FAN, X., XU, G., & XING, B. (2015). Cytoplasmic pH-Stat during Phenanthrene Uptake by Wheat Roots: A Mechanistic Consideration. *Environmental Science & Technology*, 49(10), 6037–6044.
- ZHANG B, VERBERKMOES NC, LANGSTON MA *et al.*, (2006) Detecting differential and correlated protein expression in label-free shotgun proteomics. *J Proteome Res* 5:2909–2918
- ZHANG Y, WEN Z, WASHBURN MP *et al* (2009) Effect of dynamic exclusion duration on spectral count based quantitative proteomics. *Anal Chem* 81:6317–6326
- ZHANG Y.; FONSLow, B.R.; SHAN B.; BAEK, M-C & YATES J.R. III. (2013). Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* 113,p. 2343–2394.
- ZHONG, Y., ZOU, S., LIN, L., LUAN, T.G., QIU, R., TAM, N.F.Y., (2010). Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the

cometabolism process by *Sphingomonas* sp. strain PheB4 isolated from mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bullet.* 60, 2043–2049.

ZHOU, X.B.; CÉBRON, A.; BÉGUIRISTAIN, T. & LEYVAL, C. (2009). Water and phosphorus content affect PAH dissipation in spiked soil planted with mycorrhizal alfalfa and tall fescue. *Chemosphere* 77, p. 709-713.

ZRIBI K., NOUAIRI I., SLAMA I., TALBI-ZRIBI O., MHADHBI H. (2015) *Medicago sativa*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis promotes the bioaccumulation of zinc in nodulated roots. *Int J Phytoremediation* 17:49–55

APÊNDICE A

**LISTA DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM TECIDOS
AÉREOS DE *Medicago sativa* L. CULTIVADAS EM SOLOS CONTROLE E
CONTAMINADOS COM HPA.**

Tabela 8. Proteínas mais expressas em plantas cultivadas na ausência de HPA

Uniprot ID	Massa (kDa)	Peptídeos	Nº de Pep. únicos	Score	Anova (p)	Fold change	Proteínas	Organismo	Ontologia
B7FN10	15,153	2	1	12,6468	5.24E-14	Infinito	Photosystem I subunit O	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotosíntese
A0A072THL1	59,209	24	4	36,7497	9.58E-07	11,67	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
G7KZ01	69,221	5	1	43,5699	2.89E-08	11,59	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
A0A072VDU0	35,924	4	3	23,3765	1.63E-08	5,18	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
G7IS33	46,719	10	1	75,5818	0,000338769	4,77	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Folding, classificação e degradação / degradação de RNA
B7FJ08	27,862	1	1	6,2338	6.85E-08	4,57	ATP-binding ABC transporter	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transporte de Membranas / Transportadores ABC / Resistência a Medicamentos
G7K0Q7	29,461	7	1	104,863	2.38E-06	3,51	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotosíntese - proteínas de antena
G7LIA0	97,619	7	1	67,3207	1.11E-07	3,28	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo lipídico / Metabolismo do ácido linoléico
G7K0M1	45,124	3	1	21,7809	3.91E-10	3,12	Fasciclin-like arabinogalactan protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Biogênese da parede celular secundária de plantas / Adesão celular
A0A072UYL1	45,974	7	1	54,8888	2.40E-05	2,81	Mg-protoporphyrin IX chelatase (EC 6.6.1.1)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de co-fatores e vitaminas / Porfirina e Metabolismo da clorofila
A0A072TJV4	56,133	10	3	127,3049	1.83E-07	2,59	Photosystem II CP47 reaction center protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotosíntese
G7IP20	18,020	2	2	15,7176	9.46E-09	2,44	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Maquinaria de Transcrição / Sistema RNA Polimerase II/ Complexo Mediador
G7JAR7	51,626	10	1	66,5743	3.50E-07	2,42	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo energético / Metabolismo de aminoácidos
Q8VZX7	35,616	2	1	13,2439	1.31E-08	2,32	1-aminocyclopropanecarboxylic acid oxidase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
I3T9P7	29,143	16	1	97,7516	2.14E-10	2,26	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de informação ambiental / Resistência a medicamentos
A0A072TX81	53,692	5	3	41,3676	8.67E-06	2,24	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de glutatona
A0A072U942	34,220	2	2	11,6952	5.11E-10	2,09	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (EC 2.4.1.207)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Biogênese da parede celular / modificação da parede celular tipo planta envolvida no crescimento de células multicelulares / processo metabólico xiloglucano
G7KRX3	566,996	11	5	65,1574	3.50E-07	2,08	Auxin transporter BIG	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Crescimento de células unidimensionais / Transportadores / Outros transportadores / Transportadores impulsionados por potencial eletroquímico
B7FFD4	24,864	15	1	110,4383	5.10E-06	2,07	Glutamate 1-semialdehyde aminotransferase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de co-fatores e vitaminas / Porfirina e Metabolismo da clorofila
G7JWW6	41,197	6	5	40,3238	8.59E-08	2,06	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar de nucleotídeo
A0A072TQ67	35,854	14	1	123,492	0,00318602	2,04	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Metabolismo de Aminoácidos
G7IF65	72,821	4	1	34,988	1.45E-07	1,96	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
A0A072TRM1	25,651	1	1	5,1739	4.81E-05	1,94	Sucrose synthase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de amido e sacarose
A0A072VR00	62,922	6	5	35,4178	5.41E-09	1,93	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de glicina serina e treonina
A0A072UVX2	42,277	6	3	54,3871	0,000110336	1,93	ADP/ATP carrier protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético
G7K666	58,354	7	3	56,5739	8.30E-05	1,92	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
G7K3R6	15,524	3	1	23,9711	1.73E-08	1,82	12-oxophytodiene reductase-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Processo biossintético do ácido jasmônico
I3SR19	41,635	17	3	180,9333	0,0000014	1,80	Actin-97	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Proteínas do citoesqueleto / proteínas do citoesqueleto eucariótico

G7IGB4	70,211	8	1	58,0046	0,00000912	1,76	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
G7KQ66	70,452	1	1	5,1655	0,00000432	1,75	Evolutionarily carboxy-terminal region protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Biogênese de RNA mensageiro / Fatores de vigilância / Fatores de transporte de tipo / mRNA eucariótico / fatores do ciclo do mRNA
G7JHH4	57,277	4	3	30,8352	7,43E-08	1,70	Beta-glucosidase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de outros aminoácidos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
B7FL36	19,925	16	2	127,3009	0,0000119	1,70	Glutamate 1-semialdehyde aminotransferase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de co-fatores e vitaminas / Porphirina e Metabolismo da clorofila
B7FK01	37,139	17	9	216,3718	0,00000249	1,65	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Pentose fosfato
G7LIZ6	93,600	25	15	204,8632	3,28E-11	1,62	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo lipídico / Metabolismo do ácido linoléico
G7KFS7	44,052	7	3	60,7506	1,72E-08	1,62	E3 ubiquitin-protein ligase (EC 2.3.2.27)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Dobra, classificação e degradação / Proteólise mediada pela ubiquitina / Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / via de sinalização MAPK - fly / Processos celulares / Crescimento celular e morte / via de sinalização p53
G7KKR4	59,345	9	4	74,4979	9,86E-09	1,60	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
B7FLH4	41,787	13	8	108,995	1,05E-08	1,59	Uncharacterized protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Biossíntese de valina, leucina e isoleucina / Metabolismo de cofatores e vitaminas
G7JG44	23,091	2	1	11,9539	0,00000301	1,56	RAB GTPase-like protein A1D	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processos celulares / Transporte e catabolismo / Endocitose / Tráfego de membranas / Reciclagem de proteínas / Rab GTPases e proteínas associadas
Q45NI3	19,597	14	4	144,1679	0,000000945	1,55	Elongation factor 2 (Fragment)	<i>Medicago sativa L.</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização AMPK / Fatores de tradução / Tipo eucariótico / Fatores de alongamento / Exossoma / Proteínas exossômicas / Proteínas encontradas na maioria dos exossomos
G7IED1	43,377	9	6	72,3432	5,83E-11	1,53	Stem-loop-binding protein of 41 kDa protein A	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Regulação da Tradução / Regulação da Transcrição, Modelo-DNA / Organização do cloroplasto
Q84RD8	53,197	28	14	248,7373	4,02E-10	1,52	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
A0A072UW36	37,525	12	4	976,605	3,90E-06	1,51	PfkB family carbohydrate kinase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Nucleotídeo / Metabolismo de Purina
Q2HUD3	69,440	6	5	52,9068	2,08E-06	1,49	Heat shock cognate 70 kDa protein (Heat shock protein Hsp70)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
A0A072U4Q3	25,910	9	7	63,7517	1,31E-08	1,49	Type II peroxiredoxin	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processos celulares / Crescimento celular e morte / Apoptose
A0A072TXM6	63,562	12	4	96,8573	2,34E-08	1,48	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
I3SQJ7	29,934	8	6	57,0529	2,44E-06	1,46	Ribose-5-phosphate isomerase A	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo energético / Fotossíntese
A0A072U4T5	41,739	15	2	147,7146	6,94E-05	1,45	Actin-97	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Proteínas do citoesqueleto / proteínas do citoesqueleto eucariótico
G7JYH8	10,034	1	1	5,2425	8,86E-07	1,42	Uncharacterized protein (C4-dicarboxylate ABC transporter)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Transportadores / Outros Transportadores / Transportadores com potencial eletroquímico
I3S1B9	28,118	8	1	72,2525	0,00496979	1,41	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de amido e sacarose
G7LIV6	59,467	4	3	262651	1,44E-06	1,41	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit (Biotin carboxylase) (EC 6.3.4.14)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de piruvato / Metabolismo energético / Via de fixação de carbono em procariontes / Metabolismo de lipídeos / Biossíntese de ácidos graxos
A0A072UBA6	8,120	4	2	50,7846	1,72E-05	1,41	Photosystem II reaction center protein D	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
G7LBJ9	45,904	3	2	25,0525	6,67E-06	1,40	Cytoplasmic-like malate dehydrogenase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo do Piruvato / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Vias de fixação de carbono em procariontes / Metabolismo de metano / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
A2Q2V1	65,893	10	9	76,838	1,76E-07	1,40	ATP-citrate lyase/succinyl-CoA ligase (ATP:citrate lyase)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / ATP-citrate liase subunidade alfa / Metabolismo Energético / Rotas de fixação de carbono em procariontes / ATP-citrate liase subunidade alfa /
I3SYF8	28,805	8	5	117,927	2,60E-05	1,38	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
A0A072UI80	71,624	10	2	61,1572	3,65E-08	1,38	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
B7FIJ3	43,019	2	2	11,1076	0,000204294	1,38	Uroporphyrinogen decarboxylase (EC 4.1.1.37)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de cofatores e vitaminas / Metabolismo de porfirinas e clorofila
A0A072V6F3	26,347	2	1	15,7546	3,90E-05	1,38	NBS-LRR type disease resistance protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Sistemas Organismais / Adaptação ambiental / Interação planta-patógeno
G7JFK1	71,539	15	4	130,2327	1,61E-07	1,38	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático

A0A072UNB4	58,031	10	2	62,2032	2.13E-08	1,37	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
G7LIX7	98,092	16	5	129,7562	1.07E-05	1,37	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo lipídico / Metabolismo do ácido linoléico
Q43790	38,192	7	1	60,3891	3.95E-05	1,35	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	<i>Medicago sativa L.</i>	Defesa da planta / Regulação de respostas a estresses bióticos e abióticos
I3S1D8	26,783	2	1	11,0673	3.54E-05	1,35	Metal-dependent protein hydrolase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Sistema de dois componentes / Conjunto funcional / Processamento de informação ambiental / Resistência a medicamentos
I3S3S0	27,215	17	15	209,2736	6.35E-06	1,35	Cytosolic triosephosphate isomerase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo de frutose e manose / Metabolismo de fosfato inositol
B7FL14	26,181	6	6	54,6663	2.31E-07	1,35	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Chaperonas e catalisadores de enovelamento / Catalisadores de enovelamento de proteínas / Peptidil prolil isomerase / Ciclofilina
A0A072TD00	44,959	2	1	10,9521	0.000430712	1,34	Virulence factor, pectin lyase fold (Fragment)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Desconhecida
G7LIY0	97,719	32	12	280,3162	1.61E-07	1,34	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo lipídico / Metabolismo do ácido linoléico
A0A072TQR8	42,957	2	1	16,2482	0.000163646	1,34	Receptor-like kinase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização MAPK - planta / Sistemas Organismais / Adaptação ambiental / Interação planta-patógeno
G7JCS2	31,781	2	1	10,9316	2.20E-06	1,34	Phosphate-responsive 1 family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Resposta celular à carência de fosfato / Regulação da transcrição, modelo de DNA / Resposta celular a alta intensidade de luz / Regulação de respostas a estresses bióticos e abióticos
A0A072UHV5	26,494	1	1	5,1853	1.16E-05	1,34	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de Aminoácidos / Biossíntese de outros metabólitos secundários
A0A072V4V7	37,328	2	1	16,4254	0.019856061	1,33	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
G7L0I8	72,159	38	25	419,5284	8.28E-07	1,32	Cobalamin-independent methionine synthase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina/ Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de Selenocompostos
G7J648	90,694	26	12	217,2128	8.00E-06	1,32	Cobalamin-independent methionine synthase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina/ Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de Selenocompostos
I3SW83	39,501	6	3	43,9991	1.41E-05	1,32	ADP/ATP carrier protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético
I3SGG2	41,813	14	1	148,5284	0.000229265	1,32	Uncharacterized protein (Actin-7)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Proteínas do citoesqueleto / proteínas do citoesqueleto eucariótico
A0A072U5R4	28,283	6	1	74,7403	0.002011219	1,32	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
W8G2X4	43,090	5	1	34,6052	1.03E-06	1,31	GDP-mannose 3,5-epimerase	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Ascorbato e Aldarato / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar de nucleotídeo
G7ISA0	12,771	1	1	13,4248	8.32E-07	1,30	Uncharacterized protein (Ribonuclease H)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética /Reparo e replicação / Reparo e excisão de bases
G7ILM0	68,324	15	11	112,3524	1.91E-08	1,30	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
I3SZS6	23,014	3	3	18,8671	1.29E-07	1,30	Kunitz type trypsin inhibitor	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Resposta a defesa / Resposta a estímulos bióticos
G7JUC8	35,746	4	3	23,1338	1.56E-05	1,29	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
A0A072TXD2	62,877	21	1	237,7629	1.59E-07	1,29	F0F1-type ATP synthase, beta subunit	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa
A0A072ULI6	43,791	2	2	10,8487	7.52E-06	1,29	UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar de nucleotídeo
A0A072URD6	105,551	5	2	37,8225	0.000140295	1,29	Plasma membrane ATPase (EC 3.6.3.6)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa
A0A072V103	48,850	12	5	93,1264	0.000850539	1,29	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Ascorbato e Aldarato / Metabolismo do Piruvato / Metabolismo de lipídeos / Degradação de ácidos graxos / Metabolismo de Glicerolipídeos / Metabolismo de Aminoácidos / Degradação com valina, leucina e isoleucina / Degradação de Lisina / Metabolismo de arginina e prolina / Metabolismo de histidina / Metabolismo de triptofano / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de beta-alanina/ Metabolismo de terpenóides e polietilóides / Degradação de limoneno e pineno
I3SQF9	24,849	8	4	72,5491	2.02E-05	1,28	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
G7JDC4	43,959	2	2	16,4631	0,0000162	1,28	F-box protein interaction domain protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Sistemas Organismais / Adaptação ambiental / Ritmo circadiano - planta / sistema de ubiquitina / ligases de ubiquitina (E3) / Subunidade múltipla Tipo de dedo anelar complexo E3 / SCF / Subunidade de reconhecimento do alvo (F-box)
Q6J9X6	42,806	9	1	70,1048	0.002051019	1,28	S-adenosylmethionine synthase (EC 2.5.1.6) (Fragment)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
Q7XYH3	13,936	7	6	48,1536	1.74E-06	1,27	Nodule-enhanced malate dehydrogenase (EC 1.1.1.82) (Fragment)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Metabolismo de Aminoácidos

G7I6K4	56,127	3	2	25,2207	3.80E-06	1,27	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
Q9TKI6	15,220	2	1	20,8464	0,013162273	1,27	ATP synthase epsilon chain, chloroplastic (ATP synthase F1 sector epsilon subunit) (F-ATPase epsilon subunit)	<i>Medicago sativa</i> L.	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese oxidativa / Adaptação ambiental
Q45R31	21,999	2	1	11,4511	1.04E-07	1,26	Putative carbon-nitrogen hydrolase family protein (Fragment)	<i>Medicago sativa</i> L.	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de arginina e prolina
I3T1N5	46,558	12	6	99,5285	0.008318651	1,26	Xyloglucanase-specific endoglucanase inhibitor protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Resposta a defesa / Resposta a estímulos bióticos
AOA161JQR4	38,758	9	3	74,4326	4.12E-08	1,26	Hexenal isomerase	<i>Medicago sativa</i> L.	Desconhecida
AOA072UMJ5	50,527	2	1	19,6278	0.000730347	1,25	Cyanogenic beta-glucosidase, putative	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de amido e sacarose / Metabolismo de outros aminoácidos / Cianamino acid / Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
G7L9H3	39,759	4	3	32,8077	1.60E-06	1,25	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA)
AOA072TPE4	57,692	7	1	72,0992	0.002602511	1,25	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Proteassoma / Proteassoma Eucariota / Partículas Reguladoras / Proteínas Interagentes do Proteassoma (PIPs) / Outros PIPs
G7I369	58,240	5	3	31,8517	1.09E-05	1,24	Aspartyl aminopeptidase-like protein, putative	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Tráfico de membrana / Autofagia / Citoplasma para via de vacuolar targeting (CVT)
G7K0Q5	10,265	11	3	164,7606	0.000463091	1,24	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
Q9XG65	92,336	14	9	112,3901	8.86E-08	1,24	Sucrose synthase (EC 2.4.1.13)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de amido e sacarose
G7J7V1	94,267	2	2	16,0725	0.009896377	1,24	Auxin response factor	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Crescimento de células unidimensionais / Transportadores / Outros transportadores / Transportadores impulsionados por potencial eletroquímico
I3SIM4	65,380	21	13	168,3352	3.12E-05	1,24	Malic enzyme	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo do Piruvato / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Vias de fixação de carbono em procariontes / Metabolismo de metano / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
Q45NP0	27,863	5	5	41,6584	0.000149023	1,23	Methylesterase (Fragment)	<i>Medicago sativa</i> L.	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Sistema de dois componentes
G7KZZ4	68,841	13	6	101,8117	8.34E-07	1,23	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
Q56GA31	x	2	2	2,3651	2.01E-05	1,23	Geranylgeranyl reductase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de co-fatores e vitaminas / Porfirina e Metabolismo da clorofila / Metabolismo de terpenóides e policetídeos / Biossíntese do "esqueleto" terpenóide
G7KZ93	47,849	15	11	111,2431	8.42E-08	1,23	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Metabolismo de metano / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de glicina serina e treonina
AOA072TLG9	358,628	4	1	21,6719	6.64E-05	1,23	Multifunctional fusion protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_0002s0510 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Nucleotídeo / Metabolismo de Purina / Pirimidine Metabolismo / Processamento de Informação Genética / Transcrição / RNA polimerase
W8CWH2	31,351	13	2	144,8831	1.88E-05	1,23	Cytochrome f OS=Medicago sativa subsp. falcata GN=petA PE=3 SV=1	<i>M. truncatula</i> f. <i>tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
I3SUZ5	16,937	10	7	90,0137	2.13E-08	1,22	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic (Fragment)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de glutatona/ Processos celulares / Transporte e catabolismo/ Peroxisomo
O22339	31,079	4	3	36,3649	0.02768713	1,22	Major intrinsic protein (MIP) family transporter	<i>Medicago sativa</i> L.	Transportadores / Outros Transportadores / Aquaporinas e pequenos transportadores de solutos neutros / Aquaporinas
Q8LK12	11,745	11	8	113,4035	2.32E-06	1,22	Glyoxysomal malate dehydrogenase	<i>Medicago sativa</i> L.	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo do Piruvato / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo de Aminoácidos
AOA072U2W1	33,437	21	16	170,835	1.09E-06	1,22	Uncharacterized protein (triosephosphate isomerase, chloroplastic)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo de frutose e manose / Metabolismo de fosfato inositol / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos
O816923	x	24	23	55,7381	5.17E-08	1,22	Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Processos celulares / Transporte e catabolismo/ Peroxisomo
G7JI05	57,534	2	2	16,0693	8.87E-05	1,22	Glucose-1-phosphate adenyltransferase (EC 2.7.7.27) (ADP-glucose pyrophosphorylase)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de amido e sacarose / Metabolismo de aminoácido e açúcar de nucleotídeo / Processos celulares / Comunidade celular - procariontes / Formação de biofilme - Escherichia coli / glucose-1-fosfato adeniltransferase
I3SMS0	26,320	6	4	65,2104	4.51E-06	1,22	GTP-binding nuclear protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Biogênese do ribossomo em eucariotos / Biogênese do ribossomo / Tipo eucariótico / Partículas pré-60S / GTPases
Q84RD9	53,332	22	7	212,021	2.62E-06	1,22	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
I3TA36	10,842	8	6	99,3532	4.99E-07	1,22	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Chaperonas e catalisadores de enovelamento / Catalisadores de enovelamento de proteínas / Peptidil proil isomerase / Ciclofilina
Q2HRI1	21,928	1	5	71,1406	1.23E-06	1,22	UDP-sulfoquinovose synthase, chloroplast, putative (Fragment)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoácido e açúcar de nucleotídeo / Metabolismo de lipídeos / Metabolismo de Glicerolipídeos
G7KKH1	28,284	9	4	106,9069	1.54E-07	1,21	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena

A0A072U3V6	61,051	2	2	11,424	0.001853258	1,21	Pectinesterase (EC 3.1.1.11)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Interconversões de pentose e glucuronato
G7ZV14	35,004	21	10	263,5076	8.02E-06	1,21	Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
A0A072V4A8	48,251	3	2	20,6397	2.38E-05	1,21	Ubiquitin-protein ligase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Dobra, classificação e degradação / Proteólise mediada pela ubiquitina / Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização MAPK - fly / Processos celulares / Crescimento celular e morte / via de sinalização p53
G7KIR1	28,185	17	15	211,8295	8.62E-07	1,21	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de nitrogênio
Q9LKI6	35,471	9	1	58,7732	2.78E-05	1,20	Isoflavone reductase-like protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de isoflavonóides
G7IF69	34,738	8	4	57,0148	4.00E-05	1,20	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
B8Y7S8	347,612	13	1	91,6842	0.033282586	1,20	Polyprotein	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Proteínas virais / vírus ssRNA
I3S7W6	17,071	5	4	38,1789	3.99E-05	1,20	Glutamate decarboxylase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de butanoato / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de Alanina, aspartato e glutamato / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de beta-alanina/ Processos celulares / Comunidade celular - procariontes/ Quorum sensing
Q706C9	49,787	7	5	41,0574	0.000540118	1,20	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Exossomos / Proteínas exossômicas / proteínas encontradas na maioria dos exossomos
I3T0B0	37,110	4	2	34,4771	0.003643502	1,20	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic-like protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de metano
A0A072U4Q0	55,212	2	2	11,3891	1.60E-05	1,19	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo do Piruvato / Metabolismo de Nucleotídeo / Metabolismo de Purina
I3SHJ8	21,598	4	4	30,7107	0.000116685	1,19	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de cofatores e vitaminas / Ubiquinona e outras biossíntese terpenóide-quinona
G7L571	52,963	4	4	21,934	0.000118574	1,19	UDP-glucose 6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Interconversões de pentose e glucuronato / Metabolismo Ascorbato e Aldarato / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar de nucleotídeo
A0A072UMP0	29,701	4	4	37,0654	0.001870153	1,19	Pollen Ole e I family allergen	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Interconversões de pentose e glucuronato
G7K0U1	26,694	7	3	64,2571	0.000235493	1,18	Ribulose biphosphate carboxylase large chain domain protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo energético / Fotossíntese
A0A072UKT9	29,785	12	11	166,8367	1.46E-05	1,18	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
I3SYN9	20,279	23	17	257,8449	1.62E-06	1,18	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Processamento de Informação Genética / Dobra, classificação e degradação / Degradação de RNA
G7L9H1	47,208	5	3	30,0829	2.44E-06	1,17	Phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de glicina serina e treonina / Metabolismo de cofatores e vitaminas / Vitamin B6 Metabolismo
B7FLW4	53,863	5	5	35,0523	6.53E-06	1,17	9/13 hydroperoxide lyase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Metabolismo de ácido alfa-linoléico
G7KWQ5	90,064	5	4	33,158	1.41E-05	1,17	Phosphoenolpyruvate phosphomutase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo fosfonato e fosfinato
A0A072UW19	89,572	2	2	10,9798	0.017844508	1,17	LRR receptor-like kinase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização MAPK - planta / Sistemas Organismais / Adaptação ambiental / Interação planta-patógeno
G7J8D4	39,037	3	2	16,4688	0.000117549	1,17	Carbon-nitrogen family hydrolase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de Alanina, aspartato e glutamato
A0A072V3V7	78,877	9	3	49,0738	7.63E-07	1,17	Glycyl-tRNA synthetase/glycine-tRNA ligase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / biossíntese de aminoacil-tRNA
I3S4K3	19,801	4	4	27,9038	2.47E-05	1,17	SOUL heme-binding family protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Biogênese mitocondrial / Máquinas de importação de proteína mitocondrial / Membrana interna
W8CY76	55,996	19	10	278,2194	2.71E-05	1,16	Photosystem II CP47 reaction center protein (PSII 47 kDa protein) (Protein CP-47)	<i>M. truncatula f. tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
A0A072UOP7	28,475	2	2	11,4418	0.024483332	1,16	NAD(P)-binding rossmann-fold protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Sistema de ubiquitina / enzimas ativadoras de ubiquitina (E1) / enzimas ativadoras de UBL
A0A072U546	53,400	3	2	16,2747	0.001029841	1,16	Peptide chain release factor 2	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Fatores de tradução / Tipo Procaríóticas / fatores de lançamento
I3SXG8	15,486	4	4	39,7221	3.60E-05	1,16	Photosystem I reaction center subunit IV A	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
I3SF50	28,192	12	11	116,6413	8.25E-05	1,16	LL-diaminopimelate aminotransferase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Biossíntese de lisina
G7KQE8	34,085	4	2	22,7269	0.00515705	1,16	PfkB family carbohydrate kinase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de frutose e manose / Metabolismo de amido e sacarose / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar de nucleotídeo

A0A072VNE4	26,664	6	6	69,4551	6.75E-07	1,15	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Chaperonas e catalisadores de enovelamento / Catalisadores de enovelamento de proteínas / Peptidyl prolyl isomerase / Ciclofilina
I3SYR8	17,784	2	2	16,4963	0.001762336	1,15	Adenine nucleotide alpha hydrolase superfamily protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Transportadores / Outros Transportadores / Proteína Universal para Estresse
G7J5Y4	47,939	17	13	184,7005	4.20E-05	1,15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Pentose fosfato
A4PU48	43,279	12	4	106,7162	0.000807701	1,15	S-adenosylmethionine synthase (AdoMet synthase) (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase) (MAT)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
G7IRR3	82,243	4	4	33,428	2.36E-05	1,15	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de terpenóides e polictéides / Biossíntese do "esqueleto" terpenóide
I3TAS1	53,791	15	12	111,4022	0.000324225	1,15	Cytosolic glutathione reductase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de glutatona
G7LIP6	32,200	5	4	43,0274	4.71E-05	1,14	Dicarboxylate carrier protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Sistemas Organismais / Sistema excretor / Recuperação de bicarbonato de túbulo proximal / Transportadores / Família transportadora de soluto (SLC) / Portador mitocondrial
G7IAW2	60,060	24	3	281,5937	0.136900934	1,14	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Adaptação ambiental
G7L9S9	63,235	13	12	99,3133	0.000277767	1,14	Cytoplasmic phosphoglucomutase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Pentose fosfato / Metabolismo de Galactose / Metabolismo de amido e sacarose / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar de nucleotídeo / Metabolismo de Nucleotídeo / Metabolismo de Purina
A0A072V9L6	96,499	24	7	233,1294	7.90E-05	1,14	Cytoplasmic-like aconitate hydratase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Rotas de fixação de carbono em procariontes
G7INT9	27,676	10	9	97,5856	0.002943403	1,13	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
I3T0S8	16,222	1	1	5,2717	0.045542611	1,13	Uncharacterized protein (GRF zinc finger protein)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Spliceossomo / Complexo B / Outros componentes / Fatores específicos do complexo B
A0A072VD34	63,785	9	5	63,2637	0.114206978	1,13	Malic enzyme	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo do Piruvato / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Vias de fixação de carbono em procariontes / Metabolismo de metano / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
I3SJ62	17,971	5	1	50,8751	0.028215468	1,13	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transporter	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Resposta a defesa / Resposta a estímulos bióticos
A0A072V6C9	11,033	2	1	11,4658	0.00332602	1,12	Basic blue-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Desconhecida
A0A072USM8	72,231	11	4	61,2278	0.009308945	1,12	Glycyl-tRNA synthetase/glycine-tRNA ligase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / biossíntese de aminoacil-tRNA
I3S6I8	28,824	6	5	55,9648	0.004926147	1,12	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
I3SGS4	21,691	3	3	49,115	0.001795827	1,12	Auxin-binding protein ABP19a	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Crescimento de células unidimensionais / Transportadores / Outros transportadores / Transportadores impulsionados por potencial eletroquímico
G7LIY2	98,256	22	8	169,125	4.32E-06	1,12	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo lipídico / Metabolismo do ácido linoléico
A0A072U402	59,097	15	2	100,0031	0.003814159	1,11	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo do Piruvato / Metabolismo de Nucleotídeo / Metabolismo de Purina
G7KNB8	46,274	9	5	78,8766	0.007860037	1,11	Phosphopyruvate hydratase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Processamento de Informação Genética / Dobra, classificação e degradação / Degradação de RNA
B7FLK2	26,289	17	11	147,8825	0.000181582	1,11	Heat shock cognate 70 kDa-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
G7K4T4	38,369	7	4	52,7442	0.027399526	1,11	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de metano
I3T4P3	14,129	4	4	35,5971	3.32E-05	1,11	Profilin	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização Rap1 / Via de sinalização MAPK / Processos celulares / Motilidade celular / Regulação do citoesqueleto de actina / Tráfego de membrana / Proteínas de ligação a actina / Proteínas do citoesqueleto / proteínas do citoesqueleto eucariótico / Filamentos de actina / Microfilamentos / proteínas ligantes de actina / Profilina/ Exossomos / Proteínas exossômicas / proteínas encontradas na maioria dos exossomos
G7JJ87	33,947	1	1	11,1524	0.000428318	1,11	Lactoylglutathione lyase-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo do Piruvato
W8CYA5	38,962	5	4	81,8855	0.000389426	1,11	Photosystem II protein D1 (PSII D1 protein) (EC 1.10.3.9) (Photosystem II Q(B) protein)	<i>M. truncatula</i> f. <i>tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
I3T2W2	13,476	1	1	5,4064	0.000107538	1,10	Uncharacterized protein (40S ribosomal protein S4-3)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Ribossomo
G7IQ32	27,852	6	1	34,9028	0.005355796	1,10	Phosphoglycolate phosphatase-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato
I3SCP1	22,832	16	10	112,8768	1.69E-05	1,10	Lipoxygenase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo lipídico / Metabolismo do ácido linoléico

A0A072URM9	68,707	11	8	70,0482	0.000648641	1,10	Archaeal/vacuolar-type H+-ATPase subunit A	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Processos celulares / Transporte e catabolismo/ Fagossomo
I3SSW8	20,606	4	2	52,6687	3.80E-05	1,10	Plastocyanin-like domain protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese / Proteínas da fotossíntese / Sistema de fotossistema e transporte de elétrons / Transporte de elétrons fotossintéticos
G7K4B9	81,378	6	3	46,1091	0.012198508	1,10	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Metabolismo de glicerofosfolipídeos
A0A072VL83	26,096	2	2	10,2431	0.008527401	1,10	Thylakoid lumenal 15.0 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
G7JNN6	38,985	5	2	31,2644	0.001574191	1,10	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de Enxofre/ Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de cisteína e metionina
I3SKB1	43,985	13	11	153,1191	6.03E-05	1,10	Serine-glyoxylate aminotransferase-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos /Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de Alanina, aspartato e glutamato / Metabolismo de glicina serina e treonina / Processos celulares / Transporte e catabolismo/ Peroxissomo
G7JQB0	26,822	4	1	34,2157	0.001194406	1,10	Cytochrome B(Amino-terminal)/b6/petB protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese / Proteínas da fotossíntese / Sistema de fotossistema e transporte de elétrons
G7LC11	52,789	4	2	32,5826	0.11451795	1,09	Elongation factor 1-alpha	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Translação / Transporte de RNA / Biogênese de RNA mensageiro / Vigilância de tipo / mRNA e fatores de transporte / Fatores envolvidos na localização de mRNA / Proteínas de ligação trans-acting / Biogênese de RNA de transferência / Fatores de transporte tARR / Fatores de tradução / Tipo de eucariótico Fatores de alongamento / Tráfico de membrana / Autofagia / Autofagia mediada por Chaperone (CMA) / Outras proteínas associadas a CMA / Exossomos / Proteínas exossômicas / proteínas encontradas na maioria dos exossomos
A0A072UYT5	46,590	25	1	345,9268	0.528234425	1,09	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo energético / Fotossíntese
W8CYB7	9,401	1	1	17,2724	0.016061767	1,09	Cytochrome b559 subunit alpha (PSII reaction center subunit V)	<i>M. truncatula f. tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
A2Q4U4	25,607	2	2	18,7552	0.002114615	1,09	Rhodanese-like (Rhodanese/cell cycle control phosphatase superfamily protein)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de Enxofre
I3S628	14,472	15	2	204,6045	3.78E-05	1,09	Elongation factor 1-alpha	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Translação / Transporte de RNA / Biogênese de RNA mensageiro / Vigilância de tipo / mRNA e fatores de transporte / Fatores envolvidos na localização de mRNA / Proteínas de ligação trans-acting / Biogênese de RNA de transferência / Fatores de transporte tARR / Fatores de tradução / Tipo de eucariótico Fatores de alongamento / Tráfico de membrana / Autofagia / Autofagia mediada por Chaperone (CMA) / Outras proteínas associadas a CMA / Exossomos / Proteínas exossômicas / proteínas encontradas na maioria dos exossomos
I3S1P8	29,977	7	5	57,0929	0.005062464	1,09	Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biogênese mitocondrial / Máquinas de importação de proteínas mitocondriais / Membrana externa / Porin / Transportadores / Outros transportadores / Canais iônicos de poros / Canais de íons / Canais de cloro / Canal de cloro Maxi
A0A072ULB0	41,965	8	3	93,5616	0.053846015	1,09	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de metano
G7JEL2	9,346	2	2	15,3781	0.002569619	1,09	Zinc finger, LRP1 type protein, putative	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Transdução de sinal de hormônio vegetal / Processo biossintético da auxina / Via de sinalização ativada por auxina / Via de sinalização mediada por ácido giberélico / Regulação negativa da via de sinalização mediada por ácido giberélico / Resposta à giberelina
G7IK85	46,055	8	2	67,3243	0.009494892	1,09	Mg-protoporphyrin IX chelatase (EC 6.6.1.1)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de co-fatores e vitaminas / Porfírina e Metabolismo da clorofila
G7KD12	29,207	8	6	83,1876	0.0003298	1,09	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese / Proteínas da fotossíntese / Sistema de fotossistema e transporte de elétrons / Fotossistema II (P680 clorofila a)
A0A072VCS7	48,742	5	3	26,3658	0.000222497	1,09	Tyrosine kinase family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal
O04999	39,199	9	7	82,025	0.001691492	1,09	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos /Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Metabolismo de nitrogênio/ Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de Alanina, aspartato e glutamato / Biossíntese de Arginina / Processos celulares / Crescimento celular e morte / Necroptosis
A0A072VCE6	63,327	4	1	37,739	0.005779892	1,08	Ketol-acid reductoisomerase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Biossíntese de valina, leucina e isoleucina / Metabolismo de cofatores e vitaminas
A0A072VQ58	42,667	7	3	53,1995	9.53E-05	1,08	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de metano
G7L011	69,900	15	3	104,8784	0.006814547	1,08	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
I3SN93	53,995	10	4	86,437	0.001487604	1,08	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo do Piruvato / Metabolismo de Nucleotídeo / Metabolismo de Purina
I3TOE1	18,895	5	4	39,2526	0.002193852	1,08	Translationally-controlled tumor-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Crescimento celular e morte
B7FH55	18,566	4	2	38,4315	0.056416863	1,08	Photosystem I reaction center subunit III	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
O04998	39,179	8	1	62,6671	0.429051031	1,08	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos /Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Metabolismo de nitrogênio/ Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de Alanina, aspartato e glutamato / Biossíntese de Arginina / Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Sistema de dois componentes

G7IMZ3	16,607	7	1	112,7648	0.030301165	1,08	ABA-responsive protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Plant hormone Transdução de sinal
A0A072UCS0	86,764	25	12	216,2153	0.001363711	1,08	Aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2.1.3)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo Energético / Rotas de fixação de carbono em procariontes
W8CY82	51,948	19	7	249,8935	0.002295297	1,07	Photosystem II CP43 reaction center protein (PSII 43 kDa protein) (Protein CP-43)	<i>M. truncatula</i> f. <i>tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotosíntese
G7JW03	20,510	1	1	6,0527	0.040873597	1,07	Adenine phosphoribosyltransferase-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Nucleotídeo / Metabolismo de Purina
G7IF28	79,738	33	28	354,2847	4.51E-05	1,07	Plastid transketolase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / via de fosfato de pentose / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de terpenóides e policetídeos / Biossíntese de ansamicinas
A0A072UF74	43,537	1	1	5,238	0.007922665	1,07	Chaperone DnaJ domain protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Chaperones e catalisadores dobráveis / Proteínas de choque térmico HSP40 / DNAJ / Chaperone Molecular DnaJ
Q93XK5	35,409	15	13	112,6286	6.23E-05	1,07	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	<i>Medicago sativa</i> L.	Processos celulares / Crescimento celular e morte / Apoptose - fly
I3SKJ9	38,909	5	1	37,3924	0.046403789	1,07	Glutelin type-B-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Desconhecida
G7I8A4	53,309	10	1	69,1026	0.071893773	1,07	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Pentose fosfato
B7ZWQ5	34,900	17	2	164,6439	0.002021817	1,07	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Ascorbato e Aldarato
B7FHI9	18,096	20	9	214,5288	0.029850531	1,06	Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotosíntese
I3S8I8	35,742	17	1	175,3533	0.057077336	1,06	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Tipo eucariótico / vigilância de mRNA e fatores de transporte / fatores do ciclo de mRNA / Fatores específicos de grânulos de estresse / Proteínas exossômicas / exossômicas
A0A072VP26	50,913	9	6	65,2956	6.46E-05	1,06	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Biossíntese de outros metabólitos secundários
Q1KK73	38,749	2	2	17,3942	0.075676255	1,06	Cysteine protease (EC 3.4.22.2)	<i>Medicago sativa</i> L.	Sistemas Organismais / Adaptação ambiental / Interação planta-patógeno
B7FJN7	22,602	4	3	42,1108	0.001812361	1,06	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de glicina serina e treonina / Metabolismo de cisteína e metionina
G7IH13	94,142	39	5	393,505	0.000129987	1,06	Translation elongation factor EF-2 subunit	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Biossíntese de proteínas / Biogênese de RNA de transferência / Tipo eucariótico / Aminoacyl-tRNA synthetases (AARSs) / Complexo multi-aminoacil-tRNA sintetase (MSC)
Q6S4R7	20,667	9	6	79,4731	0.021542984	1,06	ADP-ribosylation factor	<i>Medicago sativa</i> L.	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização da fosfolipase D / Processos celulares / Tráfico de Membranas / Proteínas de ligação a GTP
B7FH03	30,813	8	7	93,7711	0.000679356	1,06	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotosíntese - proteínas de antena
G7KFBV2	52,816	18	17	164,253	0.010043645	1,06	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Interconversões de pentose e glucuronato / Metabolismo de Galactose / Metabolismo de amido e sacarose / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar de nucleotídeo
I3S043	31,591	5	3	34,6473	0.009976099	1,06	Cytoplasmic C-1-tetrahydrofolate synthase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de cofatores e vitaminas / Metabolismo de Galactose
I3SMG5	26,556	4	3	31,2784	0.024760228	1,06	Fasciclin-like arabinogalactan protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Biogênese da parede celular secundária de plantas / Adesão celular
Q6J6X8	26,792	53	45	393,0784	0.000765383	1,06	Ferredoxin-dependent glutamate synthase (Fragment)	<i>Medicago sativa</i> L.	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotosíntese
G7L003	68,334	5	3	37,871	0.046898092	1,05	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
G7KHI5	54,523	8	4	56,0441	0.136356232	1,05	Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de glutatona/ Processos celulares / Transporte e catabolismo/ Peroxissomo
A0A072V688	68,874	3	1	17,0041	0.069612783	1,05	Exocyst subunit Exo70 family protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Tráfico de Membranas / Exocitose / Complexo Tethering / Complexo de Exocisto / Cromossomo e proteínas associadas / Tipo eucariótico / Formação de centrosomos e proteínas de citogênese / Outras proteínas associadas ao centríolo
Q40314	40,701	7	1	72,255	0.288573269	1,05	Acidic glucanase	<i>Medicago sativa</i> L.	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / resposta ao frio/ Defesa da planta
Q9FY14	25,393	1	1	17,7746	0.101101833	1,05	Probable aquaporin TIP-type (MIAQP1)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Transportadores / Outros Transportadores / Aquaporinas e pequenos transportadores de solutos neutros
A0A072V6X8	14,799	2	1	10,5773	0.242982281	1,05	Uncharacterized protein (Translation initiation factor IF-2)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Fatores de tradução / Tipo eucariótico / Fatores de iniciação / MTIFs / Biogênese mitocondrial / Fatores de transcrição, tradução e replicação de DNA mitocondrial / Fatores de transcrição e tradução mitocondrial / Fatores de tradução mitocondriais
A0A072U6L4	77,086	9	6	50,1777	0.089351607	1,05	Glycyl-tRNA synthetase/glycine-tRNA ligase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / biossíntese de aminoacil-tRNA
I3SRA0	48,579	5	5	35,0734	0.25020391	1,05	Uncharacterized protein (transaldolase / glucose-6-phosphate isomerase)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Pentose fosfato / Metabolismo de amido e sacarose / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar de nucleotídeo

W8CYA0	55,748	20	1	256,4369	0.459564834	1,05	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector subunit alpha) (F-ATPase subunit alpha)	<i>M. truncatula f. tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Adaptação ambiental
W0G592	19,152	1	1	7,4311	0.054968333	1,04	Temperature induced lipocalin	<i>Medicago sativa</i> subsp. <i>falcata</i> (<i>Sickle medic</i>) (<i>Medicago falcata</i>)	Resposta a estresse abiótico
B7FL95	17,547	4	3	23,9985	0.132362077	1,04	Monocopper oxidase SKS1-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de alcalóides de isoquinolinas / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de tirosina
S4TOY5	39,535	8	1	119,3408	0.023942059	1,04	Photosystem II D2 protein (PSII D2 protein) (EC 1.10.3.9) (Photosystem Q(A) protein)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
A0A072V815	33,678	29	8	295,5756	0.021615529	1,04	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
A0A072U4K6	20,674	1	1	5,3116	0.316664361	1,04	Ulp1 protease family, carboxy-terminal domain protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Dobra, classificação e degradação / Proteólise mediada pela ubiquitina
G7L6U5	21,594	4	2	43,7966	0.143559428	1,04	Auxin-binding protein ABP19a	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Crescimento de células unidimensionais / Transportadores / Outros transportadores / Transportadores impulsionados por potencial eletroquímico
I3SXG3	36,180	9	5	58,0973	0.001240322	1,04	Monodehydroascorbate reductase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos
A0A072VQ46	59,999	1	1	5,2652	0.519557095	1,04	Prolyl oligopeptidase-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biogênese mitocondrial / Máquinas de importação de proteína mitocondrial / Matriz
G7IQT1	44,660	3	2	25,1125	0.146094598	1,04	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Pentose fosfato
A0A077SN15	347,514	9	2	65,032	0.228477342	1,04	Polyprotein	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Proteínas virais / vírus ssRNA
A0A072U7P3	70,474	12	7	87,2309	0.018806079	1,04	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
A0A072VT43	94,187	42	8	449,7882	0.040115342	1,04	Translation elongation factor EF-2 subunit	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biossíntese de proteínas / Biogênese de RNA de transferência / Tipo eucariótico / Aminoacyl-tRNA synthetases (AARSs) / Complexo multi-aminoacyl-tRNA sintetase (MSC)
G7KTL4	52,981	2	1	22,5128	0.280952418	1,03	Adenylosuccinate synthetase, chloroplastic (AMPSase) (AdSS) (EC 6.3.4.4) (IMP--aspartate ligase)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Nucleotídeo / Metabolismo de Purina / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de Alanina, aspartato e glutamato
I3T336	14,394	7	5	47,5619	0.101001599	1,03	Lactoylglutathione lyase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo do Piruvato
G7JAP0	41,882	16	15	191,1958	0.08568067	1,03	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos
I3SIG9	28,296	12	5	164,5314	0.382089495	1,03	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
A0A072V376	75,678	15	1	92,9717	0.495420755	1,03	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Resistência a medicamentos
Q84UC1	47,071	18	13	238,8545	0.027304304	1,03	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Metabolismo de nitrogênio/ Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de Alanina, aspartato e glutamato / Biossíntese de Arginina
G7KWR9	69,069	15	9	93,1733	0.16782561	1,03	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
I3SM78	42,193	22	17	218,2642	0.034731552	1,03	D-glycerate dehydrogenase/hydroxypyruvate reductase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo de Aminoácidos / Metabolismo de glicina serina e treonina
A0A072VQ81	50,179	3	2	16,9021	0.271852695	1,03	3-oxoacyl-(Acyl carrier) synthase II	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Biossíntese de ácidos graxos / Metabolismo de cofatores e vitaminas / Metabolismo de Biotina
G7IT85	50,046	21	17	300,7391	0.00502248	1,03	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos
G7K6J9	28,627	6	6	47,0603	0.306486457	1,03	Rubredoxin family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Degradação de ácidos graxos
A0A072TKG8	53,074	12	1	172,8685	0.65433996	1,03	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain domain protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo energético / Fotossíntese
G7IS30	97,386	3	1	26,7623	0.080922836	1,03	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo lipídico / Metabolismo do ácido linoléico
G7JBK3	61,261	3	3	16,2164	0.286220437	1,03	DNA repair metallo-beta-lactamase family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Proteínas de reparação e recombinação de DNA / Tipo Eucariótico / Outros factores com uma função de reparação de DNA suspeita / Nucleases
I3SVD7	42,087	20	17	227,3071	0.138084177	1,03	Stem-loop-binding protein of 41 kDa protein B	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Regulação da Tradução / Regulação da Transcrição, Modelo-DNA / Organização do cloroplasto
G7JEN6	63,071	11	7	75,8411	0.141946126	1,03	Plastid transketolase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / via de fosfato de pentose / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de terpenóides e poliketóides / Biossíntese de ansamicinas
G7KEA9	132,233	10	8	71,3574	0.375973137	1,02	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Dobra, classificação e degradação / Proteólise mediada pela ubiquitina

P04991	52,626	23	1	316,1017	0.782369392	1,02	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit) (EC 4.1.1.39)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo energético / Fotossíntese
G7JUD3	104,938	17	10	108,0916	0.087578322	1,02	Plasma membrane ATPase (EC 3.6.3.6)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa
B7FIZ5	31,520	11	10	116,6752	0.061687245	1,02	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
I3SLN4	40,342	18	14	216,6669	0.00246981	1,02	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic (FNR) (EC 1.18.1.2)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
I3SP42	41,615	12	8	88,8385	0.029451947	1,02	Cytosol aminopeptidase family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de glutatona
G7LA34	43,359	2	2	10,4107	0.604095407	1,02	Serine/Threonine-kinase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização MAPK - planta
A0A072U8L3	24,087	4	2	52,6634	0.711774198	1,02	Photosystem II D2 protein, putative	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
I4IY28	18,050	27	6	335,4854	0.563426869	1,02	ATP synthase beta subunit (Fragment)	<i>Rhizobium meliloti (Ensifer meliloti) (Sinorhizobium meliloti)</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Adaptação ambiental
G7L8T2	41,964	3	2	16,5256	0.434233225	1,02	Pectinesterase (EC 3.1.1.11)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Interconversões de pentose e glucuronato
G7IQ96	174,981	12	3	88,4306	0.333342665	1,01	HSPA4 nucleotide-binding domain protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Comunidade celular - eucariotos / junção apertada / Sistemas Organismais / Sistema Imunitário / Processamento e apresentação de antígenos / Chaperones e catalisadores dobráveis / Proteínas de choque térmico / HSP70 / DNAK
G7KKR8	59,563	3	1	25,2609	0.927689396	1,01	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
I3T2H0	42,539	17	12	181,6607	0.385065434	1,01	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos
Q7XYH4	4,868	11	4	137,9627	0.73321646	1,01	Cytosolic malate dehydrogenase (EC 1.1.1.82) (Fragment)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Metabolismo de Aminoácidos
G7JE78	49,543	2	1	10,7374	0.84295785	1,01	Receptor-like kinase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de informação ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização MAPK - planta / Sistemas Organismais / Adaptação ambiental / Interação planta-patógeno
B7FGU7	23,899	6	4	47,7969	0.676604079	1,01	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit (EC 1.10.9.1)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese
B7FKU5	29,407	3	1	22,8911	0.857227768	1,01	Uncharacterized protein (PsbP domain-containing protein 4, chloroplastic)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese / Proteínas da fotossíntese / Sistema de fotossistema e transporte de elétrons / fotossistema II
G7ZUV5	29,036	8	1	88,5272	0.81580823	1,01	1-cys peroxiredoxin PER1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanoides
B7FJ53	28,070	10	10	82,6343	0.783321328	1,00	Light-harvesting complex I chlorophyll A/B-binding protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena
A0A072VAK2	25,851	8	2	83,1248	0.950165022	1,00	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo energético / Fotossíntese - proteínas de antena

Tabela 9. Proteínas mais expressas em plantas cultivadas na presença de HPA

Uniprot ID	Massa kDa	Peptídeos	Nº de Peptídeos únicos	Score	Anova (p)	Fold change	Proteínas	Organismo	Ontologia
A0A072TG33	35,408	2	1	11,03	9.83E-08	76,48	Ion channel protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transporters / Transdução de sinal
A0A126TGR5	54,917	22	1	26,68	7.27E-06	41,93	ATP synthase subunit alpha	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Adaptação ambiental
G7JQ29	42,916	6	1	51,21	0,000305	13,29	S-adenosylmethionine synthase (EC 2.5.1.6)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de metionina e cisteína
B7FLV3	36,376	2	1	10,94	2.66E-05	6,49	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (Vacuolar import/degradation, VID27-like protein (Medicago truncatula))	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Carcinogênese química / arilsulfotransferase / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Degradação de 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina
A0A072TJ17	19,422	1	1	5,07	0,027008	4,88	Aspartyl protease family protein, putative	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processos celulares / Crescimento celular e morte / Ciclo celular
I3SDP0	13,423	2	1	11,74	0.029335631	4,16	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (cold shock protein 2 (Vigna radiata var. radiata))	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Respostas a estresses abióticos
G7J9R2	59,588	2	1	10,64	6.03E-05	3,53	Cytochrome P450 family protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Metabolismo de drogas / Metabolismo de lipídeos / Metabolismo de terpenóides e policetídeos
G7INA7	16,575	7	4	74,21	1.90E-09	3,34	ABA-responsive protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Transdução de sinal por hormônio vegetal
G7IPJ9	56,662	4	1	22,71	2.80E-09	3,13	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (EC 2.5.1.54)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis / chorismate mutase
Q94IM3	16,830	11	6	155,69	1.36E-11	3,10	Class 10 PR protein	<i>Medicago sativa</i> L.	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico / Grande indução na presença de Ácido salicílico
A0A072TRI7	27,942	5	2	50,09	4.74E-11	2,83	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de Nitrogênio
A0A072TRS0	26,567	11	1	96,90	2.61E-11	2,72	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Metabolismo de aminoácidos
G7L8F8	18,026	4	1	35,36	0.003107834	2,54	Pathogenesis-related protein bet V I family protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
G7JKF2	62,348	2	2	18,02	1.61E-05	2,30	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit beta (PPF) (EC 2.7.1.90) (6-phosphofructokinase, pyrophosphate dependent) (PPi-PFK) (Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructose-1-kinase)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Processamento de Informação Genética / Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal
B7FM98	19,457	1	1	6,13	0,123415	2,23	Plant/F25P12-18 protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Organização da parede celular
Q94IM2	8,525	5	1	58,14	0,018832	2,20	Ubiquitin (Fragment)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processo de modificação de proteína celular / Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina / ubiquitinação proteica envolvida no processo catabólico proteico dependente de ubiquitina
A0A060CS45	72,334	14	4	104,09	8.38E-08	2,17	Heat shock protein 70	<i>Medicago sativa</i> L.	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
Q8L6K8	16,592	9	2	138,48	0,000143	2,09	Pprg2 protein	<i>Medicago sativa</i> L.	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
Q1RSH3	61,168	5	4	28,39	3.06E-08	2,03	GroEL-like chaperone, ATPase (TCP-1/cpn60 chaperonin family protein)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Degradação de RNA
A0A072V4P8	45,544	3	2	24,25	4.71E-10	2,01	Extracellular dermal glycoprotein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
Q945R2	11,915	10	1	117,48	7.24E-10	2,00	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (EC 4.1.1.39) (Fragment)	<i>Medicago sativa</i> L.	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotossíntese
A0A072VQ38	31,372	2	2	11,00	5.66E-07	1,96	Ferredoxin reductase-like NAD(P) binding domain protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
G7LI94	46,623	11	1	84,98	1.32E-06	1,93	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Degradação de RNA
G7J5U5	23,589	1	1	12,25	4.14E-08	1,91	Single hybrid motif protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de glicina, serina e treonina
A0A072TJV0	160,309	20	4	240,22	0,00014	1,77	Photosystem I P700 chlorophyll A apoprotein A2	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
A0A072TLK9	41,913	7	6	51,63	1.23E-08	1,76	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de terpenóides e policetídeos / Biossíntese do "esqueleto" terpenóide
G7KVR0	23,874	3	3	42,81	1,98E-08	1,74	Polygalacturonase inhibiting protein, putative	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico

G7IMF2	160,598	16	3	110,93	3,49E-07	1,69	Drug resistance transporter-like ABC domain protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transporte de Membranas / Transportadores ABC / Resistência a drogas
A0A072TNJ3	69,804	6	2	42,54	2,53E-07	1,66	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
H2EIY4	47,159	16	1	151,06	0,000179	1,65	Monodehydroascorbate reductase	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos
G7I6Q7	55,079	2	1	10,7336	0,077281	1,65	3-isopropylmalate dehydratase, large subunit	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoácidos / Biossíntese de outros metabólitos secundários
G7I885	60,560	4	4	32,46	2,97E-10	1,64	Aspartate-tRNA ligase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Biossíntese de aminoacil-tRNA
G7L418	42,978	3	2	23,92	0,009447	1,62	F-box protein interaction domain protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Sistemas Organismais / Adaptação ambiental / Ritmo Circadiano - Planta / Sistema Ubiquitina / Ligações Ubiquitina (E3) / Subunidades Múltiplas Tipo Ring-finger Complexo E3 / SCF / Subunidade Alvo de Reconhecimento (F-box)
A0A072V577	66,919	1	1	5,48	4,45E-05	1,59	Methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Caminhos de fixação de carbono em procariontes / Metabolismo de cofatores e vitaminas/ Um reservatório de carbono por folato / Resistência a droga / Antifolate resistance
Q8GTY4	30,018	22	1	324,42	0,023884	1,58	Rubisco activase (Fragment)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotosíntese
W8CYE3	52,617	30	4	439,81	1,99E-11	1,54	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit) (EC 4.1.1.39)	<i>M. truncatula f. tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotosíntese
A0A1L2BU75	28,218	5	2	44,67	1,25E-07	1,53	Beta-1,3-glucanase 3 (Fragment)	<i>Medicago sativa L. subsp. varia</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de outros aminoácidos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
G7KX02	67,296	2	1	11,71	0,002805	1,52	Multi-copper oxidase-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de alcalóides de isoquinolinas / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de Tirosina
A0A072TV12	73,643	17	2	138,08	0,036953	1,51	Heat shock cognate 70 kDa-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
A0A072UJW7	43,211	17	1	273,04	8,59E-06	1,50	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de Metano
A0A072TIZ9	63,026	2	1	10,66	0,001255482	1,50	Pentatricopeptide (PPR) repeat protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Defesa / Regulação de Plantas de respostas a estresses bióticos e abióticos
G7JZV2	71,282	1	1	5,85	3,70E-05	1,49	Type I inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de Fosfato de inositol / Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Sistema de sinalização de fosfatidilinositol
I3TIE8	17,720	4	4	50,19	5,52E-05	1,49	Photosystem I reaction center subunit V OS=Medicago truncatula GN=MTR_3g010000 PE=4 SV=2	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotosíntese
Q2HU14	40,313	9	1	89,41	6,44E-10	1,48	Glycoside hydrolase, family 17	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de amido e sacarose
O48905	35,547	11,1	1	153,73	7,81E-07	1,48	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Metabolismo de aminoácidos
A0A072TQB8	41,279	6	2	54,69	2,26E-07	1,47	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Via de fosfato de pentose
I3SIV2	21,991	2	2	10,34	3,94E-06	1,46	40S ribosomal protein S7	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Ribossomo
Q18PS3	346,861	15	2	103,17	7,97E-05	1,45	Polyprotein	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Proteínas virais / vírus ssRNA
G7IGB3	68,633	11	5	73,92	1,73E-07	1,44	Heat shock cognate 70 kDa-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
G7LBM2	53,582	1	1	10,09	3,32E-06	1,43	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Metabolismo de glicerolípídeos / Biossíntese e Metabolismo do Glicano / Metabolismo de terpenóides e policetídeos / Biossíntese de outros metabólitos secundários
G7IU25	110,501	3	3	16,70	4,79E-07	1,42	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de piruvato / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos
I3SJD3	20,067	13	4	146,72	3,32E-08	1,42	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (EC 4.1.1.39)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotosíntese
B7FK04	21,221	4	1	47,00	6,83E-08	1,41	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Transporte e catabolismo / Peroxissomo
G7J0Y9	23,482	8	1	940,75	1,96E-06	1,40	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotosíntese
Q40323	23,313	28	3	277,09	3,33E-06	1,40	70 kD heatshockprotein (Fragment)	<i>Medicago sativa L.</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
I3SBD7	41,369	12	7	98,72	0,002222734	1,40	12-oxophytodienoate reductase-like protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_5g006750 PE=2 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / processo biossintético do ácido jasmônico
A0A072TI38	16,380	1	1	5,45	4,40E-05	1,39	PfkB family carbohydrate kinase (Fragment)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Via de fosfato de pentose / Metabolismo de frutose e manose / Metabolismo de galactose / Metabolismo Energético / Metabolismo de Metano

G7L8G2	17,914	3	1	35,76	1.31E-06	1,39	Pathogenesis-related protein bet V I family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Defesa / Regulação de Plantas de respostas a estresses bióticos e abióticos
G7L8U4	15,825	2	2	30,06	4.44E-05	1,38	Ferredoxin	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
A0A072TX5	70,194	12	2	108,17	5.55E-08	1,38	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
A0A072VIR5	235,450	1	1	5,61	0.000421792	1,36	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Crescimento celular e morte / Apoptose - várias espécies
A0A072UCL9	21,988	2	2	16,12	4.58E-07	1,36	Import inner membrane translocase subunit TIM22	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biogênese mitocondrial / Máquinas de importação de proteína mitocondrial / Membrana interna / complexo TIM22 / Transportadores / Outros Transportadores
B7FKK6	24,980	1	1	11,11	1.21E-05	1,36	Hexosyltransferase (EC 2.4.1.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoácúcar e açúcar nucleotídeos / Biogênese e degradação de parede celular
G7J2S0	54,013	2	2	16,51	9.86E-08	1,36	Substrate carrier family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Transportadores / Família Portadora de Solutos / Portador Mitocondrial
P93327	34,924	5	1	41,09	6.08E-06	1,35	Chitinase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoácúcar e açúcar nucleotídeos
P52575	35,455	9	2	63,94	1.28E-06	1,35	Isoflavone reductase (IFR) (EC 1.3.1.45) (2'-hydroxyisoflavone reductase) (NADPH:isoflavone oxidoreductase)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de Isoflavonóides
Q945R0	21,085	17	2	294,78	3.07E-08	1,35	Plastidic aldolase (Fragment)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de Metano
G7IE32	29,177	7	2	69,87	2.59E-07	1,34	1-cys peroxiredoxin PER1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
A0A072UGC9	162,017	5	1	29,65	0.000295813	1,32	Drug resistance transporter-like ABC domain protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transporte de Membranas / Transportadores ABC / Resistência a drogas
A0A072VXU2	32,034	3	2	16,76	1.32E-05	1,32	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
C4B4U9	347,732	14	1	100,69	0.000785238	1,31	Polyprotein	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Proteínas virais / vírus ssRNA
A0A072USR4	48,830	4	3	35,33	2.50E-07	1,31	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
G7KEI3	47,817	1	1	5,28	4.54E-06	1,31	Sucrase/ferredoxin family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Desconhecida
B7FK47	27,946	2	2	11,96	6.73E-06	1,30	Ferritin (EC 1.16.3.1)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Crescimento celular e morte
P00220	10,493	2	2	34,12	7.27E-05	1,29	Ferredoxin	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
I3TA03	29,927	18	10	154,56	5.30E-05	1,28	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase family protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g064170 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Ascorbate and aldarate Metabolismo / Metabolismo de piruvato / Metabolismo de lipídeos / Degradação de ácidos graxos / Metabolismo de glicerolipídeos / Metabolismo de aminoácidos / Degradação de valina, leucina e isoleucina / Degradação de lisina / Metabolismo de arginina e prolina / Metabolismo de Histidina / Metabolismo de triptofano / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de beta-Alanina / Metabolismo de terpenóides e policetídeos / Degradação de Limoneno e Pineno
I3SDJ6	29,727	8	8	77,25	9.72E-09	1,28	Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_7g009330 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biogênese mitocondrial / Máquinas de importação de proteínas mitocondriais / Membrana externa / Porin / Transportadores / Outros transportadores / Canais iônicos de poros / Canais de íons / Canais de cloro / Canal de cloro Maxi
B7FNA0	54,841	5	3	41,08	2.48E-05	1,28	Processing peptidase OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g102230 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biogênese mitocondrial / Máquinário de importação de proteína mitocondrial / Matriz
I3SM45	16,590	8	3	52,41	0.00014176	1,28	Alpha-galactosidase OS=Medicago truncatula GN=MTR_7g073650 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de galactose / Metabolismo de lipídeos / Processos celulares / Transporte e catabolismo / Lisossomo
G7JGT1	51,299	16	2	127,51	0.000129026	1,27	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Via de fosfato de pentose
G7IUC4	39,372	3	1	25,65	1.26E-05	1,27	ADP/ATP carrier protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético
A0A072U566	50,006	6	6	34,00	2.32E-06	1,27	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Chaperones e catalisadores de enovelamento/ Catalisadores de enovelamento de proteínas / Peptidyl prolyl isomerase / Ciclofilina
B7FKU7	34,254	5	1	39,16	0.000625655	1,27	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de Enxofre/ Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de metionina e cisteína
I3T683	29,518	8	1	88,41	0,001339	1,26	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (1-cys peroxiredoxin PER1)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
G7J421	49,554	4	3	28,42	7.47E-06	1,26	Tubulin alpha chain	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Transporte e catabolismo / Fagossomo / Crescimento celular e morte/ Apoptose / Proteínas do citoesqueleto / proteínas do citoesqueleto eucariótico / Microtúbulos / Biogênese de RNA mensageiro / vigilância de RNAm e fatores de transporte / fatores do ciclo de RNAm
H2D5S2	52,333	6	3	36,11	0.002814013	1,26	Citrate synthase	<i>Glycine max</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato

W8CYC2	82,441	31	6	415,86	0.004819693	1,26	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 (EC 1.97.1.12) (PSI-B) (PsaB)	<i>M. truncatula f. tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
G7IMF4	160,464	25	8	201,26	4.51E-05	1,26	Drug resistance transporter-like ABC domain protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transporte de Membranas / Transportadores ABC / Resistência a drogas
A0A072VNU6	45,707	2	2	10,66	0.000417462	1,25	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Biossíntese de Esteróides / Metabolismo de terpenóides e policetídeos / Biossíntese de sesquiterpenóides e triterpenóides
Q45NL5	21,306	4	1	21,87	0.002252834	1,25	Elongation factor 2 (Fragment)	<i>Medicago sativa L.</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização de AMPK / Fatores de Tradução / Tipo eucarioto / Fatores de alongamento / Exossomo / Proteínas Exossomais/ Proteínas encontradas na maioria dos exossomos
B7FH62	17,081	2	2	37,35	1.35E-05	1,25	Plastocyanin	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese / Proteínas da Fotossíntese / Sistema de fotossistema e transporte de elétrons / Transporte de elétrons fotossintéticos
A0A072TKF2	46,544	2	1	32,08	5.93E-05	1,24	NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain 4, chloroplasic	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa
C4B4V1	347,243	12	1	92,96	4.29E-05	1,24	Polyprotein	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Proteínas virais / vírus ssRNA
A0A072TH40	51,823	2	1	17,62	2.34E-05	1,24	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_0109s0050 PE=4 SV=1 (Ribulose biphosphate carboxylase small chain 3A)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos
G7L012	38,311	7	2	52,28	0.006687173	1,24	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
A0A072SQR2	345,718	13	1	90,71	0.003551265	1,23	Polyprotein (Fragment)	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Proteínas virais / vírus ssRNA
Q5RLX9	35,029	7	3	56,80	2.32E-08	1,23	Chitinase	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoácido e açúcar nucleotídeos
G7KSU5	32,728	2	2	17,33	5.55E-05	1,23	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (EC 3.4.21.92)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo energético da subunidade alfa do ATP-citrato liase/ Caminhos de fixação de carbono em procariontes / ATP-citrato liase alpha-subunit
B7FM77	57,953	2	1	11,01	7.62E-07	1,23	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (Alanine aminotransferase)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato / Metabolismo de glicina, serina e treonina / Processos celulares / Transporte e catabolismo / Peroxissomo
A0A072V1D5	64,071	12	10	92,62	1.31E-06	1,22	Patellin-3 protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Tráfego de Membranas / Exocitose
B7FM93	17,773	4	3	39,26	1.84E-05	1,22	Glycine cleavage system H protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de glicina, serina e treonina
A0A072V4P4	49,248	18	16	167,79	5.69E-08	1,22	Catalase (EC 1.11.1.6)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo de aminoácidos / Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização de MAPK - Planta / Processos celulares/ Transporte e catabolismo / Peroxissomo
Q9SBS1	58,075	1	1	5,05	0.007623596	1,22	Ran GTPase activating protein	<i>Medicago sativa L. subsp. varia</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Transporte de RNA / Proteína ativadora de GTPase Ran 1
I3SVR3	32,814	19	8	134,64	1.62E-06	1,22	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase OS=Medicago truncatula GN=MTR_4g125970 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Degradação de RNA
I3RS0	17,291	14	7	127,42	1.01E-05	1,22	Formate dehydrogenase, mitochondrial OS=Medicago truncatula GN=MTR_6q007170 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Metabolismo de Metano
I3SN05	53,190	17	12	199,69	2.54E-08	1,21	Elongation factor Tu OS=Medicago truncatula GN=MTR_3g076660 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Fatores de Tradução / Tipo eucarioto / Prokaryotic Type / Fatores de alongamento / Biogênese mitocondrial / Transcrição de DNA mitocondrial, fatores de tradução e replicação / Transcrição mitocondrial e Fatores de tradução / Fatores de controle de qualidade mitocondrial / Regulador da biogênese mitocondrial / Ubiquitina Fatores de transcrição / Exossomo / Proteínas Exossomais / Proteínas Exossômicas de células hematopoiéticas (B-célula, célula T, célula DC, reticulócito e mastócito) / Proteínas Exossômicas de células de câncer de mama / Proteínas Exossomais de células de câncer colorretal
G7IK10	245,968	1	1	5,01	0.004805732	1,21	Separase-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Crescimento celular e morte / Meiose / cromossomo e proteínas associadas / proteínas de separação de cromátides irmãs
I3STV1	27,164	8	7	77,62	3.81E-08	1,21	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (20 kDa chaperonin, chloroplasic (Fragment))	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Chaperones e catalisadores de enovelamento / Proteínas de choque térmico / HSP10
G7J3P7	24,567	1	1	11,63	0.129677404	1,21	RAB GTPase-like protein A1D	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Transporte e catabolismo / Endocitose / Tráfego de Membranas / Reciclo de proteínas / Rab GTPases e proteínas associadas
G7IMV1	82,605	8	7	51,59	1.29E-05	1,21	Alpha-L-arabinofuranosidase/beta-D-xylosidase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoácido e açúcar nucleotídeos
G7L7L3	83,895	3	3	28,12	1.04E-05	1,21	Subtilisin-like serine protease	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Comunidade celular - procariontes / Quorum sensing / subtilisina
G7IEF0	46,748	10	3	85,99	5.76E-06	1,20	Xyloglucanase-specific endoglucanase inhibitor protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
G7K3S4	41,025	5	1	36,36	0.001041	1,20	12-oxophytodienoate reductase-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / processo biossintético do ácido jasmônico
G7ITZ5	107,049	39	12	373,28	4.42E-07	1,20	Aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2.1.3)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo Energético / Caminhos de fixação de carbono em procariontes

A0A072U6K7	28,247	9	1	99,55	0,031043	1,20	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético /Fotossíntese - proteínas da antena
USTRY3	23,826	7	5	40,55	2.65E-06	1,20	Chalcone-flavonone isomerase family protein	<i>Medicago sativa</i> L.	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de flavonóides
Q40365	37,153	4	2	42,59	2.69E-06	1,20	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	<i>Medicago sativa</i> L.	Defesa / Regulação de Plantas de respostas a estresses bióticos e abióticos
V5RDX2	347,488	16	2	119,62	0.00022032	1,19	Polyprotein	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Proteínas virais / vírus ssRNA
A0A072TPS1	12,704	1	1	5,83	0.000412573	1,19	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g028790 PE=4 SV=1 (Ribonuclease H)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Replicação e reparo / Reparo de excisão de base
B7FIU4	35,483	3	3	22,28	6.57E-05	1,19	F0F1 ATP synthase subunit gamma OS=Medicago truncatula GN=MTR_4g129790 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético /Fosforilação oxidativa
A0A072U160	55,723	2	1	19,69	0.129739468	1,19	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
A0A072V659	26,152	1	1	5,74	0.008237274	1,19	Membrin	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Interações SNARE no transporte vesicular / Tráfego de Membranas
I3T4F9	25,135	1	1	6,41	0.000753885	1,18	60S ribosomal protein L10-2 OS=Medicago truncatula GN=MTR_2g090910 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Ribossomo
G7K036	98,011	5	1	32,40	0.002077556	1,18	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Ácido Linoleico Metabolismo
I3SEU9	19,275	4	4	33,42	4.66E-06	1,18	Thioredoxin M-type protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_3g089065 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de Selenocompostos
G7KGT1	52,284	19	4	271,33	0.002219215	1,17	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotossíntese
P29828	57,087	15	6	106,91	5.16E-06	1,17	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1)	<i>Medicago sativa</i> L.	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
A0A072V9C7	69,621	2	1	10,89	0.096881305	1,17	Nuclear pore complex-like protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Transporte de RNA / Biogênese de RNA mensageiro / Tipo eucarioto /vigilância do mRNA e fatores de transporte / Transport factors / Nuclear pore complex
G7K8Y3	66,632	2	2	12,21	0.011438335	1,17	Formate-tetrahydrofolate ligase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Caminhos de fixação de carbono em procariontes / Metabolismo de cofatores e vitaminas/ Um reservatório de carbono por folato
A0A072UGG8	93,768	4	3	29,21	7.80E-05	1,17	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
G7IDV6	63,140	3	3	21,44	0.000163242	1,17	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo de piruvato / Metabolismo de nucleotídeos / Metabolismo de Purina
G7JCN3	47,318	1	1	5,68	0.005160576	1,17	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Biossíntese de outros metabólitos secundários
P28011	45,691	4	3	28,37	1.12E-05	1,17	Aspartate aminotransferase 1 (EC 2.6.1.1) (Transaminase A)	<i>Medicago sativa</i> L.	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Biossíntese de outros metabólitos secundários
I3SW43	9,507	6	6	45,99	1.00E-07	1,17	Cysteine synthase/L-3-cyanoalanine synthase OS=Medicago truncatula GN=MTR_7g078070 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético /Metabolismo de Enxofre/ Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de metionina e cisteína
G7JAV5	24,509	1	1	11,81	0.003060535	1,17	Alginate lyase	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de frutose e manose
I3T750	38,159	2	2	10,91	0.001424038	1,16	Gamma-glutamyl hydrolase (EC 3.4.19.9)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de cofatores e vitaminas/ Biossíntese de Folato
G7IN02	105,616	7	1	39,22	4.09E-07	1,16	Plasma membrane ATPase (EC 3.6.3.6)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético /Fosforilação oxidativa
G7I770	70,166	1	1	5,04	0.001446596	1,16	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_1g025180 PE=4 SV=2 (Glucose-repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effector)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Degradação de RNA
A0A072VVG3	38,343	8	5	63,85	1.47E-05	1,16	Fructose-biphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de Metano
Q9PWS5	30,817	3	1	22,05	0.001367897	1,16	Polyprotein (Fragment)	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Proteínas virais / vírus ssRNA
I3T307	40,689	5	3	51,16	0.000219381	1,16	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (EC 1.1.1.284)	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Metabolismo de Metano / Metabolismo de lipídeos / Degradação de ácidos graxos / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de Tirosina / Metabolismo de cloroalqueno / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Degradação de cloroalqueno e cloroalqueno / Degradação de naftaleno / Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 / Metabolismo de droga - citocromo P450
I3S0L8	33,916	4	3	30,39	0.000786236	1,16	Zinc-binding dehydrogenase family oxidoreductase OS=Medicago truncatula GN=MTR_7g034395 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula</i> / <i>M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo de lipídeos / Degradação de ácidos graxos / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de Tirosina / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Degradação de cloroalqueno e cloroalqueno / Degradação de naftaleno

A0A072UID0	84,476	19	4	177,28	0.000177985	1,15	Cobalamin-independent methionine synthase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de metionina e cisteína / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de Selenocompostos
A9CSX3	347,557	4	2	26,77	0.001953793	1,15	Polyprotein	Bean yellow mosaic virus	Proteínas virais / vírus ssRNA
A2Q199	72,410	12	7	77,65	0.000111676	1,15	Chaperone DnaK (Heat shock 70 kDa protein)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Degradação de RNA
B7FMC2	20,218	10	1	81,67	0.027289332	1,15	Ribulose biphosphate carboxylase small chain (EC 4.1.1.39)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotossíntese
G7KDJ3	68,923	12	2	75,39	0.00028731	1,15	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa
G7IHV2	35,237	11	6	70,31	0.000173455	1,15	PfkB family carbohydrate kinase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de frutose e manose / Metabolismo de amido e sacarose / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar nucleotídeos
A0A072U5R2	28,425	6	5	42,52	1.51E-06	1,15	Photosystem II reaction center PsbP family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
G7JTD2	52,169	10	2	119,44	0.003520887	1,15	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotossíntese
I3S7X7	13,643	24	22	268,76	1.71E-05	1,14	Aminomethyltransferase OS=Medicago truncatula GN=MTR_4g132360 PE=2 SV=2	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicilato e dicarboxilato / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo of cofactors and vitamins
A0A072UM99	10,762	1	1	5,51	0.141900165	1,14	U6 snRNA-associated-like-Smpprotein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Transcrição / Spliceossomo / Enovelamento, classificação e degradação / Degradação de RNA / Biogênese de RNA mensageiro / Tipo eucarioto / vigilância do mRNA e fatores de transporte / fatores do ciclo de mRNA
G7INB7	16,608	7	1	115,49	0.000208947	1,14	ABA-responsive protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Transdução de sinal por hormônio vegetal
G7JNJ7	35,801	5	3	37,10	0.016911001	1,14	Enoyl-acyl-carrier reductase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Biossíntese de ácidos graxos / Metabolismo de cofatores e vitaminas / Metabolismo de Biotina / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de Prodigiosina
G8A093	41,879	1	1	5,71	0.008236347	1,14	Sulfurtransferase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Sistema de retransmissão de enxofre
G7JS60	24,204	3	2	26,48	5.08E-05	1,14	Thioredoxin-dependent peroxidase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de Selenocompostos
I3SYF9	28,221	17	14	202,29	0.000814527	1,13	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1 OS=Medicago truncatula GN=MTR_3g449930 PE=2 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese / Proteínas da Fotossíntese / Sistema de fotossistema e transporte de elétrons / Fotossistema II (P680 Clorofila a)
B7FIF8	26,929	4	3	22,61	0.001195486	1,13	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (20 kDa chaperonin, chloroplastic)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Chaperones e catalisadores de enovelamento/ Proteínas de choque térmico / HSP10
W8CYB0	8,869	6	5	81,00	7.60E-06	1,13	Photosystem I iron-sulfur center (EC 1.97.1.12) (9 kDa polypeptide) (PSI-C) (Photosystem I subunit VII) (PsaC)	<i>M. truncatula f. tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
A0A072U1Y2	19,227	1	1	5,66	0.182195757	1,13	Transmembrane protein, putative	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Desconhecida
G7KZG9	53,986	2	2	10,88	0.003486912	1,13	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMP dehydrogenase) (IMPD) (IMPDH) (EC 1.1.1.205)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de nucleotídeos / Metabolismo de Purina / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Metabolismo de drogas - outras enzimas
A0A072U174	85,628	2	1	15,64	0.00132637	1,12	3-ketoacyl-CoA synthase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Alongamento de ácidos graxos
G7J9I7	75,204	4	2	26,68	0.001266544	1,12	Threonyl-tRNA synthetase/threonine-tRNA ligase, putative	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Biossíntese de aminoacil-tRNA
I3SIY3	32,915	8	1	50,62	0.007557788	1,12	Phosphoglycolate phosphatase (EC 3.1.3.18)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicilato e dicarboxilato
A0A072V1G6	30,015	1	1	6,06	0.003882785	1,12	Ribulose-phosphate 3-epimerase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Via de fosfato de pentose / Interconversões de pentose e glucuronato
A0A072TWL0	16,461	5	4	48,23	0.000107517	1,12	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de nucleotídeos / Metabolismo de Purina / Metabolismo de Pirimidina / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Metabolismo de drogas - outras enzimas / Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização de MAPK - Planta
G7LIA2	94,723	18	5	145,92	0.001410375	1,12	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Ácido Linoleico Metabolismo
B7FJY9	27,720	7	4	65,44	0.001193663	1,12	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese - proteínas da antena
G7KEZ1	35,455	8	1	54,27	0.00349254	1,12	Isoflavone reductase-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de Isoflavonóides
I3SSM1	54,412	1	1	5,49	0.247932945	1,12	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (Aminoaldehyde dehydrogenase)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de glicina, serina e treonina
I3T426	39,086	7	5	58,67	0.000193878	1,11	2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase OS=Medicago truncatula GN=MTR_1g071110 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de cofatores e vitaminas/ Biossíntese de Ubiquinona e outras quinona-terpenóides

G7K694	40,673	17	12	162,20	0.000145558	1,11	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de Metano
W8CYL6	52,711	24	2	279,21	0.000240406	1,11	ATP synthase subunit beta, chloroplastic (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector subunit beta) (F-ATPase subunit beta)	<i>M. truncatula f. tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Adaptação ambiental
G7KHE5	76,215	13	8	103,45	0.000491241	1,11	Tousled-like kinase, putative	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização de MAPK - Planta
G7K4R2	80,161	28	20	253,89	3.05E-06	1,11	Heat shock protein 81-2	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
O65198	20,825	8	3	79,53	0.049514281	1,11	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic (EC 1.15.1.1)	<i>Medicago sativa L.</i>	Processos celulares / Transporte e catabolismo / Resposta ao estresse abiótico
A0A072TZH4	60,574	6	5	34,17	0.00169812	1,11	NAD(P)-binding rossmann-fold protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de terpenóides e policetídeos / Biossíntese Monoterpenóide / (+) - neomenthol desidrogenase
Q45FE6	56,139	25	12	236,07	6.63E-06	1,11	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Metabolismo de aminoácidos
G7K590	20,927	4	1	34,21	0.301639675	1,11	ADP-ribosylation factor-like protein A1D	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / via de sinalização de fosfolipase D / Processos celulares / Tráfego de Membranas / Proteínas ligadoras de GTP
G7JDJ4	107,326	29	11	248,58	1.80E-05	1,11	Aconitate hydratase (aconitase) (EC 4.2.1.3)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo Energético / Caminhos de fixação de carbono em procariontes
G7JNN9	28,626	10	8	101,72	2.99E-05	1,11	O-acetylserine (Thiol) lyase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de Enxofre / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de metionina e cisteína
A0A072TZC5	41,726	5	2	29,23	0.19795644	1,10	Enoyl-acyl-carrier reductase	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Biossíntese de ácidos graxos / Metabolismo de cofatores e vitaminas / Metabolismo de Biotina / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de Prodigiosina
B7FGC2	23,111	1	1	6,25	0.000344243	1,10	Delta(24)-sterol reductase-like protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_4q074350 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Biossíntese de Esteróides
A0A072F59	93,237	20	1	251,47	0.003137562	1,10	ATP synthase F1, alpha subunit	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Adaptação ambiental
Q2HRQ7	43,054	2	1	11,37	0.000420619	1,10	Peptidase A1, pepsin	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de glutatona
Q1SKX2	75,756	35	28	316,67	5.09E-06	1,10	70 kDa heat shock protein (Chaperone DnaK)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
H2EIY5	53,840	2	2	10,66	0.000181276	1,10	Uncharacterized protein OS=Medicago sativa PE=2 SV=1 (Metacaspase-5)	<i>Medicago sativa L.</i>	Processos celulares / Crescimento celular e morte / Apoptose - várias espécies
I3SC68	49,899	5	4	35,19	0.000790926	1,10	Acetamidase/formamidase, putative OS=Medicago truncatula GN=MTR_4q095660 PE=2 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Metabolismo de Nitrogênio / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de Ciano aminoácidos
A0A072VL01	45,163	15	11	109,57	0.000512626	1,09	Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial (EC 6.2.1.5) (Succinyl-CoA synthetase beta chain) (SCS-beta)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo Energético / Metabolismo de propanoato
G7J4L9	74,051	2	1	11,48	0.208990419	1,09	Rhamnolacturonate lyase B-like protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos
A0A072UZK1	44,439	2	2	10,83	0.073737824	1,09	Plant/F1M20-13 protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Organização da parede celular
A0A072TSK6	29,847	5	5	45,81	0.000233252	1,09	Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Biogênese mitocondrial / Máquinas de importação de proteínas mitocondriais / Membrana externa / Porin / Transportadores / Outros transportadores / Canais iônicos de poros / Canais de íons / Canais de cloro / Canal de cloro Maxi
A0A072VDW9	62,628	24	19	203,40	0.000111152	1,09	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação
A0A072TU77	109,681	3	2	22,60	0.003826111	1,09	Peptidase M1 family aminopeptidase N	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de glutatona
C8CGU0	43,000	20	14	248,10	1.41E-05	1,09	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Via de fosfato de pentose
G7I9C1	56,012	20	9	143,20	2.60E-06	1,09	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo de piruvato / Metabolismo de nucleotídeos / Metabolismo de Purina
I3SLQ5	29,307	3	2	22,81	0.00090164	1,09	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (Gamma carbonic anhydrase 1, mitochondrial)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de Nitrogênio / Anidrase carbônica
I3SU13	17,057	4	4	26,14	0.019030437	1,09	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g091420 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização de MAPK - Planta / Resistência a droga / Resistência a Platina
G7JJ31	21,514	1	1	11,37	0.015673548	1,08	CASP-like protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Defesa / Regulação de Plantas de respostas a estresses bióticos e abióticos
I3T435	16,631	9	7	81,68	0.000363648	1,08	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal-like protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_1g047210 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Degradação de ácidos graxos / Metabolismo de ácido alfa-linoléico / Biossíntese de ácidos graxos insaturados / Metabolismo de aminoácidos / Degradação de valina, leucina e isoleucina / Processos celulares / Transporte e catabolismo / Peroxissomo

G7IS29	96,914	4	1	32,72	0.001243541	1,08	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Ácido Linoleico Metabolismo
A0A072TN73	8,948	1	1	5,12	0.018433924	1,08	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g031690 PE=4 SV=1 (Putative TIR-NBS-LRR resistance protein)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
I3RZA0	53,281	24	19	221,69	0.000183813	1,08	Dihydropolyl dehydrogenase OS=Medicago truncatula GN=MTR_4g123070 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de propanoato / Metabolismo de aminoácidos / Degradação de valina, leucina e isoleucina
G7JLV1	49,457	14	1	183,40	0.150934764	1,08	Elongation factor 1-alpha	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Transporte de RNA / Biogênese de RNA mensageiro / Tipo eucarioto / vigilância do mRNA e fatores de transporte / Fatores envolvidos na localização de mRNA / Proteínas de ligação trans-acting / Biogênese de RNA de Transferência / Tipo eucarioto / fatores de transporte tRNA / fatores de exportação tRNA / Fatores de Tradução / Tipo eucarioto / Fatores de alongamento / Tráfico de Membranas / Autofagia / Autofagia mediada por chaperonas (CMA) / Outras proteínas associadas ao CMA / Exossomo / Proteínas Exossomais / Proteínas encontradas na maioria dos exossomos
A0A072V195	103,070	6	5	34,19	5.03E-05	1,08	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo energético da subunidade alfa do ATP-citrato liase/ Caminhos de fixação de carbono em procariontes / ATP-citrato lyase alpha-subunit
G7L3W1	42,654	7	3	64,56	0.000851661	1,08	S-adenosylmethionine synthase (EC 2.5.1.6)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de metionina e cisteína
G7JNZ5	54,659	3	2	21,57	0.036415643	1,08	Mevalonate/galactokinase family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar nucleotídeos
Q2HTL7	21,420	2	2	20,01	0.170201386	1,08	Glycoprotein membrane GPI-anchored protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Tráfico de Membranas / Endocitose / Fagocitose
A0A072UPU7	56,734	4	3	26,09	0.015538065	1,08	Nucleotide-binding protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Transporte e catabolismo / Autofagia - outros eucariotes / Tráfico de Membranas / Autofagia / Proteínas de formação de autofagossomos / Rab GTPases de organelas específicas / Fatores de mitofagia
G7IH34	94,183	16	4	140,29	0.007182211	1,08	Translation elongation factor EF-2 subunit	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biossíntese de proteínas / Biogênese de RNA de transferência / Tipo eucarioto / Aminoacil-ARNt-sintetases (AARSs) / Complexo multi-aminoacil-ARNt-sintetase (MSC)
A0A072UMK4	40,779	4	3	36,28	0.004153335	1,08	Gamma-aminobutyrate transaminase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de butanoato / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato
I3T7Z7	14,186	13	4	118,81	0.00120117	1,08	PfkB family carbohydrate kinase OS=Medicago truncatula GN=MTR_1g064060 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de nucleotídeos / Metabolismo de Purina
G7LH57	51,882	11	2	71,23	0.449246286	1,07	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Metabolismo de aminoácidos
G7INH6	50,113	3	1	28,87	0.064013382	1,07	GTP-binding elongation factor Tu family protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Transporte de RNA / Biogênese de RNA mensageiro / Tipo eucarioto / vigilância do mRNA e fatores de transporte / Fatores envolvidos na localização de mRNA / Proteínas de ligação trans-acting / Biogênese de RNA de Transferência / Tipo eucarioto / fatores de transporte tRNA / fatores de exportação tRNA / Fatores de Tradução / Tipo eucarioto / Fatores de alongamento / Tráfico de Membranas / Autofagia / Autofagia mediada por chaperonas (CMA) / Outras proteínas associadas ao CMA
I3S243	15,582	9	9	88,37	0.012063393	1,07	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase OS=Medicago truncatula GN=MTR_2g079710 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de cofatores e vitaminas/ Metabolismo Porfirina e clorofila
Q2HUJ7	43,321	2	2	11,29	0.051961653	1,07	V-type proton ATPase subunit C	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Processos celulares / Transporte e catabolismo / Fagossomo
A0A072TUS4	73,699	18	1	148,85	0.126431736	1,07	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
I3SVI6	41,276	10	3	79,52	0.035304041	1,07	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase family protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_4g107040 PE=3 SV=2	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Ascorbate and aldarate Metabolismo / Metabolismo de piruvato / Metabolismo de lipídeos / Degradação de ácidos graxos / Metabolismo de glicerolipídeos / Metabolismo de aminoácidos / Degradação de valina, leucina e isoleucina / Degradação de lisina / Metabolismo de arginina e prolina / Metabolismo de Histidina / Metabolismo de triptofano / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de beta-Alanina / Metabolismo de terpenóides e policetídeos / Degradação de Limoneno e Pineno
A0A072V683	51,941	11	6	71,61	0.001498108	1,07	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
G7KWU8	70,905	28	5	280,83	0.006494542	1,07	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
A0A072TW18	64,511	16	5	144,74	0.000970574	1,06	F0F1-type ATP synthase, beta subunit	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa
G7K1D3	28,022	5	4	52,07	0.002420789	1,06	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Metabolismo de Nitrogênio
I3SCB2	41,010	3	2	17,74	0.212480958	1,06	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (EC 1.1.1.284)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Metabolismo de Metano / Metabolismo de lipídeos / Degradação de ácidos graxos / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de Tirosina / Metabolismo de cofatores e vitaminas / Metabolismo de retinol / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Degradação de cloroalqueno e cloroalqueno / Degradação de naftaleno / Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 / Metabolismo de droga - citocromo P450
A0A072TS46	40,941	11	9	78,26	0.002637681	1,06	Zinc-binding dehydrogenase family oxidoreductase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo de lipídeos / Degradação de ácidos graxos / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de Tirosina / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Degradação de cloroalqueno e cloroalqueno / Degradação de naftaleno

A0A072U0Q0	42,947	7	7	72,58	0.061441307	1,06	Fasciclin-like arabinogalactan protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biogênese da parede celular secundária do tipo vegetal/ Adesão celular
O24076	35,666	17	1	173,79	0.169885726	1,06	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	<i>Medicago sativa L.</i>	Tipo eucariótico / vigilância do mRNA e fatores de transporte / Fatores do ciclo de mRNA / Fatores específicos do grânulo de estresse / Exossomo / Proteínas exossômicas
Q40313	27,999	1	1	5,54	0.110125799	1,06	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (EC 2.1.1.104) (Trans-caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase) (CCoAMT) (CCoAOMT)	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de fenilalanina / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides / Biossíntese de Estilbenóide, diarilheptanóide e gíngerol / Biossíntese de flavonóides
I3SYX2	56,229	5	3	36,11	0.004220709	1,06	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de outros aminoácidos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
G7JZK0	65,857	2	2	11,65	0.134343197	1,06	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato
A0A072U7U1	34,871	15	7	166,62	0.001895293	1,06	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos/Glicólise / Gliconeogênese / Via de fosfato de pentose
A0A072UD54	59,118	11	1	70,18	0.207429102	1,06	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa
G7JHA6	16,399	1	1	6,53	0.373160181	1,06	Ferredoxin	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
A2Q3S0	65,511	4	3	24,22	0.043850488	1,06	Heat shock protein Hsp70	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
B7FNA7	50,674	4	3	22,30	0.053609859	1,06	Thylakoid rhodanese-like protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g027835 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
B7FGD4	27,661	2	1	17,59	0.421403975	1,05	Kinesin-like calmodulin-binding protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_5g025100 PE=3 SV=2	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Proteínas do citoesqueleto / proteínas do citoesqueleto eucariótico / Microtúbulos / Proteínas de ligação a tubulina
Q2HUK6	39,534	10	7	80,23	0.00385427	1,05	Mitochondrial substrate carrier (Phosphate carrier protein)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Transportadores / Solute Carrier Family (SLC) / Portador mitocondrial
I3S6D2	36,561	23	7	321,68	0.055326127	1,05	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos/Glicólise / Gliconeogênese / Via de fosfato de pentose
U5XK43	20,067	20	7	210,13	0.002282788	1,05	Actin (Fragment)	<i>M. ruthenica</i>	Proteínas do citoesqueleto / proteínas do citoesqueleto eucariótico
I3SBN3	21,698	3	3	17,56	0.068831142	1,05	Chitinase / Hevein / PR-4 / Wheatin2 OS=Medicago truncatula GN=MTR_7g115220 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos /Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar nucleotídeos
I3SEJ9	30,393	3	2	22,63	0.08597066	1,05	40S ribosomal protein S2-4 OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g105340 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Ribossomo
G7KFR6	21,891	1	1	5,89	0.050772173	1,05	Small GTPase family RAB protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Transporte e catabolismo / Endocitose / Fagossomo / Tráfego de Membranas / Endossomo - transporte de lisossoma / Rab GTPases e proteínas associadas / Rab GTPases
I3S3W6	38,701	1	1	5,25	0.105929082	1,05	Sucrose non-fermenting-like kinase 2 family protein OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g095330 PE=3 SV=2	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização de MAPK - Planta / Transdução de sinal por hormônio vegetal
G7I3R9	52,966	3	2	15,99	0.180545818	1,05	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético /Fosforilação oxidativa
G7KBI3	68,115	9	8	67,40	0.002459054	1,04	Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Via de fosfato de pentose / Metabolismo de amido e sacarose /Metabolismo de aminoaçúcar e açúcar nucleotídeos
G7I7H7	31,428	4	2	25,02	0.084749011	1,04	Thylakoid lumen 18.3 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese / Proteínas da Fotossíntese / Sistema de fotossistema e transporte de elétrons / Fotossistema II
A0A072UDY2	120,722	18	12	127,31	0.001114907	1,04	Presequence protease	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de glutatona
B7FL29	29,927	7	4	52,88	0.001930062	1,04	40S ribosomal protein S4	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Ribossomo
G7JYY8	53,112	20	16	189,92	0.004804694	1,04	Glutamate-glyoxylate aminotransferase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato / Metabolismo de glicina, serina e treonina / Arginine biosynthesis
W8CY81	78,842	4	3	21,82	0.011354859	1,04	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' (EC 2.7.7.6) (PEP) (Plastid-encoded RNA polymerase subunit beta') (RNA polymerase subunit beta')	<i>M. truncatula f. tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo de nucleotídeos / Metabolismo de Purina / Metabolismo de Pirimidina / Processamento de Informação Genética / Transcrição / RNA polymerase
A0A072TWJ2	20,378	6	6	46,76	0.019615226	1,04	RAB GTPase-like protein A5D	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Tráfego de Membranas / Retículo endoplasmático (RE) - Transporte do Golgi /Vias dianteiras / Rab GTPases
G7JHK8	53,888	8	3	63,32	0.119879282	1,04	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo de piruvato / Metabolismo de nucleotídeos / Metabolismo de Purina
A0A072U201	48,929	4	2	21,82	0.122641578	1,04	Elongation factor Tu	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Fatores de Tradução / Tipo eucarioto / Prokaryotic Type / Fatores de alongamento / Biogênese mitocondrial / Transcrição de DNA mitocondrial, fatores de tradução e replicação / Transcrição mitocondrial e Fatores de tradução / Fatores de controle de qualidade mitocondrial / Regulador da biogênese mitocondrial / Ubiquitina Fatores de transcrição / Exossomo / Proteínas Exossomais / Proteínas Exossômicas de células hematopoiéticas (B -célula, célula T, célula DC, reticulócito e

									mastócito) / Proteínas Exossômicas de células de câncer de mama / Proteínas Exossomais de células de câncer colorretal
G7IC27	97,535	8	3	80,33	0.236945913	1,04	Elongation factor 1-alpha	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informação Genética / Tradução / Transporte de RNA / Biogênese de RNA mensageiro / Tipo eucarioto / vigilância do mRNA e fatores de transporte / Fatores envolvidos na localização de mRNA / Proteínas de ligação trans-acting / Biogênese de RNA de Transferência / Tipo eucarioto / fatores de transporte tRNA / fatores de exportação tRNA / Fatores de Tradução / Tipo eucarioto / Fatores de alongamento / Tráfico de Membranas / Autofagia / Autofagia mediada por chaperonas (CMA) / Outras proteínas associadas ao CMA / Exossomo / Proteínas Exossomais / Proteínas encontradas na maioria dos exossomos
I3T8E4	33,785	25	19	266,37	0.017062785	1,04	Phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos
G7KVH0	28,342	3	2	27,09	0.17120552	1,04	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Chaperones e catalisadores de enovelamento/ Catalisadores de enovelamento de proteínas / Peptidil prolyl isomerase / Ciclofilina
I3SKN7	61,903	24	21	191,47	0.008065634	1,03	RuBisCO large subunit-binding protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo Energético / Fotossíntese
A0A072UWD1	95,491	2	2	15,57	0.345698947	1,03	Alpha-1,4 glucan phosphorylase (EC 2.4.1.1)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de amido e sacarose
Q45NG9	18,577	3	1	25,22	0.689364709	1,03	Beta-mannosidase	<i>Medicago sativa L.</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
G7JK55	86,024	26	20	181,43	0.002134049	1,03	Elongation factor G, chloroplastic (cEF-G)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Fatores de Tradução / Tipo eucarioto / Prokaryotic Type / Fatores de alongamento / Biogênese Mitocôndrial / Transcrição de DNA Mitocôndrial, Fatores de Tradução e Replicação / Transcrição Mitocôndrial e Fatores de Tradução / Fatores de Controle de Qualidade Mitocôndrial / Regulador de Biogênese Mitocôndrial / Fatores de Transcrição de Ubiquitina
G7KZ06	67,388	14	6	102,00	0.032941017	1,03	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
G7IN66	47,723	2	2	10,78	0.358944633	1,03	Translation elongation factor EF1B, gamma chain	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biossíntese de proteínas / Biogênese de RNA de transferência / Tipo eucarioto / Aminoacil-ARNt-sintetases (AARSs) / Complexo multi-aminoacil-ARNt-sintetase (MSC)
G7KKS5	59,297	5	4	35,47	0.344347766	1,03	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
B7FMP6	25,559	2	2	17,74	0.031673791	1,03	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de nucleotídeos / Metabolismo de Purina / Metabolismo de Pirimidina / Biodegradação e metabolismo de xenobióticos / Metabolismo de drogas - outras enzimas / Processamento de Informação Ambiental / Transdução de sinal / Via de sinalização de MAPK - Planta
Q9SDZ7	33,973	15	14	154,33	0.124729163	1,03	Isoflavone reductase-like NAD(P)H-dependent oxidoreductase	<i>Medicago sativa L.</i>	Resposta ao estresse oxidativo / Resposta ao ion cádmio
B7FN81	25,799	5	3	35,52	0.230670528	1,03	Processing peptidase OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g014660 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biogênese mitocondrial / Máquinário de importação de proteína mitocondrial / Matriz
Q8W4T8	30,764	4	2	24,10	0.697101701	1,03	Aquaporin	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Transportadores / Outros Transportadores / Aquaporinas e pequenos transportadores de solutos neutros / Aquaporinas
G7KYM9	98,346	3	2	24,79	0.303905703	1,03	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lipídeos / Ácido Linoleico Metabolismo
B7FLM5	59,560	2	1	19,52	0.567937259	1,03	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (Beta-glucosidase G2)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de amido e sacarose / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de Ciano aminoácidos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
G7I8A6	78,316	2	1	17,88	0.342288483	1,02	PPR containing plant-like protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Transportadores / outros transportadores / canais iônicos poros
G7KYY7	68,417	14	4	112,62	0.083521853	1,02	Heat shock 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
I3T635	15,726	5	5	62,56	0.128837778	1,02	Type II peroxidase OS=Medicago truncatula GN=MTR_6g087990 PE=2 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Processos celulares / Crescimento celular e morte / Apoptose
B7FLU1	19,835	29	17	332,04	0.078028358	1,02	Serine hydroxymethyltransferase OS=Medicago truncatula GN=MTR_5g030950 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Metabolismo de aminoácidos
G7I9Z0	114,703	40	36	463,18	0.003490185	1,02	Glycine cleavage system P protein (EC 1.4.4.2)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de glicina, serina e treonina
A0A072UT25	34,821	2	2	11,13	0.564484106	1,02	Deoxycytidylate deaminase (Cytidine deaminase), putative	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de nucleotídeos / Metabolismo de Pirimidina
G7KSE7	29,670	12	9	91,14	0.205711422	1,02	Phosphoglycolate phosphatase (EC 3.1.3.18)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato
I3SH78	25,773	17	6	168,14	0.504707379	1,02	Uncharacterized protein OS=Medicago truncatula PE=2 SV=1 (Actin-7)	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Proteínas do citoesqueleto / proteínas do citoesqueleto eucariótico
W8CYK5	24,112	5	3	57,61	0.391628252	1,02	Cytochrome b6	<i>M. truncatula f. tricycla</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
A0A072TYG3	59,632	11	9	84,28	0.100282612	1,01	Processing peptidase	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Biogênese mitocondrial / Máquinário de importação de proteína mitocondrial / Matriz
A0A072TKG5	55,145	15	5	148,85	0.53272142	1,01	ATP synthase subunit alpha	<i>M. truncatula / M. tribuloides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fosforilação oxidativa / Adaptação ambiental

I3SMB7	22,876	8	6	60,84	0.387637184	1,01	Plastid fibrillin OS=Medicago truncatula GN=MTR_1g075660 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
I3SLY4	41,319	15	7	108,88	0.416073758	1,01	PfkB family carbohydrate kinase OS=Medicago truncatula GN=MTR_4g067310 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de frutose e manose / Metabolismo de amido e sacarose / Metabolismo de aminoácúcar e açúcar nucleotídeos
G7JPH8	43,691	7	5	40,06	0.465218711	1,01	Photosystem II stability/assembly factor HCF136	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
G7K4D7	38,449	2	1	21,69	0.625256156	1,01	Serine-glyoxylate aminotransferase-like protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato / Metabolismo de glicina, serina e treonina / Processos celulares / Transporte e catabolismo / Peroxissomo
G7LIX6	97,796	15	6	131,99	0.67794674	1,01	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lípidos / Ácido Linoléico Metabolismo
A0A072VAV9	60,706	3	2	24,98	0.675980054	1,01	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides
G7JBG6	19,878	2	2	12,05	0.643064491	1,01	Lipid transfer protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
B7FKM8	26,178	8	5	47,56	0.738597172	1,01	Porphobilinogen deaminase OS=Medicago truncatula GN=MTR_4g076600 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de cofatores e vitaminas/ Metabolismo Porfirina e clorofila
G7L002	28,474	7	5	52,53	0.626058446	1,01	Heat shock cognate 70 kDa protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Processamento de Informações Genéticas / Enovelamento, classificação e degradação / Processamento de proteínas no retículo endoplasmático
I3T5G7	33,642	6	4	35,75	0.752001653	1,01	CDSP32 protein (Drought-induced stress protein of 32 kDa) OS=Medicago truncatula GN=MTR_1g026125 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de outros aminoácidos / Metabolismo de Selenocompostos / Homeostase redox celular
E1ANG4	47,212	6	3	69,00	0.812463174	1,01	Chloroplast GS2b-alpha (Chloroplast GS2b-beta) (EC 6.3.1.2) (Glutamine synthetase domain protein)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato Metabolismo Energético / Metabolismo de Nitrogênio / Glutamine synthetase / Metabolismo de aminoácidos / Processamento de Informação Ambiental / Processos celulares / Cell growth and death
I3SP40	35,410	13	9	140,88	0.577190588	1,01	Fructose-1,6-bisphosphatase OS=Medicago truncatula GN=MTR_7g066120 PE=3 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Glicólise / Gliconeogênese / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Metabolismo de Metano
Q2HW07	22,918	4	4	48,28	0.896115212	1,01	Photosystem I reaction center subunit XI (Photosystem I reaction centre, subunit XI PsaL)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo Energético / Fotossíntese
A0A072VWP5	79,850	2	2	16,99	0.864562017	1,00	RING-type E3 ubiquitin transferase (EC 2.3.2.27)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Resposta às bactérias e fungos simbióticos
G7II02	73,685	8	6	58,29	0.850515346	1,00	Malic enzyme	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Ciclo citrato (ciclo TCA) / Metabolismo de piruvato / Metabolismo de glicoxilato e dicarboxilato / Metabolismo Energético / Fixação de carbono em organismos fotossintéticos / Caminhos de fixação de carbono em procariontes / Metabolismo de Metano / Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de metionina e cisteína
G7JAE4	53,180	1	1	5,49	0.891248789	1,00	SPFH/band 7/PHB domain membrane-associated family protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Tráfego de Membranas / Endocitose / Balsa lipídica mediada por endocitose / Endocitose dependente de flotilina/Cromossomo e proteínas associadas / Tipo eucarioto / Proteínas de formação de centrosomos e ciliogênese / Outras proteínas associadas ao centríolo / Exossomo / Proteínas Exossomais/ Proteínas encontradas na maioria dos exossomos
A0A072TNN2	71,771	24	11	162,45	0.794513471	1,00	Lipoxygenase (EC 1.13.11.-)	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de lípidos / Ácido Linoléico Metabolismo
I3RZE6	37,797	7	7	60,99	0.986344786	1,00	Plastid fibrillin OS=Medicago truncatula GN=MTR_5g029590 PE=4 SV=1	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Resposta de defesa / resposta ao estímulo abiótico e biótico
G7IZC8	58,316	7	2	61,70	0.951063722	1,00	Glycoside hydrolase family 1 protein	<i>M. truncatula / M. tribulooides</i>	Metabolismo / Metabolismo de Carboidratos / Biossíntese de outros metabólitos secundários / Biossíntese de fenilpropanóides

**APÊNDICE B – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE
CULTURA E SOLUÇÕES USADAS NA TESE**

SOLUÇÕES DE PRECIPITAÇÃO E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DO TCA

- **Solução de TCA 10 % em acetona β -mercaptoetanol 0,07 %**

O preparo da solução deve ser feito SEMPRE no dia anterior, pois esta solução deve estar gelada na hora em que for utilizada.

- Para o preparo de 100 mL deve-se utilizar:

- ✓ 94 mL de acetona;
- ✓ 9,5 g de TCA;
- ✓ 65,8 μ L de β -mercaptoetanol;

94 mL ----- 100 %

X mL ----- 0,07 % ..

$X \text{ mL} = 0,07 \% \times 94 \text{ mL} / 100 \%$

$X \text{ mL} = 65,8 \mu\text{L de } \beta\text{-mercaptoetanol}$

Procedimento:

1. Pese 9,5 g de TCA;
2. Em uma capela, dissolva 9,5 g de TCA em 94 mL de acetona numa proveta graduada de 100 mL;
3. Com uma micropipeta, aplique 65,8 μ L de β -mercaptoetanol a solução e passe para uma garrafa Schott de 100 mL.
4. Guarde a solução no congelador à temperatura de -20°C , até o uso

- **Solução de Acetona β -mercaptoetanol 0,07 %**

O preparo da solução deve ser feito SEMPRE no dia anterior, pois esta solução deve estar gelada na hora em que for utilizada.

- Para o preparo de 100 mL deve-se utilizar:

- ✓ 99,3 mL de acetona;
- ✓ 70 μ L de β -mercaptoetanol;

100 mL ----- 100 %

X mL ----- 0,07 % ..

$X \text{ mL} = 0,07 \% \times 100 \text{ mL} / 100 \%$

$X \text{ mL} = 70 \mu\text{L de } \beta\text{-mercaptoetanol}$

Procedimento:

1. Em uma capela, colete 99 mL de acetona numa proveta graduada de 100 mL;
2. Com uma micropipeta, aplique 30 μ L de acetona, para completar o volume final de acetona (obs: opcional).
3. Com uma micropipeta, aplique 70 μ L de β -mercaptoetanol à solução e passe para uma garrafa Schott de 100 mL.
4. Guarde a solução no congelador à temperatura de -20°C , até o uso.

- **Tampão de ressolubilização UTDC (Ureia 7M, Tiourea 2M, DTT 1 % e CHAPS 4 %)**

Esta solução é a única que pode ficar fora da geladeira, para evitar a recristalização da ureia. Pode ser utilizada para a confecção de amostras de proteínas para SDS-PAGE 1D e 2D.

Procedimento:

1. Pese os reagentes sólidos como segue ao lado:
2. Coloque-os num Béquer com 1mL de água milli-Q (ou grau HPLC) e mantenha sob agitação moderada, com auxílio de uma barra magnética em placa de agitação e aquecimento, até solubilização completa dos cristais de ureia e tiourea;

Reagente	Conc. final	Peso (g)
Ureia	7M	2,10
Tiourea	2M	0,76
DTT	1 %	0,05
CHAPS	4 %	0,20

Obs: Apenas 1 mL de água é utilizado, pois os sólidos alteram o volume da solução, aumentando o volume da mesma para 3 - 3,5 mL após a solubilização completa dos sólidos.

3. Despeje a solução em uma proveta graduada de 10 mL e acrescente água até o volume de 5 mL.
4. Guarde em uma garrafa Schott de 15 mL, e armazene em temperatura ambiente.

BIBLIOGRAFIA

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M. & THIELLEMENT, H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7, p. 52-54.

RODRIGUES, S.P.; VENTURA, J.A.; ZINGALI, R.B. & FERNANDES, P. M. B. (2009). Evaluation of Sample Preparation Methods for the Analysis of Papaya Leaf Proteins through Two-dimensional Gel Electrophoresis. *Phytochemical. Analysis* 20, p. 456-464.

SARAVANAN, R. & ROSE, J. K. C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, v. 4, p. 2522-2532.

WANG, W.; TAI, F. & CHEN, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *J. Sep. Sci.* 31, p. 2032-2039.

SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA UNIDIMENSIONAL EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE-1D)

Acrilamida/Bis-acrilamida (30 % T, 2,67 % C)

Dissolver 29,2 g de acrilamida e 0,8 g de bis-acrilamida em 100 mL de água milli-Q. Filtrar e armazenar sob refrigeração e ao abrigo da luz (validade: 30 dias).

Ácido clorídrico 6 M

Transferir para um balão volumétrico de 100 mL aproximadamente 40 mL de água. Transferir cuidadosamente 50 mL de ácido clorídrico, sob exaustão e com o auxílio de uma pipeta volumétrica, para o balão e completar o volume com água. Homogeneizar e guardar em frasco âmbar em local seco e protegido de poeira.

Dodecil-sulfato de sódio (SDS) 10 % (m/v)

Dissolver 10 g de SDS para balão volumétrico de 100 mL em água. Completar o volume e armazenar em temperatura ambiente, em local seco e protegido de poeira.

Tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8

Pesar 27,23 g de Tris base (18,15 g/100 mL) e dissolver em 80 mL de água. Ajustar o pH para 8,8 com HCl 6 M. Completar o volume para 150 mL e armazenar sob refrigeração.

Tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

Pesar 6 g de Tris base e dissolver em 60 mL de água. Ajustar o pH para 6,8 com HCl 6 M. Completar o volume para 100 mL e armazenar sob refrigeração.

Tampão de amostra (tampão redutor SDS – Leammlí, 1970)

Preparar o tampão de amostra com a mistura dos seguintes reagentes:

- ✓ Água deionizada: 3,55 mL;

- ✓ Tampão Tris HCl 0,5 M, pH 6,8: 1,25 mL;
- ✓ Glicerol: 2,5 mL;
- ✓ SDS 10 % (m/v): 2,0 mL;
- ✓ Azul de bromofenol 0,5 % (m/v): 0,2 mL.

Homogeneizar e armazenar em temperatura ambiente. Adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol para 950 µL de tampão de amostra para cada amostra. A adição de 2-mercaptoetanol deve ser feita somente antes do uso. Dilua o tampão na amostra na proporção de 1:2 (v/v).

Tampão para corrida (10x), pH 8,3

Preparar o tampão para corrida com a mistura dos seguintes reagentes:

- ✓ Tris base: 30,3 g;
- ✓ Glicina: 144 g;
- ✓ SDS: 10 g.

Dissolver e avolumar para 1000 mL com água. Não ajustar o pH com ácido ou base. Armazenar sob refrigeração. Em caso de precipitação, deixar à temperatura ambiente antes do uso. Diluir 50 mL do tampão com 450 mL de água para cada corrida com dois géis e 100 mL de solução estoque para 900 mL de água para corrida com quatro géis.

Persulfato de amônio (PSA) 10 % (m/v)

Pesar 100 mg de APS e dissolver em 1 mL de água. Preparar somente antes do uso. Alternativamente, alíquotas da solução de APS 10 % podem ser armazenadas sob congelamento.

Solução de revelação – Comassie Blue Silver

Para o preparo de 1L da solução reveladora, proceder com a mistura dos reagentes abaixo:

- ✓ Corante de Comassie blue G 250: 1,2 mg (para concentração final de 0,12 %);
- ✓ Ácido fosfórico (H₂PO₄) 85 %: 117,65 mL (para uma concentração final de 10 %);
- ✓ Sulfato de amônio: 100 mg (para uma concentração final de 10 %);
- ✓ Metanol: 200 mL (para uma concentração final de 20 %);
- ✓ Água Milli-Q: 781,15 mL;

Em um a chapa de agitação, acrescente 117,65 mL de ácido fosfórico em um frasco âmbar de 1 L devidamente embalado com papel alumínio e acrescente, aos poucos, os 100 mg de sulfato de amônio e deixe solubilizar com a ajuda de uma barra magnética. Após a solubilização, acrescente cuidadosamente 781,15 mL água Milli-Q, obtendo assim 800 mL de volume final; deixe solubilizar completamente o sulfato de amônio. Finalize a solução acrescentando 200 mL de Metanol e deixe em agitação até o dia seguinte. Guarde a solução em local protegido da luz e poeira. A solução tem validade de 6 meses.

BIBLIOGRAFIA:

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

SOLUÇÕES USADAS NA DIGESTÃO TRÍPTICA EM GÉIS DE ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA PARA ELECTROSPRAY

Solução 10X concentrada de Bicarbonato de Amônio (250 mM NH₄HCO₃)

1. Pese **0,988 g** de Bicarbonato de amônio e solubilize em 45 mL de água grau HPLC;
2. Passe a solução para uma proveta graduada (ou balão volumétrico de 50 mL) e avolume para **50 mL com água grau HPLC**;
3. Guarde em garrafa Schott de 50 mL em local limpo protegido de poeiras e partículas;

Cálculos:

$$0,250 \text{ M} = X \text{ g} / 79,06 \times 0,050 \text{ L}$$

$$X \text{ g} = 0,250 \times 3,953$$

$$X \text{ g} = 0,988 \text{ g de } \text{NH}_4\text{HCO}_3$$

Solução de 25 mM de Bicarbonato de Amônio

1. Pipete **10 mL** da solução estoque 10X concentrada de Bicarbonato de Amônio (250 mM NH_4HCO_3) para uma proveta graduada de 100 mL;
2. Avolume para **100 mL com água grau HPLC**;
3. Guarde em garrafa Schott de 100 mL em local limpo protegido de poeiras e partículas;

Cálculos:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$250 \text{ mM} \times V_i = 25 \text{ mM} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_i = 2500 \text{ mM.mL} / 250 \text{ mM}$$

$$V_i = 10 \text{ mL de } 250 \text{ mM } \text{NH}_4\text{HCO}_3$$

Solução de 50 % de Acetonitrila em 25 mM de Bicarbonato de Amônio

1. Use **50 mL da solução de 25 mM de Bicarbonato de Amônio** e solubilize em **50 mL de acetonitrila 100 %**;
2. Guarde em garrafa Schott de 100 mL em local limpo e protegido de poeiras e partículas;

Solução de 50 % de Acetonitrila em 5 % de ácido trifluoroacético (TFA)

Para uma solução de 100 mL:

1. Solubilize **45 mL de água grau HPLC** em **50 mL de acetonitrila**;
2. Acrescente **5 mL de ácido trifluoroacético**;
3. Guarde em garrafa Schott de 100 mL em local limpo e protegido de poeiras e partículas;

Solução de 0,1 % de ácido Fórmico

1. Pipete **10 µL** de ác. Fórmico em uma garrafa Schott de 25 mL;
2. Pipete **9,90 mL de água grau HPLC**;
3. Guarde em local limpo protegido de poeiras e partículas;

Cálculos:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$100 \% \times V_i = 0,1 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_i = 1 \% . \text{mL} / 100 \%$$

$$V_i = 0,01 \text{ mL} .; 10 \text{ µL de ác. Fórmico}$$

6. BIBLIOGRAFIA

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. e Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Analytical Chemistry 68:850-858 (1996).

SOLUÇÕES USADAS NA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS POR TRIS-MG/NP-40 PARA DEPLEÇÃO DE RUBISCO COM SULFATO DE PROTAMINA.

Solução extratora de Tris-Mg/NP-40.

Esta solução contém 0.5 M Tris-HCl, pH 8.3, 2 % v/v NP-40, 20 mM MgCl₂, 2 % v/v β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF e 1 % p/v PVPP.

Cálculos:

Solução estoque de Tris-Mg/NP-40

✓ $0,5 \text{ M} = X \text{ g} / 121,14 \times 0,200 \text{ L}$

$X \text{ g} = 0,5 \text{ M} \times 24,228$

$X \text{ g} = 12,114 \text{ g de Tris Base}$

✓ $0,02 \text{ M} = X \text{ g} / 95,211 \times 0,200 \text{ L}$

$X \text{ g} = 0,02 \text{ M} \times 19,0422$

$X \text{ g} = 0,381 \text{ g de MgCl}_2 \therefore \mathbf{381 \text{ mg MgCl}_2}$

✓ $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

$100 \times V_i = 2 \times 200 \text{ mL}$

$V_i = 400 / 100 \therefore V_i = \mathbf{4 \text{ ml de NP-40}}$

✓ $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

$100 \times V_i = 2 \times 200 \text{ mL}$

$V_i = 400 / 100 \therefore V_i = \mathbf{4 \text{ ml de } \beta\text{-mercaptoetanol}}$

Cálculos:

1mM de PMSF (Inibidor de protease)

1 % de PVPP (Clean-up fenólicos)

CRÍTICO: Somente quando for usar:

✓ $0,001 \text{ M} = X \text{ g} / 174,194 \times 0,100 \text{ L}$

$X \text{ g} = 0,001 \text{ M} \times 17,4194$

$X \text{ g} = 0,0174 \text{ g de PMSF} \therefore \mathbf{17,4 \text{ mg PMSF}}$

✓ $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

$100 \times V_i = 1 \times 1,5 \text{ ml}$

$V_i = 1,5 / 100 \therefore V_i = \mathbf{15 \text{ mg de PVPP}}$

Reagentes	Valores (V. final de 200 mL)
Tris Base	12,114 g
MgCl ₂	0,381 g
NP-40	4 mL
β-mercaptoetanol	4 mL
Opcional	(Ler observação)
PMSF	17,4 mg
PVPP	15 mg

- 1) Preparar a solução extratora estoque de Mg/NP-40 pesando **12,114 g de Tris Base** e solubilizar em **100 mL** de água milli-Q (ou HPLC) e ajustar o pH com HCl para 8.3.
- 2) Solubilizar **381 mg de MgCl₂** na solução de Tris HCL 8.3 e acrescentar **4 mL de NP-40** e **4 mL de β-mercaptoetanol**.
- 3) Avolumar a solução para 200 mL de água milliQ (ou HPLC). Guardar no congelador em temperatura de -20° C.

Obs:

- ✓ Quando for executar o protocolo de extração de proteínas por Tris-Mg/NP-40 separar **100 ml** da solução estoque de Tris-Mg/NP-40 e acrescentar **17,4 mg de PMSF** e **utilizar imediatamente a solução. (CRÍTICO: o PMSF em solução aquosa é estável por apenas 35 minutos a 25°C , a solução e as amostras DEVEM FICAR o máximo possível no gelo).**
- ✓ Os 15 mg de PVPP devem ser acrescentados **insolúveis (em pó)** aos 300 mg de tecido vegetal no momento da maceração com nitrogênio líquido.

Solução de TCA 10 % em acetona β-mercaptoetanol 0,07 %

O preparo da solução deve ser feito SEMPRE no dia anterior, pois esta solução deve estar gelada na hora em que for utilizada.

- Para o preparo de 100 mL deve-se utilizar:

- ✓ 94 mL de acetona;
- ✓ 9,5 g de TCA;
- ✓ 65,8 μL de β-mercaptoetanol;

94 mL ----- 100 %

X mL ----- 0,07 % ∴

$X \text{ mL} = 0,07 \% \times 94 \text{ mL} / 100 \%$

$X \text{ mL} = 65,8 \mu\text{L de } \beta\text{-mercaptoetanol}$

Procedimento:

5. Pese 9,5 g de TCA;

6. Em uma capela, dissolva 9,5 g de TCA em 94 mL de acetona numa proveta graduada de 100 mL;
7. Com uma micropipeta, aplique 65,8 µL de β-mercaptoetanol a solução e passe para uma garrafa Schott de 100 mL.
8. Guarde a solução no congelador à temperatura de – 20 °C , até o uso

Solução de Acetona β-mercaptoetanol 0,07 %

O preparo da solução deve ser feito SEMPRE no dia anterior, pois esta solução deve estar gelada na hora em que for utilizada.

- Para o preparo de 100 mL deve-se utilizar:

- ✓ 99,3 mL de acetona;
- ✓ 70 µL de β-mercaptoetanol;

100 mL -----	100 %	
X mL -----	0,07 %	∴
$X \text{ mL} = 0,07 \% \times 100 \text{ mL} / 100 \%$		
$X \text{ mL} = 70 \text{ µL de } \beta\text{-mercaptoetanol}$		

Procedimento:

5. Em uma capela, colete 99 mL de acetona numa proveta graduada de 100 mL;
6. Com uma micropipeta, aplique 30 µL de acetona, para completar o volume final de acetona (obs: opcional).
7. Com uma micropipeta, aplique 70 µL de β-mercaptoetanol à solução e passe para uma garrafa Schott de 100 mL.
8. Guarde a solução no congelador à temperatura de – 20 °C , até o uso.

Tampão de ressolubilização UTDC (Ureia 7M, Tioureia 2M, DTT 1 % e CHAPS 4 %)

Esta solução é a única que pode ficar fora da geladeira, para evitar a recristalização da ureia. Pode ser utilizada para a confecção de amostras de proteínas para SDS-PAGE 1D e 2D.

Procedimento:

5. Pese os reagentes sólidos como segue ao lado:
6. Coloque-os num Béquer com 1mL de água milli-Q (ou grau HPLC) e mantenha sob agitação moderada, com auxílio de uma barra magnética em placa de agitação e aquecimento, até solubilização completa dos cristais de ureia e tioureia;

Reagente	Conc. final	Peso (g)
Ureia	7M	2,10
Tioureia	2M	0,76
DTT	1 %	0,05
CHAPS	4 %	0,20

Obs: Apenas 1 mL de água é utilizado, pois os sólidos alteram o volume da solução, aumentando o volume da mesma para 3 - 3,5 mL após a solubilização completa dos sólidos.

7. Despeje a solução em uma proveta graduada de 10 mL e acrescente água até o volume de 5 mL.

Guarde em uma garrafa Schott de 15 mL, e armazene em temperatura ambiente.

Solução estoque de Sulfato de Protamina 1 %

Para o preparo da solução basta solubilizar **10mg de Sulfato de Protamina em 1 mL de água milli-Q**. Solução comercial na concentração de 1 % pode ser obtida em ampolas de vidro contendo volume de 5 MI (Protamina 1000® Valeant Farmacêutica do Brasil Ltda - 50 mg por ampola). Para a precipitação da RuBisCo, pode ser feita diluições entre 0,02 % até 0,12 %. Resultados eficientes puderam ser vistos utilizando 0,1 % de Sulfato de Protamina (diluição 1:10 na amostra).

BIBLIOGRAFIA

SUN TAE KIM, KYU SEONG CHO, YU SIN JANG, KYU YOUNG KANG (2001) Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* 2001, 22, 2103–2109

ROSILENE OLIVEIRA MESQUITA, EDUARDO DE ALMEIDA SOARES, EVERALDO GONÇALVES DE BARROS AND MARCELO EHLERS LOUREIRO (2012). Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: Improvements in identification of new and low-abundance proteins. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1 (suppl), 353-361 (2012).

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M. & THIELLEMENT, H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7, p. 52-54.

RODRIGUES, S.P.; VENTURA, J.A.; ZINGALI, R.B. & FERNANDES, P. M. B. (2009). Evaluation of Sample Preparation Methods for the Analysis of Papaya Leaf Proteins through Two-dimensional Gel Electrophoresis. *Phytochemical. Analysis* 20, p. 456-464.

SARAVANAN, R. & ROSE, J. K. C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, v. 4, p. 2522-2532.

WANG, W.; TAI, F. & CHEN, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *J. Sep. Sci.* 31, p. 2032-2039.

MEIOS HIDROPÔNICOS E SÓLIDOS PARA CULTIVO DE *Medicago sativa* L.

Preparo de Ágar 1,2 % (Meio de cultura para germinação)

Este meio é utilizado para a germinação de sementes de alfafa e arroz, previamente desinfetadas. Para preparar a solução, basta acrescentar 1,2 g de Ágar bacteriológico em pó em 100 mL de água destilada, e esterilizar em autoclave por 15 min á 121 °C em 1 atm.

Procedimento:

1. Ligar a balança e separar o material.
2. Colocar a plaquinha de pesar na balança, esperar estabilizar o peso, e em seguida descontar (tarar) o peso da plaquinha.
3. Colocar o Ágar em pó na plaquinha, com o auxílio de uma espátula, até o valor desejado.
4. Passar o Ágar em pó para uma garrafa Schott de 250 mL e acrescentar 100 mL de água destilada.
5. Solubilizar bem o ágar com o auxílio de uma barra magnética e chapa de aquecimento e agitação.
6. Esterilizar em autoclave por 15 min á 121 °C em 1 atm.

Preparo do meio Hoagland (Meio hidropônico)

Este meio é utilizado o crescimento de plântulas de alfafa e arroz, previamente desinfetadas e germinadas em meio ágar 1,2 %. O mesmo pode ser preparado de duas formas: Uma é pelo meio em pó, comercializado pela Sigma (H2395) e a outra é acrescentando um por um macro e micronutrientes da confecção do meio. Após a etapa de confecção do meio o mesmo é esterilizado em autoclave por 15 min á 121 °C em 1 atm.

- ✓ **Meio Hoagland Noº. 2 Basal Salt Mixture - Sigma – H2395. (Com nitrogênio)**

Para preparar a solução, basta acrescentar 1,6 g de Hoagland em pó em 1000 mL de água destilada.

Procedimento:

1. Ligar a balança e separar o material.
2. Colocar a plaquinha de pesar na balança, esperar estabilizar o peso, e em seguida descontar (tarar) o peso da plaquinha.
3. Colocar o Hoagland em pó na plaquinha, com o auxílio de uma espátula, até o valor desejado.
4. Passar o Hoagland em pó para uma garrafa Schott de 1000 mL e acrescentar 800 mL de água destilada.
5. Solubilizar bem o Hoagland em pó com o auxílio de uma barra magnética e chapa de aquecimento e agitação.
6. Verter para uma proveta graduada de 1 L e avolumar para 1000 mL com água destilada. Verter novamente para a garrafa Schott de 1000 mL.
7. Esterilizar em autoclave por 15 min á 121 °C em 1 atm.

✓ **Meio Hoagland com fonte de nitrogênio**

Procedimento:

1. Para a confecção do meio, basta acrescentar em uma garrafa Schott de 1000 mL, contendo 800 mL de água destilada, as soluções estoque de nutrientes, pipetando os volumes citados na tabela abaixo:

Composição do meio Hoagland com fonte de nitrogênio

Nutrientes	Concentração	Volume (para 1 L)
KH ₂ PO ₄	1M	1 mL
KNO ₂	1M	5 mL
Ca(NO ₃) ₂	1M	4 mL
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1M	2 mL
Solução de FeCl ₂ .6H ₂ O + NaH ₂ EDTA	NaH ₂ EDTA 1,21 % e 0,6 % de FeCl ₂ .6H ₂ O	2 mL
Solução de Micronutrientes*	1000x (Traço)	2 mL

*

H ₃ BO ₃
MnCl ₂ . 4H ₂ O
ZnSO ₄ . 7H ₂ O
CuSO ₄ . 5H ₂ O
NaMnO ₄ . 2H ₂ O

2. Após solubilização dos componentes, verter a solução para uma proveta graduada de 1L (ou balão volumétrico) e avolumar até 1000 mL.
3. Verter novamente para a garrafa Schott de 1000 mL.
4. Esterilizar em autoclave por 15 min á 121 °C em 1 atm.

Preparo das soluções estoque de nutrientes:

Seguem os cálculos para o preparo das soluções estoque para cada nutriente do meio Hoagland.

Solução de KH₂PO₄ 1M:

$$1M = Xg/136,086 \times 0,1 L \therefore Xg = \underline{13,61 \text{ g de KH}_2\text{PO}_4}$$

Solução de KNO₂ 1M:

$$1M = Xg/101,103 \times 0,1 L \therefore Xg = \underline{10,11 \text{ g de KNO}_2}$$

Solução de Ca(NO₃)₂ 1M:

$$1M = Xg/174,1 \times 0,1 L \therefore Xg = \underline{17,41 \text{ g de Ca(NO}_3)_2}$$

Solução de MgSO₄ . 7H₂O 1M:

$$1M = Xg/120,37 \times 0,1 L \therefore Xg = \underline{12,04 \text{ g de MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$$

Solução estoque de Nutrientes	Peso em g (para 100 mL cada)
Solução de KH ₂ PO ₄ 1M	13,61
Solução de KNO ₂ 1M	10,11
Solução de Ca(NO ₃) ₂ 1M	17,41
Solução de MgSO ₄ . 7H ₂ O 1M	12,04
Solução de Micronutrientes (1000x)	Peso em g (para 100 mL)
H ₃ BO ₃	0,200
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,234
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,088
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,020
NaMnO ₄ . 2H ₂ O	0,026
Solução de FeEDTA	Peso em g (para 100 mL)
Na ₂ H ₂ EDTA	1,21
FeCl . 6H ₂ O	0,60

✓ **Meio Hoagland sem fonte de nitrogênio****Procedimento:**

1. Para a confecção do meio, basta acrescentar em uma garrafa Schott de 1000 mL, contendo 800 mL de água destilada, as soluções estoque de nutrientes, pipetando os volumes citados na tabela abaixo:

Composição do meio Hoagland sem fonte de nitrogênio

Nutrientes	Concentração	Volume (para 1 L)
KH ₂ PO ₄	1M	1 mL
K ₂ HPO ₄	1M	1 mL
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1M	2 mL
Solução de FeCl.6H ₂ O + Na ₂ H ₂ EDTA	Na ₂ H ₂ EDTA 1,21 % e 0,6 % de FeCl.6H ₂ O	1 mL
Solução de Micronutrientes*	1000x (Traço)	1 mL

*

H ₃ BO ₃
MnCl ₂ . 4H ₂ O
ZnSO ₄ . 7H ₂ O
CuSO ₄ . 5H ₂ O
NaMnO ₄ . 2H ₂ O

2. Pesar 0,172g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e acrescentar à solução, solubilizando com o auxílio de uma barra magnética e chapa de agitação.
3. Após solubilização dos componentes, verter a solução para uma proveta graduada de 1L (ou balão volumétrico) e avolumar até 1000 mL.
4. Verter novamente para a garrafa Schott de 1000 mL.
5. Esterilizar em autoclave por 15 min á 121°C em 1 atm.
6. Caso fique turvo, acrescentar HCL 0,1 N estéril até clarear.

Preparo das soluções estoque de nutrientes:

Seguem os cálculos para o preparo das soluções estoque para cada nutriente do meio Hoagland.

Solução de KH_2PO_4 1M:

$$1\text{M} = \text{Xg}/136,086 \times 0,1 \text{ L} \therefore \text{Xg} = \underline{13,61 \text{ g de } \text{KH}_2\text{PO}_4}$$

Solução de K_2HPO_4 1M:

$$1\text{M} = \text{Xg}/174,180 \times 0,1 \text{ L} \therefore \text{Xg} = \underline{14,42 \text{ g de } \text{KNO}_2}$$

Solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M:

$$1\text{M} = \text{Xg}/120,37 \times 0,1 \text{ L} \therefore \text{Xg} = \underline{12,04 \text{ g de } \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}$$

Solução estoque de Nutrientes	Peso em g (para 100 mL cada)
Solução de KH_2PO_4 1M	13,61
Solução de K_2HPO_4 1M	14,42
Solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M	12,04
Solução de Micronutrientes (1000x)	Peso em g (para 100 mL)
H_3BO_3	0,200
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,234
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,088
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,020
$\text{NaMnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,026
Solução de FeEDTA	Peso em g (para 100 mL)
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$	1,21
$\text{FeCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,60

BIBLIOGRAFIA

HOAGLAND, D. R. AND ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Berkeley, Circ 347: 1-39, 1950.

SOMASEGARAN, P. AND HOBEN, J. H. Handbook for Rhizobia: methods in legume-rhizobium technology. Springer-Verlag ISBN 0387941347, 9780387941349, 1994.

MEIOS DE CULTURA USADOS PARA O CULTIVO DA BACTÉRIA *Ensifer meliloti*

Meio de Cultura DYGS

Colocar aproximadamente 500 ml de água destilada, em um balão de fundo chato de 1000 ml

Adicionar os reagentes abaixo, agitando entre cada adição:

- 2,0 g de Glicose
- 2,0 g de Ácido Málico
- 1,5 g de Peptona Bacteriológica
- 2,0 g de Extrato de Levedura
- 0,5 g de Fosfato de Potássio Dibásico
- 0,5 g de Sulfato de Magnésio Hidratado
- 1,5 g de Ácido Glutâmico

Completar o volume a 1000 ml com água destilada

Ajustar pH com KOH solução à 10 % e/ou H₂SO₄ solução à 5 %

Preparar o meio sólido: 15 g por litro para meio de cultura DYGS

Autoclavar 15 minutos a 120 °C.

Meio de Cultura TY

Tomar um Erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml, colocar 500 ml de água destilada e adicionar os seguintes reagentes:

- 5 g de Triptona
- 3 g de Extrato de Levedura
- 0,9 g de Cloreto de Cálcio Dihidratado
- Completar com água destilada para 1000 ml

Autoclavar 15 minutos a 120 °C.

Meio de Cultura 79 básico e variações

Este meio é utilizado para o crescimento de *Rhizobium*, porém se for para crescimento lento usar Manitol como fonte de Carbono. E para crescimento rápido usar Açúcar Cristal como fonte de Carbono.

Adicionar aproximadamente 500 ml de água destilada em um balão de fundo chato ou Erlenmeyer de 1000 ml e adicionar os reagentes abaixo relacionados, na ordem que se apresentam, agitando levemente entre uma adição e outra:

- 10 g de Açúcar Cristal ou Manitol
- 1 ml de solução de Fosfato de Potássio Dibásico
- 4 ml de solução de Fosfato de Potássio Monobásico
- 2 ml de solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- 1 ml de solução de Cloreto de Sódio
- 0,4 g Extrato de Levedura

Transferir para a proveta e completar o volume a 1000 ml com água destilada,

Retornar para o balão e ajustar o pH para 6,8-7,0 com solução de KOH a 10 % e/ou H₂SO₄ a 5 %,

OBS: Para meio Sólido, adicionar ágar, nas seguintes quantidades:

1 g por litro para meio semi-sólido

15 g por litro para meio sólido

Autoclavar 15 minutos a 120 °C.

Corantes incorporados no meio 79:

- **Meio 79 com vermelho congo**

Por solução 0,25 % de vermelho do congo (25 ppm), usando 10 ml desta solução por litro de meio de cultura. Preparo da solução estoque de corante: 0,5 g dissolvidos em 100 mL de H₂O.

- **Meio 79 com Azul de Bromotimol**

Por solução de 0,5 % de Azul de Bromotimol, usando 5 mL desta solução por litro de meio de cultura. Preparo da solução estoque de corante: 0,5 g dissolvidos em 100 mL de etanol comercial (96,2 %).

- **Meio 79 (50 % de sacarose)**

Reduzir a quantidade de sacarose de 10 g para 5 g, por litro de meio de cultura.

Meio Glicose e Peptona com marcador de púrpura de bromocressol 100 ppm.

Tomar um Erlenmeyer ou balão de fundo chato de 1000 ml, colocar 500 ml de água destilada e adicionar os seguintes reagentes:

- 5 g de Glicose
- 10 g de Peptona
- 15 g de Agar

Completar com água destilada para 1000 ml

Por solução de 1 % Púrpura de Bromocressol (100 ppm), usando 10 mL desta solução por litro de meio. Preparo da solução estoque de corante: 1g dissolvido em 100 mL de etanol comercial (96,2 %). Autoclavar o material preparado por 15 minutos a 120 °C.

MEIO MINERAL – MM

- 0,5 g de K₂HPO₄
- 1,0 g de NH₄Cl
- 2,0 g de Na₂SO₄
- 2,0 g de KNO₃
- 0,5 g de MgSO₄
- Vestígios de FeSO₄;
- 1,0 ml de solução de micronutrientes. A solução de micronutrientes contem:
 - 0,5 g de H₃BO₃
 - 0,04 g de CuSO₄ 5H₂O
 - 0,1 g de KI
 - 0,2 g de FeCl₃
 - 0,4 g de MnSO₄ H₂O
 - 0,2 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O
 - 0,4 g de ZnSO₄ 7H₂O

Avolumar para 1000 L de água destilada.

BIBLIOGRAFIA

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

SOMASEGARAN, P. AND HOBEN, J. H. Handbook for Rhizobia: methods in legume-rhizobium technology. Springer-Verlag ISBN 0387941347, 9780387941349, 1994.

APÊNDICE C – Curvas de crescimento da Cepa BR 7411 e curva de calibração.

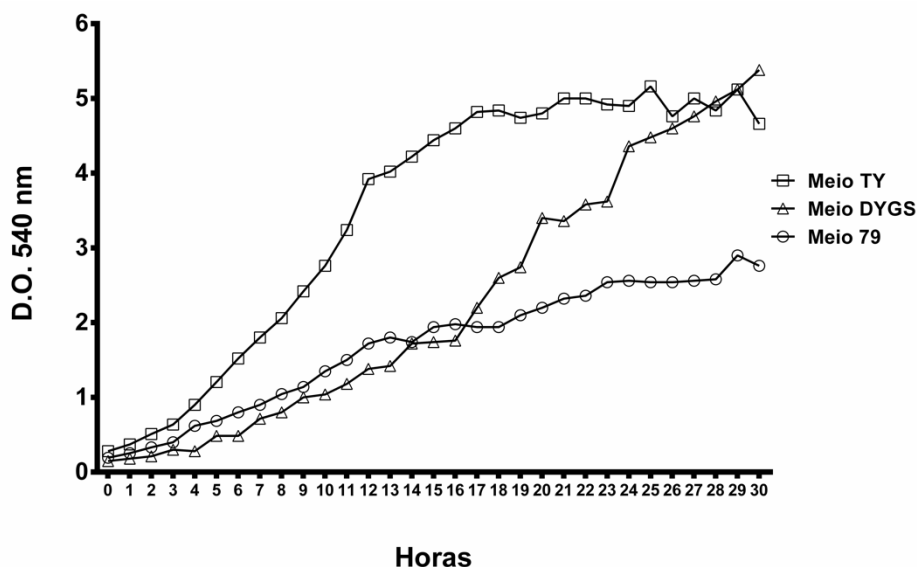


Figura C1. Perfil de crescimento da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em 3 meios de cultivo diferentes, 79, DYGS e TY. O crescimento foi acompanhado por 30 horas através da determinação da D.O. em espectrofômetro usando o comprimento de onda de 540 nm.

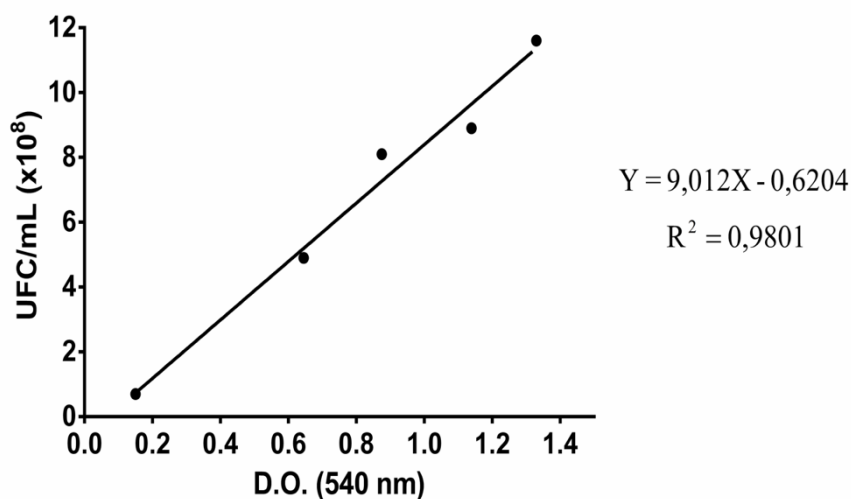


Figura C2. Curva de calibração de BR 7411 em meio 79. Determinação da concentração para padronização do inóculo da cepa BR 7411 de *Ensifer meliloti* em plantas de *Medicago sativa* L.



Contents lists available at ScienceDirect

Micron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micron

Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Medicago sativa* L. by fluorescence microscopy



Wilber S. Alves^{a,b,*}, Evelin A. Manoel^c, Noemi S. Santos^a, Rosane O. Nunes^a, Giselli C. Domiciano^a, Marcia R. Soares^a

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ—Centro de Tecnologia, Bloco A, Cidade Universitária, Cep: 21.941-909, Rio de Janeiro, Brazil

^b Programa Químico de Petróleo e Biocombustíveis PRP-01, Instituto de Química, UFRJ—Centro de Tecnologia, Bloco A, Cidade Universitária, Cep: 21.941-909, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFRJ—Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, Cidade Universitária, Cep: 21.941-902, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2016

Received in revised form 16 January 2017

Accepted 16 January 2017

Available online 19 January 2017

Keywords:

Crioula

Conjugation

Fluorescence microscopy

Medicago sativa L.

Phytoremediation

Polycyclic aromatic hydrocarbons

Trichomes

ABSTRACT

Green technologies, such as phytoremediation, are effective for removing organic pollutants derived from oil and oil products, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Given the increasing popularity of these sustainable remediation techniques, methods based on fluorescence microscopy and multiphoton microscopy for the environmental monitoring of such pollutants have emerged in recent decades as effective tools for phytoremediation studies aimed at understanding the fate of these contaminants in plants. However, little is known about the cellular and molecular mechanisms involved in PAH uptake, responses and degradation by plants. Thus, the present study aimed to detect the location of pyrene, anthracene and phenanthrene using fluorescence microscopy techniques in shoots and roots of *Medicago sativa* L. (alfalfa) plants grown in artificially contaminated soil (150 ppm PAHs) for 40 days. Leaflet and root samples were then collected and observed under a fluorescence microscope to detect the presence of PAHs in various tissues. One important finding of the present study was intense fluorescence in the glandular secreting trichomes (GSTs) of plants grown in contaminated soil. These trichomes, with a previously unknown function, may be sites of PAH conjugation and degradation.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) derived from oil and oil products are pollutants in biological systems with mutagenic and tumor-promoting properties (Su and Zhu, 2008; Meire et al., 2007; Gao et al., 2010). Environmental accidents caused by the oil industry are a concern of the agricultural sector and environmental agencies. Therefore, the search for technological alternatives for the remediation and monitoring of contaminated areas has increased considerably in recent decades.

Due to its efficiency in soil remediation, low cost, easy access and aesthetic value, causing minimal disruption to local activities, phytoremediation stands out as a sustainable technology and future potential tool for the oil industry (Pilon-Smits, 2005; Landmeyer,

2012). Indeed, the increasing popularity of this technology is corroborated by many authors (Cunningham and Ow, 1996; Salt et al., 1998), and recent studies highlight the use of plants, including *Medicago sativa* L., *Lolium perenne*, *Secale cereale* L., *Sorghum bicolor* L., Moench, *Zea mays* L., *Trifolium pratense* L. and *Festuca arundinacea*, for phytoremediation of contaminated soils (Muratova et al., 2012; Zhou et al., 2009 and Gao et al., 2010). Specifically, plants of the genera *Festuca* and *Medicago* have been shown potential for the remediation of PAH-contaminated environments (Liu et al., 2012, 2014; Xiao et al., 2015). Among these species, *M. sativa* L. is valuable because of its high remediation potential (Kirk et al., 2005; Fan et al., 2008 and Wang et al., 2012a,b) and ability to remove aromatic compounds, including phenol (Flocco et al., 2002) and benzene (Ferro et al., 1997).

In contrast to animals and microorganisms, little is known about the cellular and molecular mechanisms involved in the uptake of, response to and degradation of PAHs by plants (Alkio et al., 2005). Thus, understanding the fate of these contaminants in plants is necessary for clarifying these mechanisms and is a key for phytoremediation studies.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ—Centro de Tecnologia, Bloco A, Cidade Universitária, Cep: 21.941-909, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: Wilber.sa@hotmail.com (W.S. Alves).

PAH detection in plant tissues is often based on destructive methods associated with extraction using toxic organic solvents, preparative chromatography and more robust chromatographic methods, including high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC) (Banjoo and Nelson 2005; Lau et al., 2010 and Wang et al., 2012a,b). However, these methods are expensive and require long operating times as well as samples with detectable PAH concentrations. Thus, rapid methods for monitoring contaminants in plants using fluorescence microscopy (FM) (Alkio et al., 2005 and Wang et al., 2010) and multiphoton microscopy (Wild et al., 2007) techniques have emerged as effective alternatives for visualizing the *in situ* uptake, movement, storage and degradation of organic compounds and chemicals in plants.

Pioneering studies, including those on air-to-leaf transfer of phenanthrene in maize and spinach (Wild et al., 2006), phenanthrene and anthracene root uptake by maize and wheat (Wild et al., 2005a) and anthracene, fluoranthene and phenanthrene photodegradation rates on and within maize leaves (Wild et al., 2005b), have been conducted, providing valuable data in the field of PAH phytoremediation. However, there are few reports that discuss the use of fluorescence microscopy to detect PAHs, which has resulted in a large knowledge gap that must be addressed.

Thus, the present study aimed to utilize fluorescence microscopy to detect and locate PAHs in the shoots and roots of *M. sativa* L. plants grown in soil artificially contaminated with pyrene, anthracene and phenanthrene.

2. Materials and methods

2.1. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

Because the molecular structure of these compounds is formed by aromatic rings, these pollutants autofluoresce at blue wavelengths (with $\lambda_{Em} \sim 400$ nm) when excited by ultraviolet light. This characteristic was used in this study to detect PAHs in alfalfa plants. Three types of PAHs were examined: phenanthrene (CAS Number 85-01-8/PubChem Substance ID 24898161), pyrene (CAS Number 129-00-0/PubChem Substance ID 24888024) and anthracene (CAS Number 120-12-7/PubChem Substance ID 24848489). The PAHs were prepared at a 98% concentration by SIGMA-ALDRICH™, and all three are substances that pose a risk to the environment and are considered priority pollutants (USEPA, 2000).

2.2. Fluorescence emission spectrum of PAHs

To analyze the fluorescence emission spectrum of each PAH, a SpectraMax M2e Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) was used with the following specifications of fluorescence photometric performance: dual monochromators with 1-nm increments, λ_{ex} at 250–850 nm, λ_{em} at 250–850 nm, and a bandwidth (λ_{ex} and λ_{em}) of 9.9 nm. Spectrum were obtained using SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices). The assay was performed according to the method by Alkio et al. (2005) and Wang et al. (2010), with modifications. Standard solutions in acetonitrile at a final concentration of 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm) were prepared in 5-mL volumetric flasks for each PAH. PAH solubilization was aided by an ultrasonic bath set at 30 °C for 15 min. To obtain the PAH emission spectrum, 400 μL of each PAH solution was excited at 254 nm, and the emission spectrum was scanned at 340–500 nm.

2.3. Soil contamination

This assay followed the method of Brinch et al. (2002), with modification. A sample of 50 g of soil was sieved through a 2-mm mesh sieve and then mixed with 50 g organic fertilizer and 100 g vermiculite (previously sieved through a 2-mm mesh sieve).

The substrate was transferred to a drying oven at 30 °C for 24 h, split into two 100-g portions in 500-mL Erlenmeyer flasks and sterilized by autoclaving for 40 min (1 atm; 121 °C). After sterilization, a 25% fraction of each substrate (25 g) was placed into two 200-mL sterile beakers. One of those fractions was contaminated with 50 mL of an acetone solution containing 50 ppm of each PAH (phenanthrene, anthracene and pyrene) under sterile conditions (total PAH = 150 ppm); the other 25% fraction was added to 50 mL acetone without PAH (total PAH = 0 ppm) as a control. The fractions containing solvent were vigorously homogenized every 2 h for 8 h using a sterile glass rod and then allowed to stand under laminar flow for another 8 h until the organic solvent evaporated. On the following day, each fraction with contaminants was added to the respective 75% fraction (the remaining 75 g, without solvent), totaling two 100-g portions of substrate with predefined PAH concentrations (control and 150 ppm, respectively). The samples were homogenized by stirring the Erlenmeyer flasks. These substrates were used for growing alfalfa seedlings.

2.4. Cultivation of *M. sativa* L.

The surface of alfalfa seeds (cv. Crioula, purchased from the Brazilian Agricultural Research Corporation – *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* – EMBRAPA) was sterilized, and germination was induced according to the method by Silo-Suh et al. (2002). Seedlings were separated for sowing in contaminated and control substrates under aseptic conditions after seed emergence. Using an analytical balance, a 50-g sample of substrate was weighed and transferred to four glass jars (250 mL) with sterile screw caps. Two jars were used for each condition (control and 150 ppm total PAHs), and each jar was cultivated with five *M. sativa* L. seedlings. The plants were cultivated at 28 °C in a Biological Oxygen Demand (B.O.D.) incubator with a 14/10-h (light/dark) photoperiod. Each plant was watered with 1.5 mL Hoagland's solution (Hoagland and Arnon, 1950) every 3 days until completing the experiment 40 days after sowing (DAS). For spectrofluorometric analyses and PAH detection by fluorescence microscopy, leaves and roots was collected at 40 DAS.

2.5. Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy was performed according to the method of Alkio et al. (2005), with modification, to detect the presence and location of PAHs in the shoots and roots of alfalfa plants. Leaves and roots of alfalfa plants grown in the presence or absence of 150 ppm total PAHs for 40 DAS were gently grasped (at the petiole for leaves and at the root crown for roots) with a stainless steel forceps and gently detached from the plant. After this step, the samples were rinsed in distilled water, gently dried using filter paper and immersed in *n*-hexane for 30 s to remove any PAHs present on the surface. The leaves and roots were then mounted on a glass slide containing 50% glycerol and viewed under a LEICA DM 5000 B fluorescence microscope with a LEICA Filter cube A (UV excitation range, excitation filter BP 340–380 nm, dichromatic mirror 400 nm and suppression filter LP 425 nm). Images were recorded using a LEICA DFC 500 digital camera under UV and visible light. Samples were disposed of appropriately (incinerated) at the end of the analysis.

2.6. Extraction of PAHs from *M. sativa* L. tissues and spectrofluorometric analysis

To detect fluorescence, 150 mg of leaves and roots from alfalfa plants grown in the presence or absence of 150 ppm total PAHs for 40 DAS was collected into glass tubes using a stainless steel forceps. The samples were frozen in liquid nitrogen, ground to a fine pow-

der with glass beads using a vortex, extracted for 30 min with 2 mL *n*-hexane/dichloromethane solution (1:1, v/v) and collected into glass vials. The PAH extract was purified by column chromatography using silica adsorption (Clean-up) (Banjoo and Nelson 2005). After elution using 14 mL of the *n*-hexane-dichloromethane (8:2, v/v) mobile phase into 15-mL penicillin flasks, the PAH samples were completely dried in a fume hood (with solvent volatilization), solubilized in 400 μ L of acetonitrile, aided by an ultrasonic bath set at 30 °C for 15 min, immediately filtered through a PTFE membrane with 0.22- μ m pores into glass vials and stored at -20 °C until analyzed.

For spectrofluorometric analysis, 400 μ L of the above samples was excited at 254 nm using a SpectraMax M2^e Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices); the emission spectrum was scanned at 340–500 nm, and data were acquired using SoftMax[®] Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices). As a control, root and leaf extracts of *M. sativa* L. grown in the absence of PAHs were analyzed and compared with a solution containing only acetonitrile and a solution containing a mixture of each PAH.

3. Results

The emission spectrum of PAHs excited at 254 nm showed peaks, with maximum emission in the blue region of the visible spectrum (λ_{em} = 360–400 nm) for all PAHs evaluated. Standard peaks were observed at λ_{em} 380 nm and 402 nm (Fig. 1A) for anthracene, λ_{em} 360 nm for phenanthrene (Fig. 1B) and λ_{em} 384 and 455 nm for pyrene (Fig. 1C). The PAH anthracene presented relative fluorescence that was 4–20 times more intense to that of phenanthrene and pyrene, respectively, and was responsible for more than 80% of the signal.

M. sativa L. plants tolerated the presence of 150 ppm PAHs, remaining alive during the 40 days of the experiment. However, visible symptoms of chlorosis and white dots in senescent leaflet limbs and cotyledons were observed in plants grown in contaminated soil (Fig. 2). Leaflets of alfalfa grown in control (uncontaminated) soil were observed under visible (VL) and ultraviolet (UV) light, and only natural chlorophyll fluorescence was detected, indicating the absence of PAHs in those tissues (Fig. 3A and B). However, when analyzing the leaflets of alfalfa plants grown in contaminated soil, the characteristic fluorescence of PAHs (in light blue) was observed throughout the leaflet limb, with fluorescence mainly found in stomata and nearby epidermal cells (Fig. 3C and D). PAHs were also detected in the roots of plants grown in contaminated soil. The fluorescence was intense and concentrated in the root stele area and followed the contour of the cell wall of root cortical cells (Fig. 3E–H).

Glandular secreting trichomes (GSTs) of alfalfa leaves were also analyzed. The leaf trichomes of plants grown in control soil exhibited a hyaline color when examined under visible and UV light different from that emitted by PAHs when analyzed under UV light (Fig. 3I and J). The presence of dark-colored substances was detected in the GSTs of *M. sativa* L. leaflets in plants grown in contaminated soil, with intense fluorescence characteristics of PAHs (Fig. 3K and L).

Leaflets and cotyledons with visible symptoms of stress in the presence of PAHs were also examined. Intense fluorescence was detected in injured areas identified by white spots present in the limb (Fig. 4A and B). Other areas with a darker color also showed intense fluorescence, mainly near the stomata, epidermal cells and cuticle (Fig. 4C–E).

PAHs in shoot tissues of *M. sativa* L. were observed mainly in senescent leaflets and cotyledons. In contrast, PAHs were present in young leaves, to a lesser extent, only around stomata, as indicated by the faint fluorescence observed (Fig. 5).

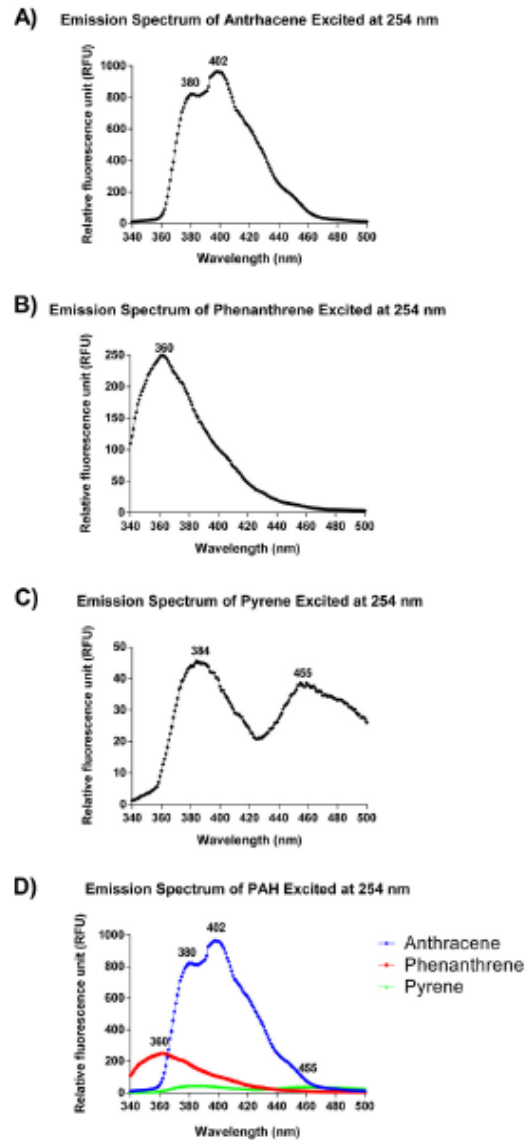


Fig. 1. Emission spectrum of PAHs. The emission spectrum of PAHs excited at 254 nm showed peaks with maximum emission in the blue region of the visible spectrum (λ_{em} = 360–400 nm) for all PAHs studied. Standard peaks were observed at λ_{em} 380 nm and 402 nm (A), for anthracene, λ_{em} 360 nm for phenanthrene (B) and λ_{em} 384 and 455 nm for pyrene (C). (D) Overlap of emission spectrum of excited PAHs at 254 nm (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

To validate our PAH detections by fluorescence microscopy, emission spectrum in both the presence and absence of PAHs were analyzed in *M. sativa* L. leaves and roots. The emission spectrum of leaves and roots cultivated in the presence of PAHs (λ_{ex} 254 nm) showed peaks at λ_{em} 360, 380, 402, and 455 nm, indicating the presence of all PAHs studied in the internal tissue of *Medicago sativa* L. (Fig. 6A). The shapes of the PAH-contaminated plant emission spectrum were similar to the PAH mixed-solution spectrum, presenting the same profile (Fig. 6B). The emission spectrum of the control plants (cultivated in the absence of PAHs) was very similar

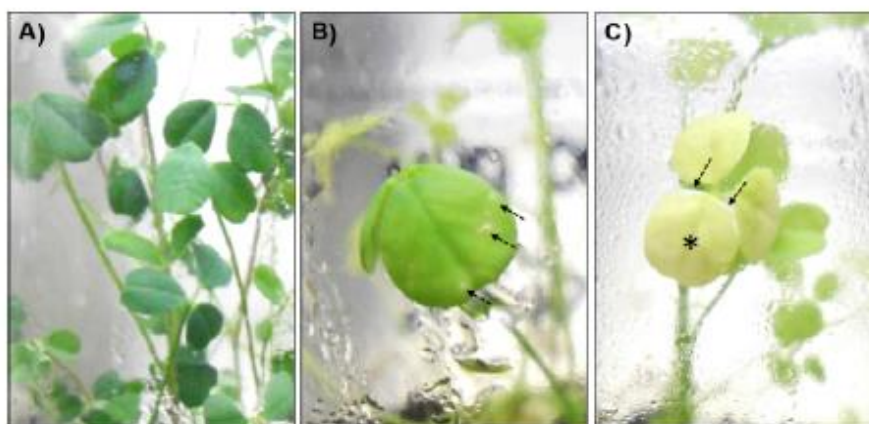


Fig. 2. Visible symptoms of stress in plants grown in the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons at 40 DAS. A) Leaflets of plants grown in uncontaminated soil. B) Leaflets of plants grown in soil with 300 ppm PAHs. C) Leaflets of plants grown in 450 ppm PAHs, showing severe chlorosis (*). Arrows (B, C) indicate the presence of whitish areas (white dots) in the leaf blade, indicating possible areas of injury.

to that of the acetonitrile solution, with lower emission fluorescence, proving the absence of PAHs in control plants.

Differences in relative fluorescence intensity were observed in roots and leaves of alfalfa plants cultivated in the presence of PAHs, with a high signal of anthracene (peaks at λ_{em} 380 and 402 nm) in roots compared to leaves and more pyrene (peak at λ_{em} 455 nm) in leaves. The phenanthrene signal was observed in both tissues at a low relative fluorescence intensity (Fig. 6A)

4. Discussion

Phenanthrene, anthracene and pyrene, similar to other PAHs, autofluoresce when exposed to UV light and have specific signal emission spectrum, which enables their detection using fluorescence microscopy (Dabestani and Ivanov, 1999; Wild et al., 2004; Alkio et al., 2005 and Wang et al., 2010). The fluorescence microscopy techniques applied in this study showed the location/distribution of these contaminants throughout plant tissues and confirmed their sequestration by *M. sativa* L. In addition, our results suggest possible, previously unknown function of certain epidermal structures of this plant.

The leaflets of alfalfa plants grown in contaminated soil exhibited fluorescence at specific sites. PAHs were present in stomata, epidermal cells, trichomes, injured areas, and conducting tissues. Although fluorescence was higher in older organs, namely, senescent leaves and cotyledons, faint fluorescence was also observed in young leaflets, mainly in the stomata. In root tissues, the fluorescence emitted was primarily associated with the root stele (composed of vascular tissues) and root cortex. Similar results were observed by Wild et al. (2004), who traced the movement of anthracene in maize leaves using multiphoton microscopy.

These results could also be confirmed by fluorescence emission spectrum assays of plant tissue contaminated with PAHs, and we observed that the three PAHs were able to enter the plant and accumulate in different cells and tissues. One possible explanation for this phenomenon may be related to the lipophilic characteristics of PAHs, whereby constituents are classified as moderately to highly liposoluble, representing high coefficients of octanol-water partition ($\log K_{ow}$) that range from 3.37 to 6.75. This parameter is defined as the ratio of the equilibrium concentration of an organic contaminant in the octanol phase to the concentration of the contaminant in the aqueous phase. This is important for evaluating the mobility of organic compounds, as it defines hydrophobicity. These values allow for predicting possible cumulative processes in com-

partments such as sediments and soils, which are rich in adsorbed organic matter, as well as bioaccumulation in biological systems (Neff, 1984). PAHs with $\log K_{ow}$ are considered to be very recalcitrant. However, those with values less than 5, such as anthracene (4.45), pyrene (4.88) and phenanthrene (4.46), are able to enter the food chain by concentrating from the primary level to the top of the chain (Harvey et al., 2002).

The presence of different relative amounts of anthracene and pyrene in aerial and root tissues suggests that these PAHs have different mobilities in *M. sativa* L. These differences in the uptake of these pollutants may be influenced by variable solubility in water. Considering that the traffic of substances to the aerial parts of the plant occurs via xylem, PAHs with low solubility in water, such as anthracene ($4.34 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$), would tend to become more concentrated in the roots. In contrast, the other PAHs studied, pyrene and phenanthrene, presented higher solubility in water (0.135 and 1.15 mg L^{-1} respectively) and consequently were found in greater amounts in the aerial parts.

Overall, our results suggest the following translocation route for PAHs: 1) uptake by roots due to the lipophilic characteristics of PAHs that allow them to passively diffuse into vascular tissues (Alkio et al., 2005); 2) translocation to senescent leaves of *M. sativa* L. shoots; 3) distribution to areas near stomata and trichomes; and 4) with accumulation in shoot tissues, injured areas begin to emerge around stomata and are characterized by areas with typically brown-colored substances, which progress to areas of cell death (brown and white spots). Such symptoms have been reported for *Arabidopsis thaliana* grown in the presence of phenanthrene (Alkio et al., 2005). However, compared with the results of the present study, those plants showed a much higher sensitivity to the presence of PAHs. The presence of white- and brown-colored spots was observed throughout the plant, and the spots were large enough to be visible to the naked eye.

Another key finding in the shoots of *M. sativa* L. plants grown in contaminated soil was the presence of intense fluorescence in trichomes. Data for *Medicago* in the TrichOME database (a database of plant trichomes with comparative "omics" data) indicate two types of trichomes on alfalfa plants. The first type is erect glandular trichomes with a multicellular stalk typically longer than 200 μm surmounted by a glandular head consisting of a few cells approximately 15 μm in diameter (http://www.plantrichome.org/trichomedb/images/Medicago_sativa_trichome.png). The second type of trichome is non-glandular, consisting of a short base cell and a unicellular elongated shaft (Ranger and Howerb, 2001).

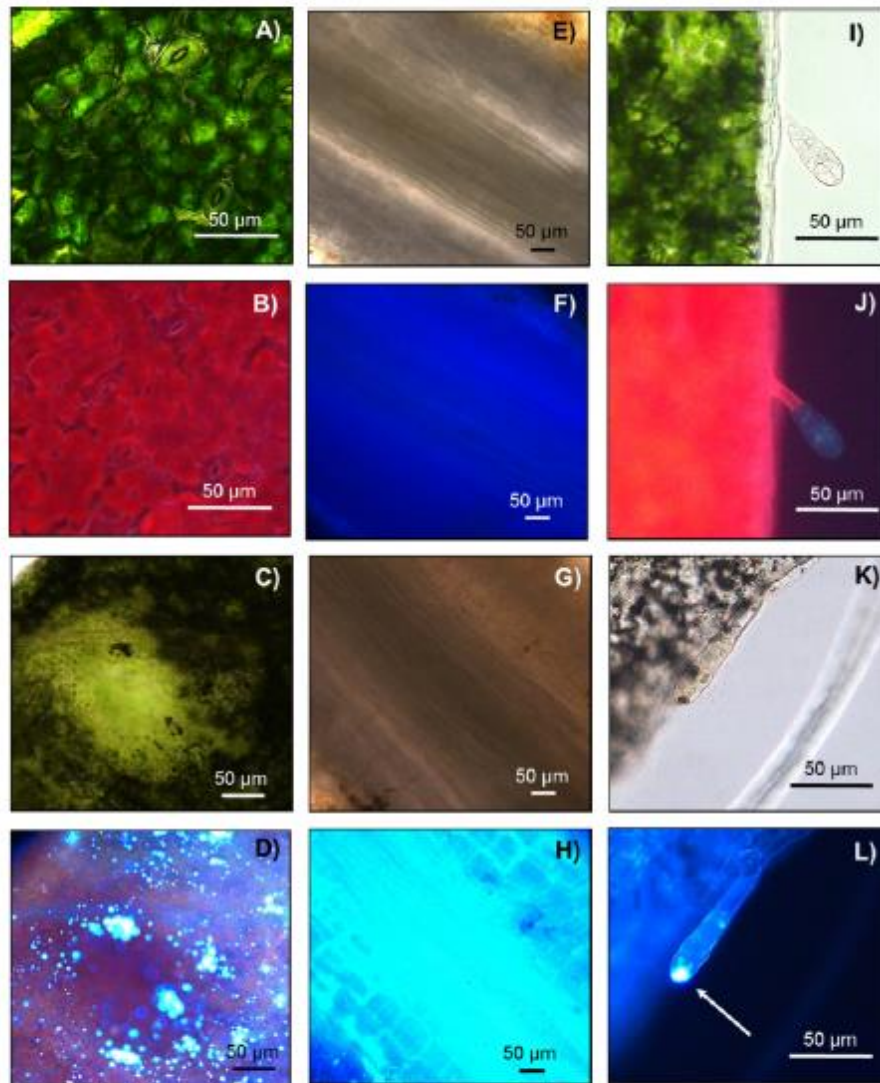


Fig. 3. Presence of PAHs in tissues of leaves and roots of *Medicago sativa* L., as evidenced by fluorescence microscopy. Alfalfa plants were grown in soil contaminated with 0 and 150 ppm total PAHs, and samples were observed at 40 DAS. Shoots and roots were viewed with a compound microscope under bright field or UV illumination, and images were captured with a digital camera. The specific fluorescence of PAHs is represented in blue and white spots. (A–D) Alfalfa leaves cultivated in the absence (A, B) and presence (C, D) of 150 ppm total PAHs. (E–H) Alfalfa roots grown in the absence (E, F) and presence (G, H) of 150 ppm total PAHs. (I–L) Secreting glandular trichomes of alfalfa grown in the absence (I, J) and presence (K, L) of 150 ppm total PAHs. Highlighting of the intense fluorescence in trichomes of plants grown in contaminated soil (arrowhead). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

However, a third trichome of unknown function may appear on alfalfa plants, a GST similar to that described for *M. truncatula* (Dai et al., 2010) (http://www.planttrichome.org/trichomedb/images/Medicago_truncatula_trichome.png).

The key role of trichomes in pollutant removal has been discussed in the literature, including the study of Salt et al. (1995) on *Brassica juncea* trichomes, which are able to accumulate cadmium. Gutierrez-Alcala et al. (2000) also showed that *A. thaliana* trichomes have at least 300 times more glutathione than other epidermal cells, suggesting a possible and efficient xenobiotic conjugation site.

Studies examining the transcriptome of erect glandular trichomes of *M. sativa* L., with their multicellular stalk and glandular head (different from that observed in this study), revealed that those organs contain key enzymes for xenobiotic detoxification, including glutathione S-transferase, cytochrome P450 and cytochrome P450 reductase (Aziz et al., 2005).

Thus, we suggest that trichomes are likely to play an active role in the phytoremediation of PAHs as conjugation and degradation sites. This is based on the presence of phytoremediation-related proteins (PRPs) in GSTs of unknown function in *Medicago* plants and the observation of intense PAH fluorescence in those epidermal appendages, as experimentally demonstrated in this study using fluorescence microscopy.

These results may be very important for the future of phytoremediation. Trichomes may be easily incorporated into plants seldom used for food for humans and animals (regardless of economic) (Ranger et al., 2005) using genetic engineering, thereby preventing the incorporation of PAHs into the food chain, which is the main challenge that phytoremediation currently faces (Verkleij et al., 2009). To our knowledge, this is the first study to date to assess the presence of PAHs in *M. sativa* L. tissues using fluores-

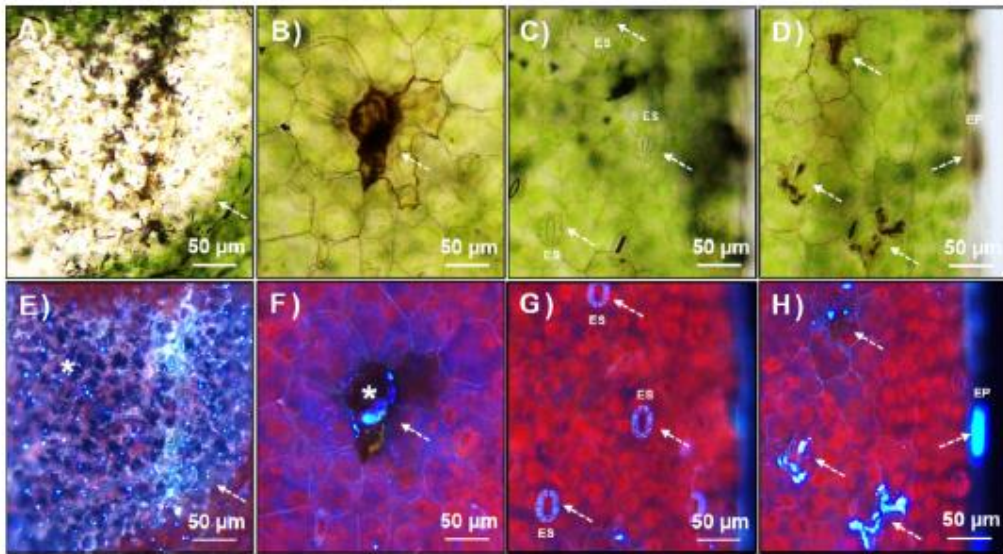


Fig. 4. Light and fluorescence microscopy images of injured cotyledons and leaflets of *Medicago sativa* L. plants grown in soil contaminated with 150 ppm total PAHs at 40 DAS. Adaxial surface of the epidermis of cotyledons and leaflets showing injured areas (white dots in leaflets and dark spots in cotyledons), as indicated by arrows, observed under visible (A–D) and UV (E–H) light. Large injured area in leaflets (White dots) observed under visible (A) and UV (E) light. Large injured area in cotyledons (dark spot) observed under visible (B) and UV (F) light. Note the intense fluorescence (*) in the injured areas (E, F) and fluorescence in the stomata (G, H) and epidermis of cotyledons (H). All images were obtained at 10X magnification; scale bar = 50 μ m. (ST = stomata) (EP = epidermis).

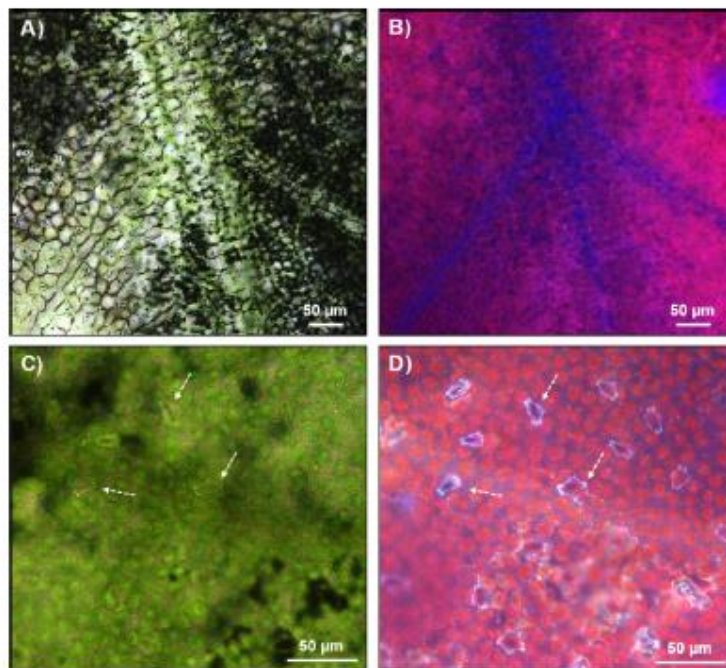


Fig. 5. Light and fluorescence microscopy of young leaflets of *Medicago sativa* L. plants grown in soil contaminated with 150 ppm total PAHs at 40 DAS. Images observed under visible (A, C) and UV (B, D) light. The presence of PAHs at low quantities in the adaxial surface of the epidermis of young leaflets of *Medicago sativa* L. plants; the fluorescence was imperceptible at lower magnification (A, B) and only slightly visible (arrow) in stomata observed under higher magnification (C, D). Images were obtained at 10x (A, B) and 20x (C, D) magnification; scale bar = 50 μ m.

cence microscopy and the first to propose a possible physiological function for the GSTs observed in this species.

Although the fluorescence microscopy technique presented here was shown to be a very useful tool for detecting and monitor-

ing these PAHs in plant tissues, there are limitations with respect to accurately quantifying the studied PAHs. Nonetheless, the technique can be used to determine the relative quantities of PAHs in different tissues based on the size and intensity of fluorescent

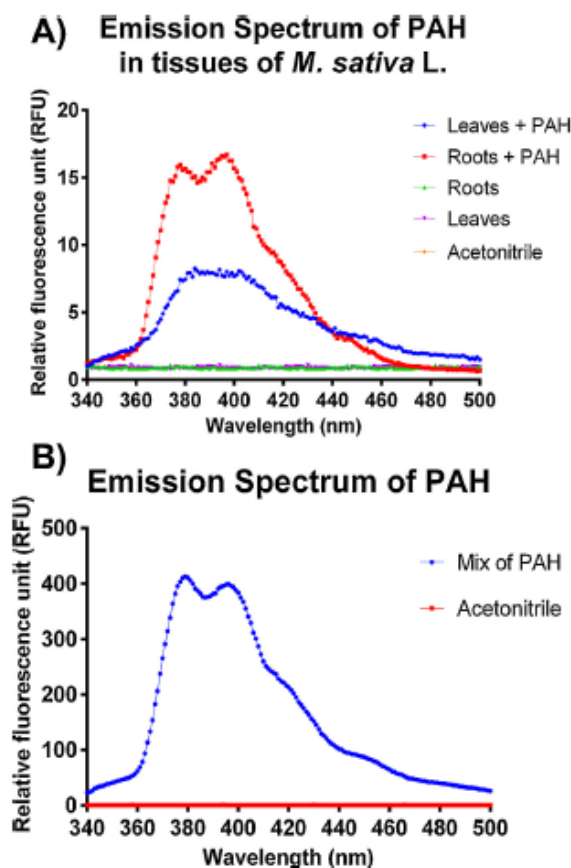


Fig. 6. Emission spectrum of leaves and roots cultivated in the presence of PAH. The emission spectrum of leaves and roots cultivated in the presence of PAH (λ_{exc} 254 nm) showed peaks at λ_{em} 360, 380, 402, and 455 nm, indicating the presence of all PAH studied, in the internal tissue of *Medicago sativa* L. (A). Compared with the PAH mixed-solution spectrum, the shapes of the emission spectrum of PAH-contaminated plants were similar, presenting the same profile (B).

dots. These limitations were also observed by Wang et al. (2010). Thus, detailed and comprehensive studies need to be carried out in the future in combination with new visualization techniques, for example, two-photon laser scanning microscopy (Wang et al., 2010) or matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry (MALDI-IMS), which involves visualization of the spatial distribution of small molecules (Caldwell and Caprioli, 2005; Reyzer and Caprioli, 2007; Ye et al., 2013; Takahashi et al., 2015).

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPQ, CENPES, PETROBRAS and the Brazilian Agency of Petroleum (Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustíveis, ANP—Programa de Recursos Humanos) for financial support (PQ1-111.881/2013) as well as the Postgraduate Programs in Biochemistry—PPGBq (Programa de Pós-graduação em Bioquímica—PPGBq) and Oil and Biofuels Chemist (Programa Químico de Petróleo e Biocombustíveis—PQpetro) from the Chemistry Institute—IQ—UFRJ, Brazil. Finally, the authors would like to thank Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant’Anna Filho and the Structural Biotechnology Laboratory of the National Institute of Metrol-

ogy (Laboratório de Biotecnologia Estrutural do Instituto Nacional de Metrologia—INMETRO) in Xerém—RJ for providing the infrastructure for the fluorescence microscopy experiments, and M.Sc Amanda Alves de Almeida Mujo and the American Journal Experts, by paper edition for proper English language.

References

- Alkio, M., Tabuchi, T.M., Wang, X., Cólón-Carmona, A., 2005. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J. Exp. Bot.* 56 (421), 2983–2994.
- Aziz, N., Paiva, N.L., May, G.D., Dixon, R.A., 2005. Transcriptome analysis of alfalfa glandular trichomes. *Planta* 221, 28–38.
- Banjoo, D.R., Nelson, P.K., 2005. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *J. Chromatogr. A* 1066, 9–18.
- Brinch, U.C., Ekelund, F., Jacobsen, C.S., 2002. Method for spiking soil samples with organic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4), 1808–1816.
- Caldwell, R.L., Caprioli, R.M., 2005. Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol. Cell Proteom.* 4 (4), 394–401.
- Cunningham, S.D., Ow, D.W., 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110, 715–719.
- Dabestani, R., Ivanov, I., 1999. A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochem. Photobiol.* 70, 10–24.
- Dai, X., Wang, G., Yang, D.S., Tang, Y., Broun, P., Marks, M.D., Sumner, L.W., Dixon, R.A., Zhao, P.X., 2010. TrichOME: a comparative omics database for plant trichomes. *Plant Physiol.* 152, 44–54.
- Fan, S., Li, P., Gong, Z., Ren, W., He, N., 2008. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere* 71, 1593–1598.
- Ferro, A., Kennedy, J., Doucette, W., Nelson, S., Jauregui, G., Mc Farland Bugbee, B.B., 1997. Fate of benzene in soils planted with alfalfa: uptake, volatilization, and degradation. In: Kruger, E.L., Anderson, T.A., Coats, J.R. (Eds.), *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, vol. 664. American Chemical Society, ACS Symposium Series, Washington, D.C., pp. 223–237.
- Flocco, C.G., Lo Balbo, A., Carranza, M.P., Giulietti, A.M., 2002. Removal of phenol by alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) grown in hydroponics and its effect on some physiological parameters. *Acta Biotechnol.* 22 (1–2), 43–54.
- Gao, Y., Wu, S.C., Yu, X.Z., Wong, M.H., 2010. Dissipation gradients of phenanthrene and pyrene in the rice rhizosphere. *Environ. Pollut.* 158, 2596–2603.
- Gutiérrez-Alcalá, G., Gotor, C., Meyer, A.J., Fricker, M., Vega, J.M., Romero, L.C., 2000. Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11108–11113.
- Harvey, P.J., Campanella, B.F., Castro, P.M.L., Harms, H., Lichtfouse, E., Schaffner, A.R., Smrček, S., Werck-Reichhart, D., 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons: anilines and phenols. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9, 29–47.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Berkeley Circ.* 347, 1–39.
- Kirk, J.L., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environ. Pollut.* 133, 455–465.
- Landmeyer, J.E., 2012. Historical Foundation, Hydrologic Control, and Contaminant Remediation In: *Introduction to Phytoremediation of Contaminated Groundwater*. Springer, London.
- Lau, E.V., Gan, S., Ng, H.K., 2010. Extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *Int. J. Anal. Chem.* 2010, 1–9.
- Liu, R., Jadeja, R.N., Zhou, Q., Liu, Z., 2012. Treatment and remediation of petroleum-contaminated soils using selective ornamental plants. *Environ. Eng. Sci.* 29, 494–501.
- Liu, R., Xiao, N., Wei, S., Zhao, L., Na, J., 2014. Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Sci. Total Environ.* 473, 350–380.
- Meire, R.O., Azeredo, A., Torres, J.P.M., 2007. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecologia Brasiliensis* 11 (2), 188–201.
- Muratova, A.Y., Golubev, S.G., Dubrovskaya, E.V., Pozdnyakova, N.N., Panchenko, L.V., Pleshakova, E.V., Chernyshova, M.P., Turkovskaya, O.V., 2012. Remediating abilities of different plant species grown in diesel-fuel-contaminated leached chernozem. *Appl. Soil Ecol.* 56, 51–57.
- Neff, J.M., 1984. Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. *Fresenius J. Anal. Chem.* 319, 132–136.
- Pilon-Smits, E.A.H., 2005. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Biol.* 56, 15–39.
- Ranger, C.M., Howerb, A.A., 2001. Glandular morphology from a perennial alfalfa clone resistant to the potato leafhopper. *Crop Sci.* 41, 1427–1434.
- Ranger, C.M., Winter, R.E., Rottinghaus, G.E., Backus, E.A., Johnson, D.W., 2005. Mass spectral characterization of fatty acid amides from alfalfa trichomes and their deterrence against the potato leafhopper. *Phytochemistry* 66, 529–541.
- Reyzer, M.L., Caprioli, R.M., 2007. MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11 (1), 29–35.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, L., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.* 109, 1427–1433.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, L., 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 643–680.

ANEXO B



Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by cv. Crioula: A Brazilian alfalfa cultivar

Wilber S. Alves^{a,b}, Evelin A. Manoel^c, Noemi S. Santos^a, Rosane O. Nunes^a, Giselli C. Domiciano^a, and Marcia R. Soares^a

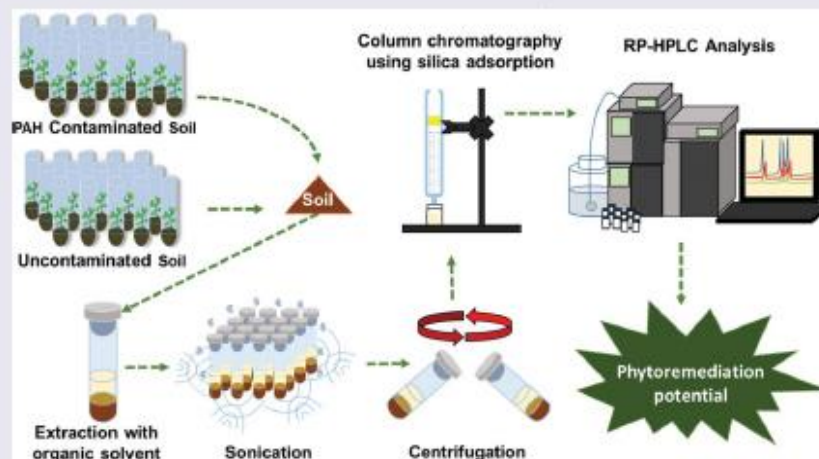
^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ - Centro de Tecnologia, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brazil; ^bPrograma Químico de Petróleo e Biocombustíveis PRH-01, Instituto de Química, UFRJ - Centro de Tecnologia, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brazil; ^cDepartamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFRJ - Avenida Carlos Chagas Filho, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the phytoremediation capacity of the alfalfa cultivar Crioula in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), primary pollutants with mutagenic and carcinogenic potential. Alfalfa was grown from seed for 40 days on soil amended with anthracene, pyrene, and phenanthrene. Soil and plant tissue was collected for biometric assay, dry mass analysis, and PAH analysis by liquid chromatography. Increased total PAH concentration was associated with decreases in plant biomass, height, and internode length. The Crioula cultivar had a satisfactory phytoremediation effect, reducing total PAH concentration (300 ppm) in the experimental soil by 85% in 20 days, and by more than 95% in 40 days. The PAH showed a tendency to be removed in the temporal order: phenanthrene before pyrene before anthracene, and the removal ratio was influenced by the initial soil concentration of each PAH.

GRAPHICAL ABSTRACT

Extracts containing PAH were obtained from soils cultivated with *Medicago sativa* L. (cv. Crioula) in the presence and absence of 150, 300, and 450 ppm total of PAH (phenanthrene, anthracene, and pyrene). After ultrasonication steps and purification of PAH by silica adsorption chromatography, samples containing PAH were quantified by high-performance liquid chromatography in reverse phase. At the end of this study, it was determined that the cv. Crioula showed a satisfactory phytoremediation potential. It presented the reduction of the total of PAH at around 85% in 20 days.



ARTICLE HISTORY

Received 21 January 2017
Revised 7 October 2017
Accepted 2 January 2018

KEYWORDS

Medicago sativa L.;
phytoremediation; polycyclic
aromatic hydrocarbons


1. Introduction

Since the Industrial Revolution, and with the development of metropolitan areas, natural resources have been exploited without regard for environmental impacts; the increasing emission

of industrial wastes and other pollutants resulting from uncontrolled development poses serious issues for the health of our planet. Accidents involving direct spillage of oil derivatives on the ground and in bodies of water have resulted in the

CONTACT Wilber S. Alves  Wilber.sa@hotmail.com  Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ - Centro de Tecnologia, Bloco A, Cidade Universitária, Cep: 21.941-909, Rio de Janeiro, Brazil.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/bjip.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2018 Taylor & Francis Group, LLC

accumulation of compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are toxic to humans and to the environment (Lemieux *et al.* 2015; Martins *et al.* 2011). Once absorbed by animal cells, PAHs from oil derivatives can bind to DNA, forming DNA adducts (Meire *et al.* 2007) and eventually inducing tumors in many human tissues (Chen *et al.* 2013). PAHs accumulate in the soil, and exposing human skin to soils with 50–100 mg kg⁻¹ of PAHs or 0.5–5 mg kg⁻¹ of benzo(a) pyrene is considered a risk factor for skin cancer (Harvey *et al.* 2002). Countries where economic expansion has been most pronounced, such as China and Brazil, are particularly vulnerable to PAH contamination. In Brazil, the greatest PAH levels are found in large urban and industrial centers such as São Paulo and Rio de Janeiro, which are among the 300 most polluted cities in the world (World Health Organization – WHO 2012). Several techniques aimed at removing pollutants from the environment have been developed to reverse this scenario. Phytoremediation stands out as a green technology because of its low cost, efficiency, and ease of implementation, and it may help reverse this scenario (Cunningham and Ow 1996; Pilon-Smits 2005; Landmeyer 2012).

Because it uses the natural capacity of plants and microorganisms to degrade, sequester, or immobilize pollutants, phytoremediation is a cost-effective approach for PAH removal from a variety of environmental matrices (Pilon-Smits 2005). *Medicago sativa* L. (alfalfa) and similar plants are under study as potential phytoremediation agents. *M. sativa* L. has shown great potential for phytoremediation of environments contaminated with organic pollutants (Kirk *et al.* 2005; Fan *et al.* 2008; Wang *et al.* 2012). This plant grows on soils highly contaminated (30–500 ppm) with PAH, and it is capable of remediating, within a few weeks (60 days on average), up to 80% of the PAH contaminants, including pyrene, anthracene, phenol (Flocco *et al.* 2002), and benzene (Ferro *et al.* 1997). These types of basic studies are expected to help turn phytoremediation into an efficient and economically competitive technology in the future, offering remediation solutions for environments contaminated with recalcitrant organic compounds (Harvey *et al.* 2002).

In keeping with the search for novel and improved phytoremediation technologies, and with the need to elucidate the physiological and biochemical phenomena underlying phytoremediation, this work aimed to evaluate the phytoremediation capacity of the *M. sativa* L. cultivar Crioula (EMBRAPA) in soils artificially contaminated with phenanthrene, anthracene, and pyrene. We chose this cultivar because it is adapted to the Brazilian climate, being widely cultivated in the South and Southeast regions of Brazil at high productivity levels (Rassini *et al.* 2008), and thus has the potential to decrease the time necessary for phytoremediation, minimizing its impact on local activities.

2. Materials and methods

2.1. PAHs used in this study

Phenanthrene, pyrene, and anthracene at a concentration of 98% were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). We chose these PAHs because of the risk they pose to the environment, show similarities with other molecule architectures known to have a mutagenic and carcinogenic effects, such as

benzo [a] pyrene and benzo [a] anthracene, and they are considered priority pollutants by the United State Environmental Protection Agency (USEPA - United State Environmental Protection Agency 2000).

2.2. Soil contamination

Experiments were performed as previously described (Brinch *et al.* 2002), with specific modifications: 430 g of soil (pH 5.65, humidity of 51%, 64 mg/kg of N, 128 mg/kg of P₂O₅, and 153,6 mg/kg of K₂O) was sifted through a 2-mm sieve and mixed with 430 g of organic fertilizer and 860 g of vermiculite (previously sifted through 2-mm sieves). This substrate was dried for 24 h at 30°C and divided into four portions of 430 g in 1-L autoclaved Erlenmeyer flasks (autoclaved for 40 min, 1 atm; 121°C). Fractions of each of the four portions (107.5 g, 25%) were transferred to four sterilized 500 mL beakers and amended with 50 mL acetone solutions containing 50, 100, or 150 ppm each of phenanthrene, anthracene, and pyrene (total PAH = 150, 300, and 450 ppm, respectively). Acetone was added to one of the 25% fractions as a control (0 ppm). The fractions and solvent were vigorously homogenized every 2 h using glass rods (previously sterilized for 8 h) and left in a laminar flow cabinet for 8 h until complete evaporation of the organic solvent. Each of the 107.5-g soil fractions containing the contaminants was added to a 75% soil fraction (the remaining 322.5 g, solvent-free) and homogenized by agitation inside the Erlenmeyer flask. Four 430-g substrate portions were thus obtained with the desired PAH concentrations (control, 150, 300, and 450 ppm). The substrates were stored until used for growing alfalfa seedlings.

2.3. Cultivation of cv. Crioula

Germination of alfalfa seeds (cv. Crioula, obtained from EMBRAPA) was induced after surface disinfection using the Silo-Suh *et al.* (2002) methodology. After the seeds started to germinate, seedlings were grown for the biometric, dry biomass, and phytoremediation assays in an aseptic environment. Cultivation was carried out in a biochemical oxygen demand system with a 14/10 h (light/dark) photoperiod at 28°C (LUCADEMA® model B.O.D LUCA-161/02). Each plant was watered with 1.5 mL Hoagland solution (Hoagland and Arnon 1950) every 3 days until the end of the experiment (day 40).

2.4. Biometric and dry biomass assays

Biometric and dry biomass data from cv. Crioula were obtained as previously described by Wang *et al.* (2012). Soil (140 g) was weighed on an analytical balance and transferred to eight sterile, 500-mL screw-cap glass jars, with two jars used for each PAH treatment (control, 150, 300, and 450 ppm of total PAH). For the biometric assays, 10 Crioula seedlings were grown in each jar. Ten plants from each treatment were collected 20 and 40 days after seeding (DAS), and their aerial parts and roots were isolated for the biometric and dry biomass assays.

concentrations tested (Holm-Sidak $p < 0.05$). Nevertheless, compared to the plants grown in control soil, we observed morphological changes such as reduced internode length and shorter leaves, which became more pronounced as PAH concentrations increased. In soil contaminated with 450 ppm total PAH, developmental differences in the aerial part were obvious from DAS 20 onward (Figure 1A), becoming exacerbated by DAS 40, with retarded growth, smaller leaves, and internode shortening observed (Figure 1B and C). Compared to controls, average height of the aerial parts was approximately 2 times shorter for plants grown in soil amended with 150 ppm total PAH and 2–3 times shorter in soils contaminated with 300 and 450 ppm total PAH (Figure 2A). This tendency for reduction in height in the presence of contaminants was significant (Tukey $p < 0.05$) throughout the development of the plants, although there was no significant difference between the heights of the aerial parts of plants grown on amended soils at 20 and 40 DAS (Tukey $p < 0.05$). Shortening of the internode regions contributed to the observed growth profile (Figure 2A).

We detected significant differences in average root length of plants grown in amended soil at 40 DAS but not at 20 DAS. Root length of plants grown on contaminated soil at 40 DAS was approximately half as that of plants grown in the control

soil, with no difference in root lengths between the 150, 300, and 450 ppm PAH treatments (Tukey $p < 0.05$). Therefore, root growth was impaired in contaminated soils between 20 and 40 DAS, compared to controls (Holm-Sidak $p < 0.05$). Other than the control plants, only those grown on soil with 150 ppm of total PAH showed significant root growth (Figure 2B).

3.1.2. Analysis of dry biomass data for *cv. Crioula* at different PAH concentrations

Plants grown on amended soil had significantly lower dry biomass of the aerial parts compared to controls at 40 DAS (Tukey $p < 0.05$) but not at 20 DAS. Dry biomass decreased as contaminant concentration increased, with only plants grown on soil with 150 ppm total PAH (and plants grown in control soil) showing a significant increase in biomass of the aerial parts between 20 and 40 DAS (Holm-Sidak $p < 0.05$, Figure 2C). Root biomass was 3, 4, and 5 times smaller than that of the control for plants grown on soil amended with 150, 300, and 450 ppm total PAH, respectively. Only plants grown on soil containing 300 ppm total PAH (and control plants) showed a significant increase in root biomass between 20 and 40 DAS

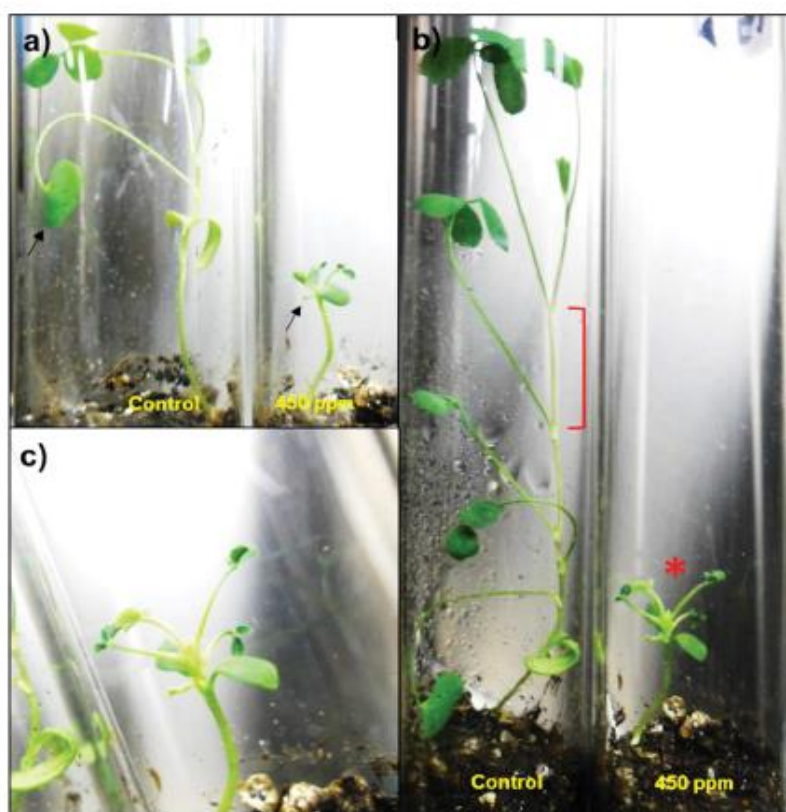


Figure 1. Differences in the development of plants grown in the presence and absence of polycyclic aromatic hydrocarbons. (a) Cultivated plants for 20 DAS. Arrows indicate the size difference between the control initial unifoliate leaf and 450 ppm initial unifoliate leaf. (b) Cultivated plants for 40 DAS. In red is shown the size difference between cultivated plants in contaminated soil and control (*). An internode region is represented by the red key in the control plant. (c) Highlight for cultivated plants in the concentration of 450 ppm PAH, with tiny leaves and low development of internodes.

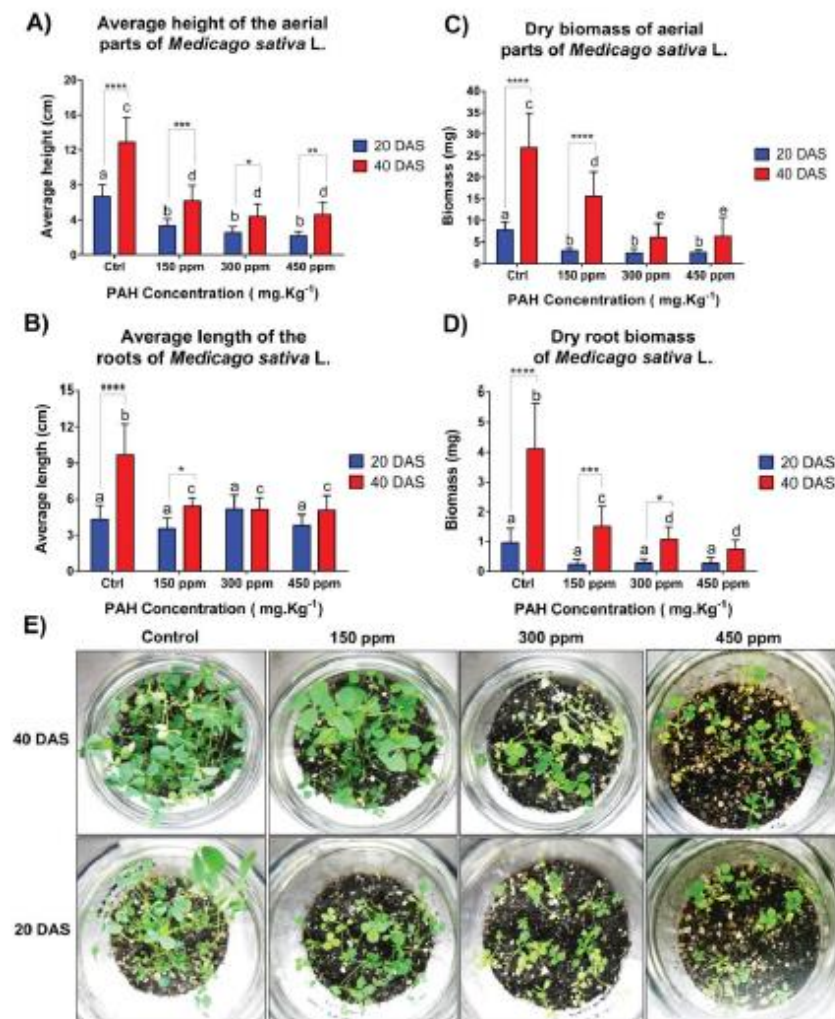


Figure 2. Biometric data from shoots and roots of *Medicago sativa* L. The graphs show a reduction of the average length (A and B) and dry biomass (C and D) of the aerial parts and roots of plants grown in the presence of PAH (phenanthrene, anthracene and pyrene) for 20 and 40 days. Each column represents the mean \pm standard deviation, and 10 plants, different letters indicate significant differences between the conditions for two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons test ($p < 0.05$). Evaluation of the increase of the biomass and growth of plants was obtained by two-way ANOVA followed by the Holm-Sidak ($p < 0.05$), where stars indicate significant difference for the same conditions between times 20 and 40 DAS (Confidence intervals: **** = 99.9%/= 99% **/* = 95%, and * = 90%). In E, the appearance of *Medicago sativa* L. with various concentrations of total PAH after 20 and 40 DAS is observed.

(Holm-Sidak $p < 0.05$, Figure 2D). Figure 2E shows the growth profile of *cv. Crioula* for different PAH concentrations throughout the 40-day experiment.

3.2. Phytoremediation potential of *cv. Crioula*

PAHs extracted from both cultivated and uncultivated soils were purified by silica adsorption chromatography, after which the eluates were collected and concentrated by complete evaporation of the solvent, yielding purified crystals at the bottom of the flasks. For all PAH concentrations tested, cultivated soils in which *cv. Crioula* had been grown for 40 days yielded a smaller quantity of crystals (Figure 3A) than the uncultivated soils (Figure 3B). The observed reduction in crystal quantity per flask resulted from growing a single *cv. Crioula* plant in the

amended soil. Thus, the presence of *cv. Crioula* in the contaminated soil clearly contributed to the 85% reduction in soil PAH concentration at 20 DAS, which yielded a PAH level significantly lower than its value at the beginning of the experiment and that of uncultivated soil (Tukey $p < 0.05$, Figure 4A–D). The presence of *cv. Crioula* plants in contaminated soil was correlated with a reduction in the concentrations of the studied PAH as early as 20 DAS. For phenanthrene, the decrease was 98% at all levels of contamination, which was significantly different from the removal level in the absence of plants. At 40 DAS, however, phenanthrene removal, even in the absence of *cv. Crioula* plants, exceeded 98% for all tested concentrations except the highest (150 ppm phenanthrene), at which level the presence of *cv. Crioula* plants resulted in significantly higher removal compared to the control (Tukey $p < 0.05$, Figure 5A).

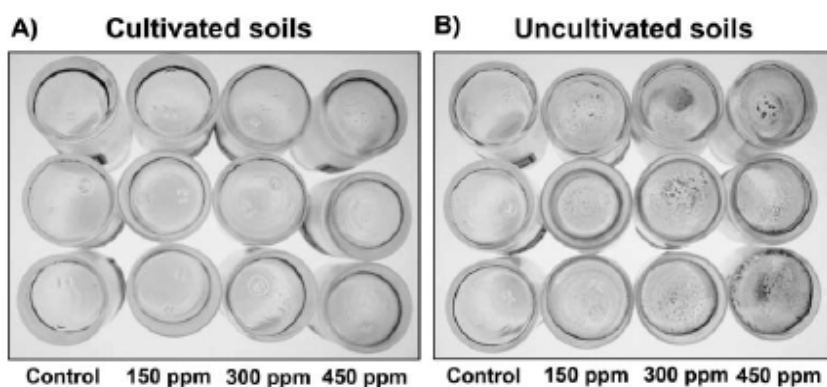


Figure 3. Crystals of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) extracted and purified from cultivated and uncultivated soils with *Medicago sativa* L. for 40 days. Each vial contains PAH extracted by ultrasonication and purified by adsorption chromatography on silica, from 10 g of uncultivated (A) or uncultivated soil B) for 40 days. The experiment was performed in biological triplicates. (A) PAH crystals extracted and purified from soil cultivated with *Medicago sativa* L. (B) crystals PAH extracted and purified from uncultivated soils for 40 DAS. Detail for noticeable decrease of PAH crystals in the presence of alfalfa plants in comparison with uncultivated soil.

Anthracene removal was significantly greater from cultivated soil than that from uncultivated soil (Tukey $p < 0.05$), with a removal ratio for the 50 and 100 ppm PAH treatments of 60–80% at 20 DAS and reaching 90–100% at 40 DAS. For soil contaminated with 150 ppm anthracene, the removal ratio was 50% at both 20 DAS and 40 DAS (Tukey $p < 0.05$, Figure 5B). Finally, soil in which cv. Crioula was grown also had significantly reduced pyrene for all tested concentrations (Tukey $p < 0.05$), with removal ratios varying between 60% and 85% at 20 DAS and reaching an average of 95% at 40 DAS (Tukey $p < 0.05$, Figure 5C).

4. Discussion

This study evaluated the ability of cv. Crioula to tolerate and to phytoremediate the PAH phenanthrene, anthracene, and pyrene. We monitored morphological changes in plants grown with different concentrations of these contaminants for 40 days using biometric and dry biomass assays, and we determined the *in vitro* phytoremediation potential of this cultivar. Our results showed that cv. Crioula plants grown in a PAH-amended soil suffered a reduction in size and biomass proportional to the increase in contaminant concentration. Baek *et al.* (2004), describing the effects of crude oil on growth of bean (*Phaseolus nipponensis* Ohwi) and corn (*Zea mays* L.), reported reduction of plant size in soils contaminated with organic pollutants. Phytotoxicity in these species increased with the number of aromatic rings, and *Z. mays* showed more sensitivity to soil contaminated with PAH than did *P. nipponensis*. Ekundayo *et al.* (2001) also reported a reduction in *Z. mays* plant growth in polluted soils (oil spillage), using stalk height and width as well as leaf area index as criteria. Xu and Johnson (1995), Hester and Mendelsohn (2000), and Pezeshki *et al.* (2000) proposed an explanation for the reduction in size of plants grown on soils contaminated with organic compounds, reporting that organic pollutants such as oil and oil-derivatives can form an impermeable layer over the surface of the roots, hindering their uptake of water and mineral salts from the soil. As a result, plant height and leaf area become smaller and the number of stomata increases. As lipophilic compounds, the PAHs studied

in our work could potentially adhere to roots of *M. sativa*, compromising water intake and therefore causing a reduction in size. Plants in the 150, 300, and 450 ppm total PAH treatments were much smaller than the controls, with a proportional reduction in the length of the internode region. This reduction in internode length is drastic, generating “dwarf plants” that can be easily distinguished from plants grown in non-contaminated soils, suggesting that alfalfa cv. Crioula is a good candidate as a phytoindicator of soil pollution with PAH.

Even though PAH soil contamination reduced the average height and length of the aerial and root parts of the plant, as well as the dry biomass of those plant parts, cv. Crioula plants were capable of surviving to the end of the experiment (40 days), indicating high tolerance of this cultivar to high PAH soil concentrations. At 150 ppm total PAH, cv. Crioula plants had significant growth of root and aerial parts, as well as significant biomass increase between 20 and 40 DAS with few visual signs of stress, indicating that cv. Crioula is capable of developing in soils under these conditions. According to the Environmental Protection Agency of the state of São Paulo, Brazil (CETESB), the PAH concentrations that pose a risk to human health and that require the implementation of remediation and monitoring techniques are 15 ppm for agricultural land, 40 ppm for residential soil, and 90 ppm for industrial soil (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB 2014). Thus, our results suggest that the alfalfa cultivar Crioula is viable as a phytoremediation tool for agricultural, residential, and industrial soils in Brazil. Furthermore, cv. Crioula plants were efficient phytoremediators at all PAH contamination levels tested. Our qualitative analysis revealed a significant reduction in the quantity of PAH extracted and purified from contaminated soil in which cv. Crioula had been grown for 40 DAS, demonstrating that a single cv. Crioula plant grown in 10 g of amended soil was capable of removing the majority of contaminants during the experiment. Quantitative analysis of the purified PAH extracts determined that, on average, the plant was capable of remediating more than 85% of the PAH in 20 days, particularly at lower concentrations (150 ppm total PAH). Removal efficiency was highest for phenanthrene (98% in just 20 days). However, not all of the removal of

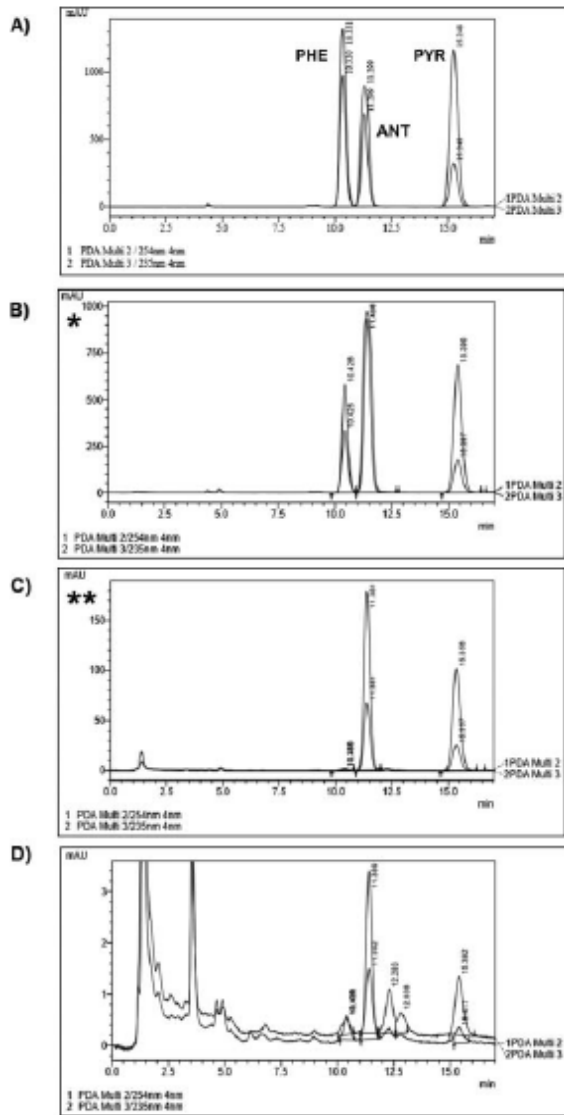


Figure 4. Chromatographic profile of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) samples eluted by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The retention times obtained for the phenanthrene (PHE), anthracene (ANT), and pyrene (PYR) is 10 min, 11 min and 15 min respectively. (A) Chromatogram of the standard mixture of PAH in 60% acetonitrile. (B) Chromatogram of soil samples contaminated with 300 ppm of total PAH not cultivated for 20 days. (C) Chromatogram of soil samples contaminated with 300 ppm of total PAH cultivated with *Medicago sativa* L. for 20 days. (D) Chromatogram of samples of control soil. (*) Reduction of 85% concentration of contaminants in soil (difference in scale in mAU). (**) Remarkable decrease of phenanthrene peak.

phenanthrene resulted from the cv. Crioula plants; phenanthrene removal reached 40–60% at 20 DAS even in uncultivated soils. This was partly due to the ease with which phenanthrene is volatilized and degraded in the environment, compared with higher molecular weight PAH (Wilcke *et al.* 2000). On the other hand, soils uncultivated for 20 days had low percentages of removal of pyrene and anthracene, whereas cultivation of cv. Crioula for the same period of time resulted in an 85% reduction in those PAH. These results support data

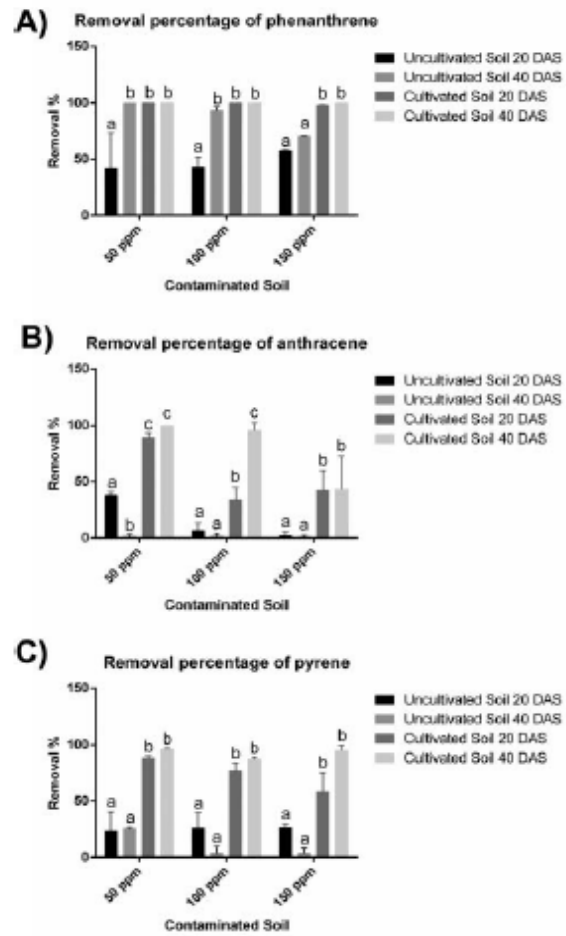


Figure 5. Removal percentage of PAH after 20 and 40 days. Each column represents the mean and standard deviation of the percentage of removal of phenanthrene, (A) anthracene, (B) and pyrene (C) in three soil samples (biological triplicate). Different letters indicate significant difference between the series for each soil contaminated with 50, 100, and 150 ppm phenanthrene, anthracene, and pyrene. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison ($p < 0.05$).

from previous studies showing that there is more removal of organic pollutants from cultivated soils than from uncultivated soils (Merkl *et al.* 2005, Lee *et al.* 2008, Su and Zhu 2008, Gao *et al.* 2010, Ma *et al.* 2012). Our results with cv. Crioula also reinforce previous studies that indicated that *M. sativa* L. can be used for phytoremediation of PAH in contaminated soils, suggesting that these plants possess the biochemical machinery necessary for PAH phytoremediation (Kirk *et al.* 2005; Fan *et al.* 2008; Wang *et al.* 2012).

An interesting observation from our work concerns the dynamics of contaminant removal over time. PAH were removed in the following temporal order: phenanthrene > pyrene > anthracene. Phenanthrene was removed almost completely (98%) within a few days, whereas pyrene had over 95% removal by day 40. The removal ratio of anthracene was dependent on its initial soil concentration: it was approximately 90% both at 20 DAS for a concentration of 50 ppm and at 40

DAS for a concentration of 100 ppm, but it never exceeded 50% for soil contaminated with 150 ppm. This pattern may be explained by the presence of bay-regions and K-regions in the molecular structure of phenanthrene and pyrene, which would be absent in anthracene. These regions are more likely to suffer oxidation and possible degradation by enzymes present in *M. sativa* L., including peroxidases released from the roots (Muratova *et al.* 2015). This phenomenon can also be explained by observing the absorption and migration capacity of these PAH in root and aerial tissues of *M. sativa* L. cv. Crioula, through fluorescence microscopy techniques. A recent study by Alves *et al.* (2017) detected, for the first time, the presence of PAH in tissues of *M. sativa* L. cv. Crioula by fluorescence microscopy, and showed differences in the relative intensity of PAH fluorescence in roots and leaves of cv. Crioula, observing high anthracene signals still in the roots, high signs of pyrene in the leaves, and low phenanthrene signs in both tissues, in plants cultivated for 40 days in PAH-amended soils, suggesting that these PAHs have different mobilities in cv. Crioula created by water solubility, where transport via xylem would favor the more efficient absorption of phenanthrene (1.15 mg.L^{-1}), followed by pyrene (0.135 mg.L^{-1}) and finally anthracene ($4.34 \times 10^{-2} \text{ mg.L}^{-1}$) (Alves *et al.* 2017).

5. Conclusions

M. sativa L. cv. Crioula suffered developmental changes when grown in soil with high levels of PAH contamination. In the 450 ppm total PAH treatment, plants exhibited drastic reductions in internode length, leaf size, and biomass. However, cv. Crioula showed great potential as a phytoremediation tool for agricultural, residential, and industrial Brazilian soils contaminated with pyrene, anthracene, and phenanthrene, growing even in the presence of high levels of these PAH and enhancing their removal. Our work also suggests that the tested PAHs were removed in the temporal order: phenanthrene before pyrene before anthracene, a sequence possibly influenced by the presence, in phenanthrene and in pyrene, of molecular regions more prone to oxidation as well as differences in the mobility of these PAHs within the plant, by differences in water solubility. Nevertheless, how these chemical mechanisms are linked to PAH phytoremediation is a question that requires further investigation. Defining PAH phytoremediation-related proteins in *M. sativa* L. via proteomic analyses may be the key to identifying these biochemical mechanisms.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Postgraduate Programs in Biochemistry – PPGBq (Programa de Pós-graduação em Bioquímica – PPGBq), and Oil and Biofuels Chemist (Programa Químico de Petróleo e Biocombustíveis – PQpetro) from the Chemistry Institute – IQ – UFRJ, Brazil. Finally, the authors would like to thank the *Publicação Científica* company by the translation and review of this manuscript to the English language.

Funding

The work was financially supported by CNPQ, CENPES, PETROBRAS, and the Brazilian Agency of Petroleum (Agência Nacional de Petróleo, Gás

e Biocombustíveis, ANP – Programa de Recursos Humanos) (PQ1-111.881/2013).

References

- Alves WS, Manoel EA, Santos NS, Nunes RO, Domiciano GC, Soares MR. 2017. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Medicago sativa* L. by fluorescence microscopy. *Micron*. 95:23–30. doi:10.1016/j.micron.2017.01.004. PMID: 28178583
- Baek KH, Kim HS, Oh HM, Yoon BD, Kim J, Lee IS. 2004. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J Environ Sci Health*. 39:2465–2472. doi:10.1081/ESE-200026309.
- Banjoo DR, Nelson PK. 2005. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *J Chromatogr A*. 1066:9–18. doi:10.1016/j.chroma.2005.01.033. PMID: 15794549
- Brinch UC, Ekelund F, Jacobsen CS. 2002. Method for spiking soil samples with organic compounds. *Appl Environ Microbiol*. 68(4):1808–1816. doi:10.1128/AEM.68.4.1808-1816.2002. PMID: 11916700
- Chen Y, Huang C, Bai C, Gao H, Ma R, Liu X, Dong Q. 2013. Benzo[*a*]pyrene repressed DNA mismatch repair in human breast cancer cells. *Toxicology*. 304:167–172. doi:10.1016/j.tox.2013.01.003. PMID: 23313663
- Cunningham SD, Ow DW. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol*. 110:715–719. doi:10.1104/pp.110.3.715. PMID: 12226213
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, Brazil, Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. 2014 [accessed 2018 Feb 16]. <http://cetesb.sp.gov.br/solo/publicacoes-e-relatorios/>
- Ekundayo EO, Emede TO, Osayande DI. 2001. Effects of crude oil spillage on growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in soils of midwestern Nigeria. *Plant Foods Hum Nutr*. 56:313–324.
- Fan S, Li P, Gong Z, Ren W, He N. 2008. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere*. 71:1593–1598. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.10.068. PMID: 18082869
- Flocco CG, Lo Balbo A, Carranza MP, Giulletti AM. 2002. Removal of phenol by alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) grown in hydroponics and its effect on some physiological parameters. *Acta Biotechnol*. 22(1–2):43–54. doi:10.1002/1521-3846(200205)22:1/2%3c43::AID-ABIO43%3e3.0.CO;2-3.
- Ferro A, Kennedy J, Doucette W, Nelson S, Jauregui G, Mc Farland B, Bugbee B. 1997. Fate of benzene in soils planted with alfalfa: uptake, volatilization, and degradation. In: Kruger EL, Anderson TA, Coats JR, editors. *Phytoremediation of soil and water contaminants*. Washington, D.C.: American Chemical Society. ACS Symposium Series 664. p. 223–237.
- Gao Y, Wu SC, Yu XZ, Wong MH. 2010. Dissipation gradients of phenanthrene and pyrene in the rice rhizosphere. *Environ Pollut*. 158:2596–2603. doi:10.1016/j.envpol.2010.05.012. PMID: 20542360
- Gao YZ, Zhu LZ. 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*. 55:1169–1178. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.01.037. PMID: 15081757
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Berkeley. Calif Agric Exp Stn*. 347:1–39.
- Harvey JP, Campanella BF, Castro PML, Harms H, Lichtfouse E, Schaffner AR, Smrcek S, Werck-Reichhart D. 2002. Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ Sci Pollut Res Int*. 9:29–47. doi:10.1007/BF02987315.
- Helaleh MIH, Al-Omair A, Nisar A, Gevao B. 2005. Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr A*. 1083:153–160. doi:10.1016/j.chroma.2005.05.085. PMID: 16078702
- Hester MW, Mendelssohn IA. 2000. Long-term recovery of a Louisiana brackish marsh plant community from oil-spill impact: vegetation response and mitigating effects of marsh surface elevation. *Mar Environ Res*. 49:233–254. doi:10.1016/S0141-1136(99)00071-9. PMID: 11285728

- Kirk JL, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT. 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environ. Pollut.* 133:455–465. doi:10.1016/j.envpol.2004.06.002. PMID: 15519721
- Landmeyer JE. 2012. Historical foundation, hydrologic control, and contaminant remediation. In: Landmeyer JE, editor *Introduction to phytoremediation of contaminated groundwater*. London: Springer. p. 3.
- Lemieux C, Long A, Lambert I, Lundstedt S, Tyskkind M, White PL. 2015. Cancer risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils determined using bioassay-derived levels of benzo[a]pyrene equivalents. *Environ Sci Technol.* 49(3):1797–1805. doi:10.1021/es504466b. PMID: 25549114
- Lau EV, Gan S, Ng HK. 2010. Extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *Int J Anal Chem.* (2010):1–9. doi:10.1155/2010/398381.
- Lee S-H, Lee W-S, Lee C-H, Kim C-J-G. 2008. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *J Hazard Mater.* 153:892–898. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.09.041. PMID: 17959304
- Ma B, Wang J, Xu M, He Y, Wang H, Wu L, Xu J. 2012. Evaluation of dissipation gradients of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice rhizosphere utilizing a sequential extraction procedure. *Environ. Pollut.* 162:413–421. doi:10.1016/j.envpol.2011.10.034. PMID: 22243893
- Merk N, Schultze-Kraft R, Infante C. 2005. Phytoremediation in the tropics - influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environ Pollut.* 138:86–91. doi:10.1016/j.envpol.2005.02.023. PMID: 15894414
- Martins CC, Bicego MC, Mahiques MM, Figueira RCL, Tessler MG, Montone RC. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil): sources and depositional history. *Marine Pollut Bull.* 63(5–12):452–458. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.03.017.
- Meire RO, Azeredo A, Torres JPM. 2007. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecologia Brasiliensis* 11 (2):188–201. doi:10.4257/oeco.2007.1102.03.
- Muratova A, Dubrovskaya E, Golubev S, Grinev V, Chemysheva M, Turkovskaya O. 2015. The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa*. *J Plant Physiol.* 188:1–8. doi:10.1016/j.jplph.2015.07.014. PMID: 26398627
- Pezeshki SR, Hester MW, Lin Q, Nyman JA. 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environ Pollut.* 108(2):129–139. doi:10.1016/S0269-7491(99)00244-4. PMID: 15092943
- Pilon-Smits EAH. 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol.* 56:15–39. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214. PMID: 15862088
- Rassini JB, Ferreira RP, Camargo AC. 2008. Cultivo e estabelecimento da alfafa. In: Embrapa, editor. *Cultivo e utilização da alfafa nos trópicos*. São Carlos (São Paulo): Embrapa pecuária sudeste. p. 39–51.
- Souza RC. 2008. Methodology for determining the polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments soils at the periphery of São Pedro's Dam – Juiz de Fora, MG [Dissertation]. Minas Gerais (BR): Institute of Exact Sciences, UFFJ. <https://oatd.org/oatd/record?record=oi%5C%3Awww.btd.uuff.br%5C%3A253>
- Silo-Suh L, Suh SJ, Sokol PA, Ohman DE. 2002. A simple alfalfa seedling infection model for *Pseudomonas aeruginosa* strains associated with cystic fibrosis shows AlgT (Sigma-22) and RhlR contribute to pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(24):15699–15704. doi:10.1073/pnas.242343999. PMID: 12426404
- Su YH, Zhu YG. 2008. Uptake of selected PAHs from contaminated soils by rice seedlings (*Oryza sativa*) and influence of rhizosphere on PAH distribution. *Environ Pollut.* 155:359–365. doi:10.1016/j.envpol.2007.11.008. PMID: 18331768
- Sun F, Littlejohn D, Gibson MD. 1998. Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. *Anal Chim Acta.* 364:1–11. doi:10.1016/s0002-2670(98)00186-X.
- Teng Y, Shen Y, Luo Y, Sun X, Sun M, Fu D, Li Z, Christie P. 2011. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *J Hazard Mater.* 186:1271–1276. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.126. PMID: 21177027
- USEPA - United State Environmental Protection Agency. 2000. Introduction to phytoremediation. Cincinnati (Ohio): (EPA/600/R-99/107).
- World Health Organization – WHO. 2012. Global Health Observatory (GHO) data. Exposure to ambient air pollution. [accessed 2014 Jan 06]. http://www.who.int/gho/phe/outdoor_air_pollution/en/.
- Wang MC, Chen YT, Chen SH, Chang CSW, Sunkara SV. 2012. Phytoremediation of pyrene contaminated soils amended with compost and planted with ryegrass and alfalfa. *Chemosphere.* 87(3):217–225. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.063. PMID: 22245074
- Wilcke W, Amelung W, Martius C, Garcia MVB, Zech W. 2000. Biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Amazonian rain forest. *J. Soil Sci Plant Nutrition.* 163:27–30. doi:10.1002/(SICI)1522-2624(200002)163:1%3c27::AID-JPLN27%3e3.0.CO;2-E
- Xu JG, Johnson RL. 1995. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediate and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant Soil.* 173(11):3–10. doi:10.1007/BF00155512.

Supplemental Data A

Recovery of the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons

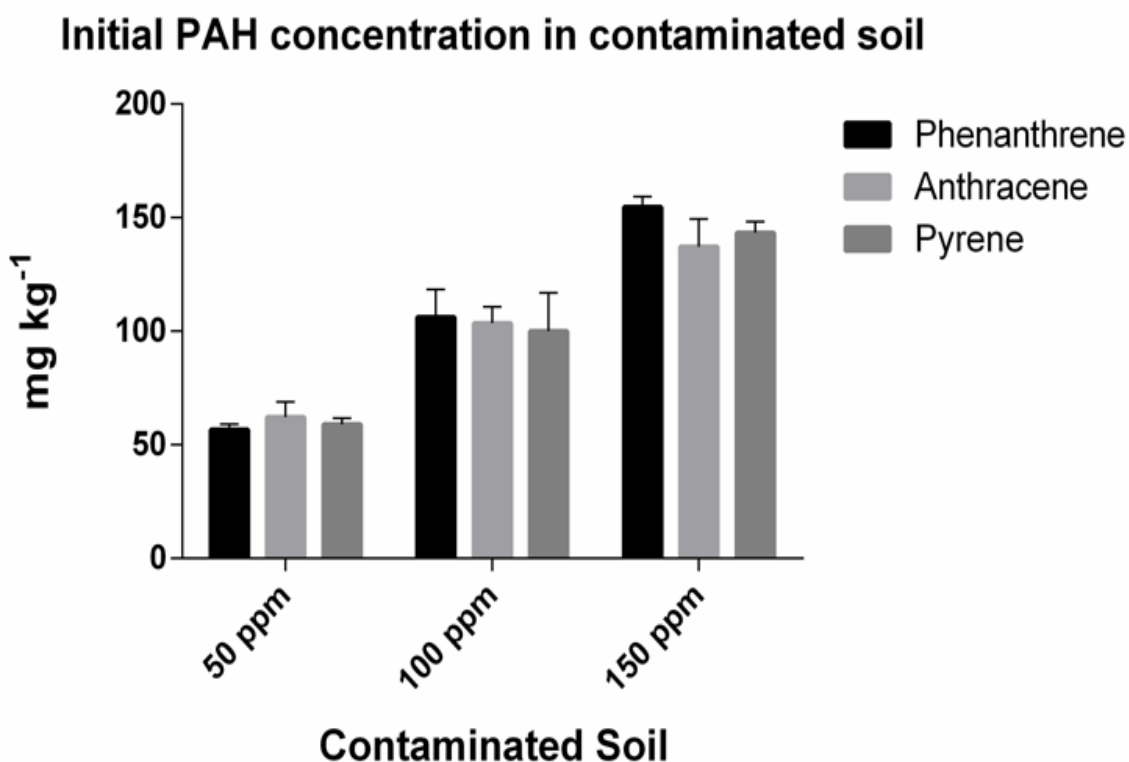
On the PAH extraction stage, the flasks containing the extracts had their mass determined by analytic scale after the solvent evaporation, where this mass was tared with the respective empty flasks. This way we obtained the mass in milligrams (mg) of the organic matter extract (MOE). On the extracts clean-up stage, the eluates were collected in tared flasks and left in the fume cupboard for the complete evaporation of the solvent. After this stage, the flasks containing the purified PAH were weighted (discounting the respective tare) in order to obtain the mass, in milligrams (mg), of the PAH extracted from the soil. The difference between the MOE and the mass of the purified PAH was used to determine the total initial PAH (purified and extracted after the soil contamination). The assays performed in biological triplicate. Given that for every 10 g of soil it was expected to find the respective mg: concentration (ppm) ratio of 1,5: 150; 3,0: 300 and 4,5: 450; the theoretical values were compared with the experimental as to determine the sample PAH recovery. The results obtained have shown a recovery of 1,28 mg \pm 0,2 of total PAH in soil contaminated with 150 ppm PAH; 2,98 mg \pm 0,4 of total PAH in soil contaminated with 300 ppm of PAH and 4,36 mg \pm 0,3 of total PAH in soil contaminated with 450 ppm of PAH (See table below).

Initial mass (mg) of total polycyclic aromatic hydrocarbons extracted and purified after soil contamination

Treatment	Control	150 ppm	300 ppm	450 ppm
Initial PAH Mass (theoretical)	ND	1,5	3,0	4,5
Initial PAH Mass (experimental)	ND	1,28 \pm 0,2	2,98 \pm 0,4	4,36 \pm 0,3

ND = Not Detected. Values represent the mean and standard deviation (n = 3) of samples containing 10 g of soil.

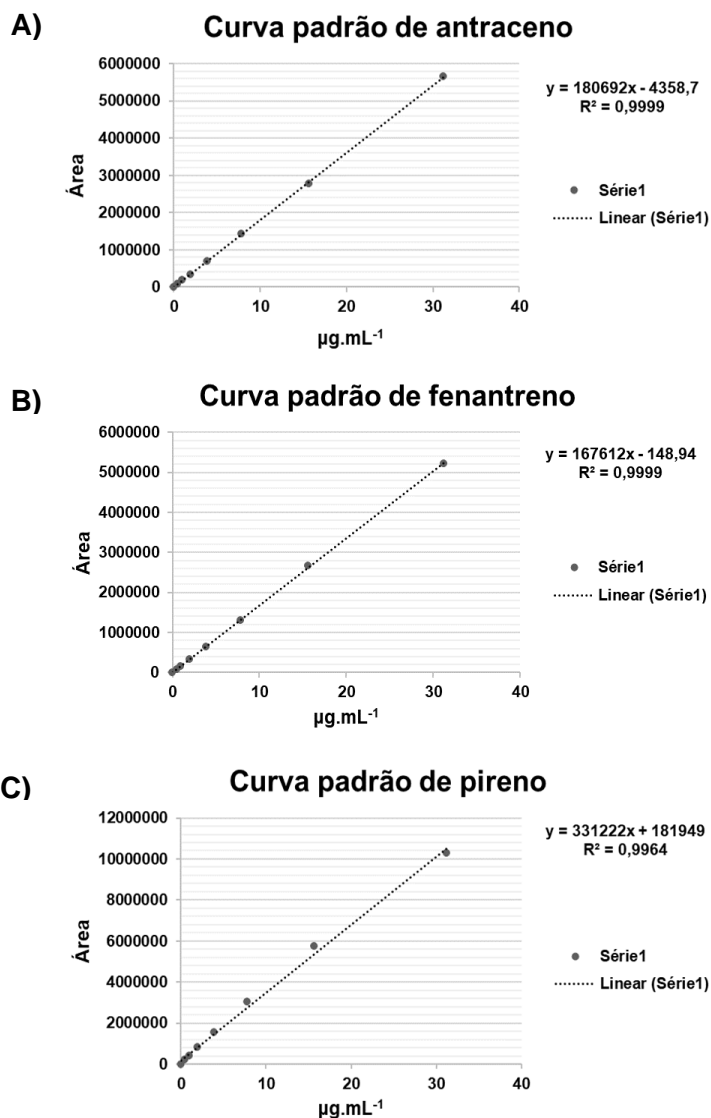
The mass values obtained experimentally were very close to the theoretical ones, validating the efficiency of the extraction methodology, being able to recover 85 - 99 % of the PAH present in the soil. The clean-up methodology was able to retain in the adsorption column most of the organic matter extracted and other interferents that would be injected in the HPLC. The contamination methodology presented satisfactory results concerning the distribution homogeneity of the contaminants in the soil. This was reflected by the low standard deviation of the samples (n=3) for each treatment. This control was confirmed by the HPLC quantitative analysis (See chart below)



Supplemental Data B

Analytical curves for determination of the concentration of each PAH

For calculate the removal rate of the PAHs we used the peak integration to obtain the each PAH areas and with the aid we of analytical curves determined the concentration of each PAH (see below), on each soil sample with and without *Medicago sativa L.* during 0, 20 and 40 days. These results were used to obtain the percentage of removal for these PAH in cultivated and non cultivated soils. For more details about the methodology, see Ref. 26 (Teng *et al.*, 2011).



Curvas analíticas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Antraceno (A), fenantreno (B) e pireno (C).