Efeitos da Exposição ao cobre e ao cromo em Macrófitas Aquáticas

Effects of Exposure to Copper and Chromium in Aquatic Macrophytes

Matheus Augusto de Souza Moura*, Débora Cristina de Souza†

RESUMO

A capacidade das plantas de resistir a metais pesados está associada ao desenvolvimento de diferentes ecótipos e estratégias intracelulares capazes de lidar com a prevenção, tolerância e desintoxicação do estresse por metais pesados. Este estudo teve como objetivo apresentar os efeitos fisiológicos da exposição ao cobre e cromo em *Eichhornia crassipes*, medindo a atividade de enzimas redutoras de oxidação (catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase). O experimento consistiu na exposição de 50 indivíduos da espécie em uma solução de cromo III a 150 ppm e cobre II a 150 ppm, por 48 h. A análise química dos metais foi realizada com espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado; catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase foram analisados por método colorimétrico em espectrofotometria. As alterações observadas nas atividades enzimáticas mostram que foi ativado o mecanismo de defesa das enzimas: catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase. Observando o comportamento do acúmulo de metais e enzimas associadas à atividade das enzimas, pode-se dizer que *Eichhornia crassipes* possui um sistema de defesa muito eficiente, o que o torna mais resistente ao cobre, além de acumulador de cromo nas raízes.

Palavras-chave: peroxidase, fitoquelatinas, poluição de água

ABSTRACT

The ability of plants to resist heavy metals is associated with the development of different ecotypes and intracellular strategies capable of dealing with the prevention, tolerance, and detoxification of heavy metal stress. This study aimed to present the physiological effects of exposure to copper and chromium in *Eichhornia crassipes*, by measuring the activity of oxidation-reducing enzymes (catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase). The experiment consisted on exposng 50 individuals of specie to a solution of chromium III at 150 ppm and copper II at 150 ppm, for 48 h. Chemical analysis of the metals was performed with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry; catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase were analyzed by colorimetric method in spectrophotometry.The observed changes in the enzymes activities show the defense mechanisms of the enzymes were activated mechanism of the enzymes: catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase. Observing the behavior of metal accumulation, and enzymes associated with the activity of the enzymes, it can be said that *Eichhornia crassipes* has a very efficient defense system, which makes it more resistant to copper, and an accumulator of chromium in the roots.

Keywords: peroxidase, phytochelatins, water pollution.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a contaminação de corpos d'água não é recente. No ano 2000 a. C., os egípcios já observaram as consequências de uma água inadequada para consumo, levando-os a buscar formas de purificá-la (COELHO; HAVENS, 2015).

* Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; mouram@alunos.utfpr.edu.br
† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão; dcsouza@utfpr.edu.br

De acordo com a resolução CONAMA 357/2005, rios com águas adequadas para consumo devem ser enquadrados como classe 1, quando submetido a tratamento convencional ou avançado. Já a classe especial, consiste nos rios em que não podem ser verificados efeitos tóxicos crônicos nos organismos, não pode haver materiais flutuantes, incluindo espumas não naturais, a concentração de clorofila α, não deve ultrapassar 10 µg/L, cromo total deve ser menor que 0,05 mg/L Cr, cobre dissolvido menor que 0,009 mg/L Cu, entre outros parâmetros citados na resolução.

Para resolver casos de contaminação, a comunidade científica e acadêmica está sempre buscando meios de remediação. Um deles é a possibilidade do uso de plantas, que vem crescendo ao longo dos anos, tornando-se uma alternativa emergente para restauração das áreas contaminadas (ASSUNÇÃO, 2012). Em suma, o método que utiliza as plantas como forma de remediação é denominado fitorremediação. Os contaminantes extraídos do meio se acumulam nas plantas, sem degradação, para que depois sejam descartados adequadamente. Andrade, Tavares e Mahler (2014) definem que a seleção das espécies a serem utilizadas depende de fatores como tolerância aos metais, alto fator de bioacumulação e curto ciclo de vida. As macrófitas aquáticas são as mais aplicadas, sendo necessário avaliar a disponibilidade dos indivíduos da região e testar se sobreviveriam em outro ambiente, uma vez que as respostas podem variar (PIO, 2012).

De acordo com Ferreira et al. (2016), o Brasil tem a maior riqueza de espécies aquáticas continentais do mundo, tendo um enorme potencial econômico e social quando manejadas adequadamente. As macrófitas aquáticas são de grande importância ecológica, protegendo a fauna aquática e as margens dos rios, bem como abrigando espécies que incorporam a biodiversidade local (SANTINO; BIANCHINI, 2011).

De acordo com Rodrigues et al. (2016), as características fisiológicas desse grupo de plantas favorecem seu uso para a fitorremediação, no intuito de retirar, inertizar ou conter poluentes do ambiente. As macrófitas hiperacumuladoras são muito utilizadas nos processos de fitoextração, justamente por serem capazes de armazenar altos níveis de metais, diminuindo sua concentração no meio em que estão inseridas.

Assim, buscando contribuir com o conhecimento a respeito da utilização de macrófitas aquáticas na fitorremediação, o presente trabalho tem por objetivo avaliar, em pequena escala, a espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.), a fim de determinar se seria uma alternativa como metodologia de remediação de áreas impactadas, especialmente águas com excesso de cromo e cobre.

2 MÉTODO

Para simular um efluente contaminado com metal pesado, foram preparadas duas soluções, sendo uma de nitrato de cromo III ($Cr(NO_3)^3.9H_2O$) e outra de nitrato de cobre II ($Cu(NO_3)^2.3H_2O$). As soluções foram preparadas na concentração de 150 ppm.

Foram distribuídos 0,2 L de solução de cromo em doze vasilhames de poliestileno. Em quatro desses vasilhames, foram alocados três indivíduos de *Eichhornia crassipes*. O procedimento inteiro foi repetido para a solução de cobre. Outros dois vasilhames com as mesmas quantidades de plantas, foram mantidos como controle contendo apenas água. A partir dessa montagem inicial, com 24h de experimento foram retirados indivíduos das três espécies e amostras das duas soluções. A segunda retirada, que foi também a última, ocorreu da mesma forma, com 48h.

Todos os indivíduos retirados foram separados em amostras de raiz e folha. Imediatamente, eram congelados para impedir alterações nas atividades enzimáticas. Posteriormente, amostras de 200 mg de folhas e 50 mg de raízes foram maceradas e digeridas para as análises de concentração de metal e atividade enzimática.

2.1 Determinação da concentração de metais

A preparação das amostras ocorreu da seguinte forma: inicialmente homogeneizou-se a amostra e transferiu-se 100 mL do extrato para um erlenmeyer, e foram adicionados 3 mL de ácido nítrico (HNO_3) concentrado (65%). Em seguida, aqueceram-se as amostras a uma temperatura de 130ºC. Uma quantidade de 2 mL de ácido clorídrico (HCl) foi acrescentada às amostras após 20 minutos e o processo de evaporação se deu até que o volume fosse reduzido a 10 mL. As amostras foram transferidas para tubos de ensaio para serem centrifugadas a 1000 rpm por 30 minutos e posteriormente filtradas, utilizando papel de filtro quantitativo. As amostras vegetais passaram pelo mesmo processo, utilizando-se 200 mg de folhas e raízes secas, separadamente.

As amostras foram lidas e analisadas no Laboratório de Análises Agronômicas da Universidade Federal do Paraná, pelo método da espectrofotometria de absorção atômica com fonte de plasma.

2.2 Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade das Enzimas Catalase (CAT), utilizou-se como base o método de Kraus, McKersie e Fletcher (1995) com contribuições de Azevedo et al. (2002), por espectrofotometria a 240 nm, por uma análise contínua de dois minutos com intervalos de dois segundos.

Do extrato enzimático, foram utilizados 150 µL em solução de reação contendo 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (0,5 M), pH 7,5, e, por último, foram adicionados 2,5 µL de H_2O_2 0,0125 M. A atividade foi determinada de acordo com a decomposição do peróxido de hidrogênio e calculada pelo coeficiente de extinção, do peróxido de hidrogênio, de 2,8 $M.cm^{-1}$, com resultados expressos em µmol/min/mg de proteína.

A determinação da atividade da Ascorbato Peroxidase (APX) baseou-se em Zhu et al. (2004). Foram utilizados 150 µL do extrato enzimático e adicionou-se uma mistura reacional contendo 2 mL de solução tampão de fosfato de sódio (25 mM), pH 7,0, com 0,1 mM de EDTA, 0,25 mM de ascorbato e por fim, 1,0 mM de H_2O_2.

Da mesma forma que a determinação da atividade da CAT, a APX foi determinada pelo decréscimo de peróxido de hidrogênio na reação por espectrofotometria, por dois minutos, com intervalo de dois segundos a 290 nm e coeficiente de extinção de 2,8 $M.cm^{-1}$, com resultados em µmol/min/µg de proteína.

A Guaiacol Peroxidase (GPX) teve sua atividade determinada com base na técnica descrita por Matsuno e Uritani (1972). A mistura de reação utilizada foi de 250 µL de tampão fosfato-citrato (uma solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M, com pH 5,0), além de 150 µL de extrato enzimático e 25 µL de guaiacol 0,5%, misturados em vórtex com 25 µL de solução de H_2O_2. A solução foi levada à estufa a 30ºC por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 25 µL de solução de meta bissulfito de sódio a 2%, e novamente agitado em vórtex, seguido por repouso de 10 minutos.

Após a conclusão desse procedimento, a leitura da atividade da GPX no espectrofotômetro deu início, utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm, por um minuto com intervalos de dois segundos. O coeficiente de extinção utilizado para os cálculos foi de 26,6 $M.cm^{-1}$. Os resultados foram expressos em µmol/min/µg de proteína.

3 RESULTADOS

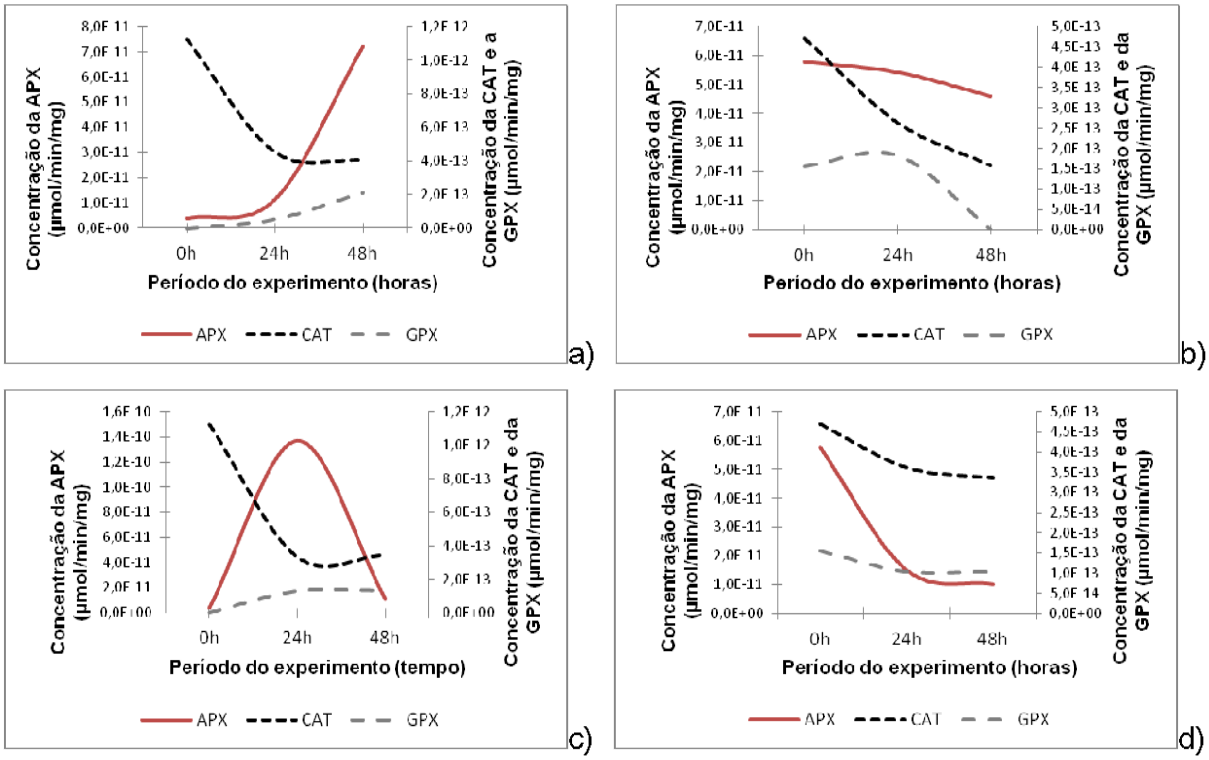
A absorção de metais ocorreu em sua maioria nas raízes e nas primeiras 24 horas (TABELA 1). Embora na solução final de *E. crassipes* a concentração de cromo seja igual à inicial, houve um aumento de 47% da concentração deste metal nas raízes. Rodrigues et al. (2016), em estudo de absorção de Cd por *E. crassipes*, relatam que essa macrófita acumulou mais de 88% do metal em suas raízes.

Tabela 1 - Concentração de Cromo e Cobre Nas Porções Aéreas e de Absorção de *Eichhornia crassipes* e nas Soluções de Metais

	Cromo			Cobre		
	Folha (mg/kg)	Raiz (mg/kg)	Solução (mg/L)	Folha (mg/kg)	Raiz (mg/kg)	Solução (mg/L)
Eichhornia crassipes						
0h	10,6	39,4	180,9	10,9	41,6	130,4
24h	16,9	90,7	17,8	16,0	149,0	33,3
48h	16,3	74,1	183,6	7,5	51,7	148,0

FONTE: Autoria própria .

Figura 1 - Variação da Concentração das Enzimas Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Guaiacol Peroxidase (GPX) na Folha e Raiz de *Eichhornia Crassipes* No Experimento De Fitoextração de Soluções de Cromo e Cobre, em A) Amostra de Folha em Solução De Cromo; B) Amostra de Raiz em Solução de Cromo; C) Amostra de Folha em Solução de Cobre; D) Amostra de Raiz em Solução de Cobre



FONTE: Autoria própria.

A GPX teve uma atividade extremamente baixa, quando comparada com a CAT e APX (FIGURAS 1a, 1b e 1c). Como GPX está diretamente ligada à proteção da parede celular, isto pode indicar que ocorreu acúmulo de metal no interior das células, fazendo com que estas ficassem debilitadas, o que pode ser observado, principalmente após as 48 horas, quando muitas plantas desprendiam folhas e raízes com extrema facilidade.

O contato de compostos metálicos com a membrana plasmática está associado a diversos danos metabólicos, em consequência de diferentes processos, como as ligações com grupos sulfidrila das proteínas,

peroxidação dos lipídeos, inativação de proteínas chave e mudanças na composição e fluidez da membrana lipídica (ROMERO-PUERTAS et al., 2006).

Na solução de cromo, a atividade da APX, representada em um eixo principal, aumentou abruptamente na folha de *E. crassipes* a partir de 24 horas de experimento e apresentou queda na raiz (FIGURAS 1a e 1b) neste mesmo período. A atividade da enzima APX em *E. crassipes* se destacou na solução de cobre, na qual ocorreu o maior acúmulo (TABELA 1), nas primeiras 24 horas, respondida pelo aumento na atividade da enzima na folha e queda na raiz nesse mesmo período (FIGURAS 1c e 1d).

Com os dados de acúmulo de metais em E. crassipes é possível notar que a planta não transportou cromo para as folhas, enquanto na raiz houve um aumento da concentração nas primeiras 24 horas, seguido de uma diminuição a partir desse período (TABELA 1). Representadas no gráfico em um eixo secundário, em linhas tracejadas, é possível perceber que a GPX e a CAT obtiveram uma atividade muito menor que a APX nessa espécie no período do experimento (FIGURA 1). Para os dois metais e nas duas porções vegetais, a atividade da CAT diminuiu, tendendo a zero. O mesmo ocorre com a GPX, com exceção na folha em solução de cromo, que tendeu a aumentar levemente (FIGURA 1a).

4 CONCLUSÃO

Nas concentrações iniciais de cromo e cobre do experimento, *E. crassipes* não obteve sucesso. Houve um acúmulo considerável dos dois metais nas raízes nas primeiras 24 horas, mas nas 24 horas seguintes a concentração diminuiu nas porções vegetais e retornou para as soluções.

Com exceção da APX nas amostras de folhas de cromo e cobre de *E. crassipes*, que em cromo apenas aumentou e em cobre aumentou e diminuiu em seguida, a concentração das enzimas nessa planta caiu em relação à concentração inicial.

Apesar do baixo desempenho de *E. crassipes* no transporte dos metais o fato da espécie ser capaz de se proteger dos efeitos danosos dos metais, permite que seja indicada para tratamentos em ambientes contaminados por cromo e cobre.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, essencial no meu processo de formação, além de possibilitar a realização deste projeto pelas bolsas de iniciação científica.

À minha Professora Orientadora Débora Cristina de Souza por seus conselhos e orientação que me permitiram realizar este projeto.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. C. da M.; TAVARES, S. R. de L.; MAHLER, C. F. Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental. Edição digital. São Paulo: Oficina de Textos, 2014.

ASSUNÇÃO, L. P. G.; ROHLFS, D. B. Biorremediação em áreas contaminadas. Trabalho apresentado na Semana de Ciência e Tecnologia da PUC Goiás, Goiânia, 2012.

COELHO, R. M. P.; HAVENS, K. Água e a história humana. In: COELHO, R. M. P.; HAVENS, K. Crise nas águas. 1ª ed. Belo Horizonte: Recóleo, 2015. p. 18-21.

RODRIGUES, A. C. D.; SANTOS, A. M.; SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; SOBRINHO, N. M. B. A. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. Revista Virtual de Química, Niterói, v. 8, n. 1, p. 262-276, jan. 2016.

ROMERO-PUERTAS, M. C.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; LETERRIER, M.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; DEL RÍO, L. A.; PALMA, J. M. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. New Phytologist, v. 170, n. 1, p. 43-52, 2006.

KRAUS, T. E.; MCKERSIE B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-Induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Increased Antioxidant Enzyme Activity. Plant Physiology, v. 145, n. 4, p. 570-576, fev. 1995.

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

SANTINO, M. B. da C.; BIANCHINI JR., I. Colonização de macrófitas aquáticas em ambientes lênticos. Boletim ABLimno, São Carlos, v. 39, n. 1, p. 1-14, fev. 2011.

FERREIRA, F. A.; POTT, A.; POTT, V. J.; LATINI, R. O.; RESENDE, D. C. Macrófitas aquáticas. In: LATINI, A. O.; RESENDE, D. C.; POMBO, V. B.; CORADIN, L. (Org.). Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil. Brasília: MMA, 2016. p. 657-726.

ZHU, X.; RAINA, A. K.; LEE, H. G.; CASADEUS, G.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. Brain Research, v. 1000, n. 1-2, p. 32-39, mar. 2004.

PIO, M. C. S. Estudo da viabilidade da remoção de metais potencialmente tóxicos de um igarapé da região do Polo Industrial de Manaus (PIM) utilizando um sistema piloto de tanque com macrófita e wetland construído. 2012. 105 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. Physiologia Plantarum, v. 104, n. 2, p. 280-292, jan. 2002.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, n. 53, 18 mar. 2005. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>.