

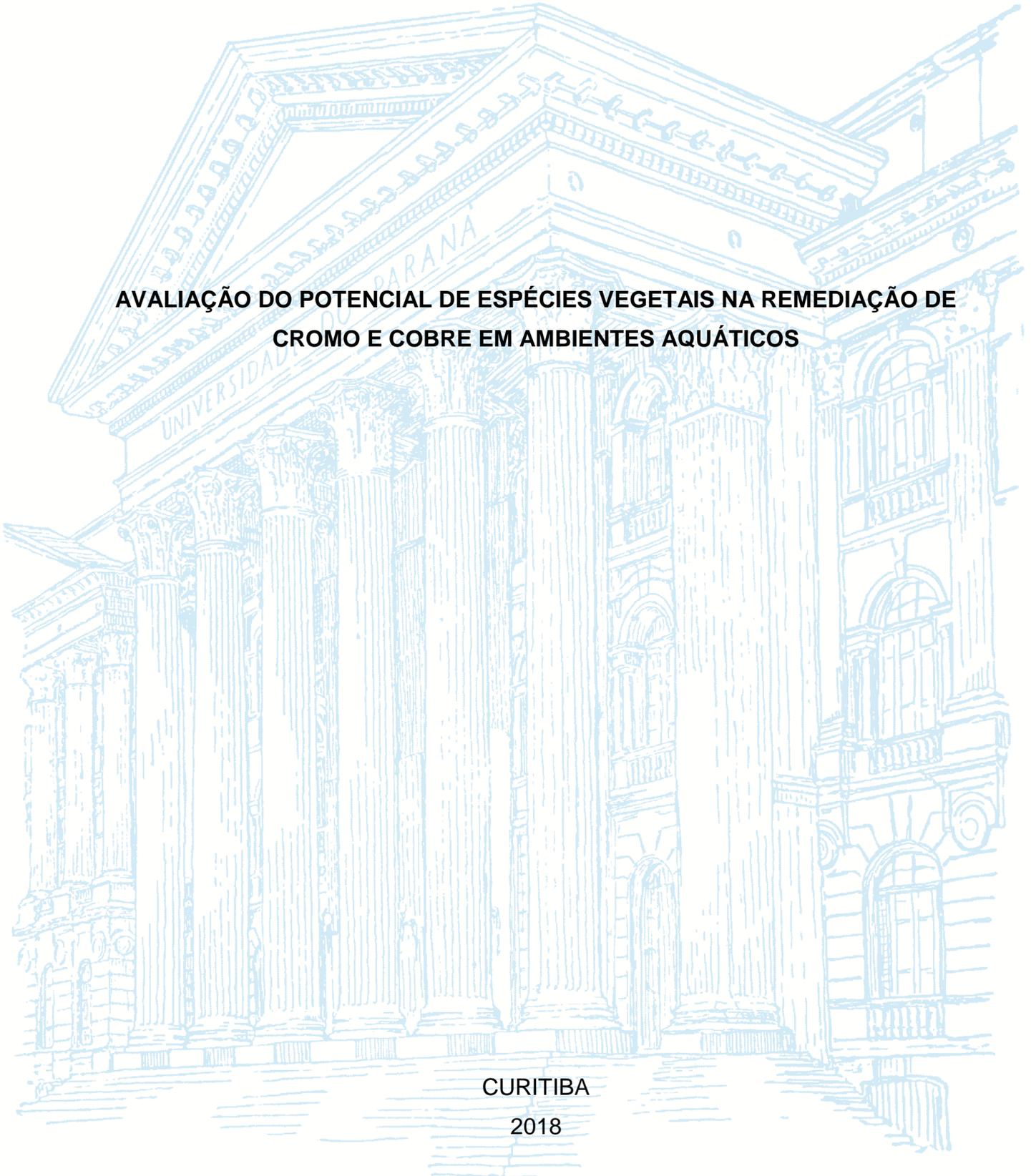
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CARLA FONTANELLI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ESPÉCIES VEGETAIS NA REMEDIAÇÃO DE  
CROMO E COBRE EM AMBIENTES AQUÁTICOS**

CURITIBA

2018



ANA CARLA FONTANELLI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ESPÉCIES VEGETAIS NA REMEDIAÇÃO DE  
CROMO E COBRE EM AMBIENTES AQUÁTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia Ambiental, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sandro José Froehner

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Débora Cristina Souza

CURITIBA

2018



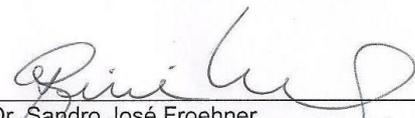
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE TECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

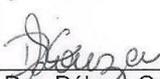
## TERMO DE APROVAÇÃO DE PROJETO FINAL

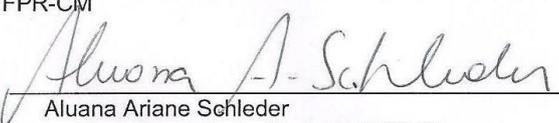
ANA CARLA FONTANELLI

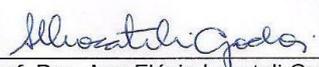
### AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ESPÉCIES VEGETAIS NA REMEDIAÇÃO DE CROMO E COBRE EM AMBIENTES AQUÁTICOS

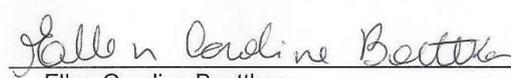
Projeto Final de Curso, aprovado como requisito parcial para a obtenção do Diploma de Bacharel em Engenharia Ambiental no Curso de Graduação em Engenharia Ambiental do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, com nota 9,5, pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a):   
Prof. Dr. Sandro José Froehner  
Departamento de Engenharia Ambiental / UFPR

Co-orientador(a):   
Prof. Dra. Débora Cristina de Souza  
Departamento Acadêmico de Biodiversidade e Conservação da  
Natureza / UTFPR-CM

Membro(a) 1:   
Aluana Ariane Schleder  
Departamento de Geologia / UFPR

Membro(a) 2:   
Prof. Dra. Ana Flávia Locateli Godoi  
Departamento de Engenharia Ambiental / UFPR

Membro(a) 3:   
Ellen Caroline Baettker  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e  
Ambiental / UFPR

Curitiba, 07 de dezembro de 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Cristina e Maurício, por todo suporte, amor e carinho que me deram todos esses anos.

Aos meus irmãos, Carolina e Rodrigo, que estiveram comigo em todos os momentos, fossem bons ou ruins.

Às minhas avós, Josefa e Leyda, que sempre foram mulheres que me inspiraram a seguir meus sonhos, sejam eles quais fossem.

À minha família e agregados que a todo o momento torceram por mim nessa jornada.

À Universidade Federal do Paraná que me concedeu ensinamentos e amigos incríveis.

Ao professor Sandro pela oportunidade de aprendizado e por ceder um espaço no laboratório LAMIR para que eu pudesse trabalhar no projeto.

À professora Débora Souza que aceitou ser minha coorientadora ao longo deste ano e foi sempre presente e paciente em todos os momentos que precisei.

À banca avaliadora, Aluana Schleder, Ellen Baettker e professora Ana Flávia Godoi, por contribuírem e auxiliarem nesse trabalho.

Aos meus amigos e amigas que participaram de cada pedacinho da minha vida, deixando meus dias mais alegres e me motivando a seguir em frente!

A todos os professores e aqueles que contribuíram para o meu desenvolvimento nesses cinco anos, permitindo que eu chegasse até esse momento.

“Poderia me dizer, por favor, que caminho  
devo tomar para ir embora daqui?”

“Depende bastante de para onde quer ir”,  
respondeu o Gato.

“Não me importa muito para onde”, disse  
Alice.

“Então não importa que caminho tome”,  
disse o Gato.

**(Aventuras de Alice no País das  
Maravilhas. CARROLL, L. 2010)**

## RESUMO

A contaminação de corpos hídricos é um problema atemporal. Uma das formas de solucionar essa questão é por meio da fitorremediação, uma forma de biorremediação que utiliza plantas, em especial as macrófitas aquáticas. Uma das formas de contaminação é por metais pesados, que apesar de serem encontrados naturalmente no ambiente, o aumento de suas concentrações pode ser tóxico à flora e fauna. No intuito de estudar o potencial fitorremediador das espécies *Eichhornia crassipes*, *Salvinia biloba* e *Pistia stratiotes*, foi montado um experimento utilizando duas soluções que simulavam dois efluentes, com concentração de 150 ppm, de cromo e cobre. Indivíduos de cada espécie foram distribuídos em recipientes que continham as soluções e foram feitas análises com 24 horas de experimento e com 48 horas. As concentrações de metal, atividades enzimáticas e as clorofilas  $\alpha$ ,  $b$  e  $c$ , foram analisadas por espectrofotometria. As metalotioneínas foram analisadas por cromatografia líquida. *P. stratiotes* teve o maior fator de bioacumulação e os dados da concentração de cobre corroboram o valor encontrado. Apesar do fator de bioacumulação de cromo para *S. biloba* ter sido menor, o comportamento das enzimas e da clorofila mostrou que essa foi eficiente na absorção de cromo, como mostram os valores de acúmulo desse metal nas raízes. *E. crassipes* não suportou a concentração a que foi exposta por mais de 24 horas. Para um efluente nas condições apresentadas, *P. stratiotes* e *S. biloba* se mostraram mais adequadas para a remediação.

Palavras-chave: Fitorremediação. Macrófitas aquáticas. Metais pesados.

## ABSTRACT

The contamination of water bodies is a timeless problem. One way to solve this issue is through phytoremediation, a form of bioremediation that uses plants, especially aquatic macrophytes. One of the ways of contaminations is by heavy metals, that are found naturally in the environment but the increase in their concentrations can be toxic to flora and fauna. In order to study the phytoremediation potential of the species *E. crassipes*, *S. biloba* and *P. stratiotes*, an experiment was set up using two solutions that simulated two effluents with a concentration of 150 ppm of chromium and copper. Individuals of each species were distributed in containers containing the solutions and analyzes were performed with 24 hours of experiment and 48 hours. The concentrations of metal, enzymatic activities and chlorophylls  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  were analyzed by spectrophotometry. The metallothioneins were analyzed by liquid chromatography. *P. stratiotes* had the highest bioaccumulation factor and copper concentration data corroborate the value found. Although the chromium bioaccumulation factor for *S. biloba* was lower, the behavior of the enzymes and chlorophyll showed that the species was efficient in the absorption of chromium, as shown by the accumulation values of this metal in the roots. *E. crassipes* couldn't stand the concentration that has been exposed for more than 24 hours. For an effluent under the conditions presented previously, *P. stratiotes* and *S. biloba* were more suitable for remediation.

Key words: Phytoremediation. Aquatic macrophytes. Heavy metals.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - INDIVÍDUOS DE <i>Eichhornia crassipes</i> .....	22
FIGURA 2 - INDIVÍDUOS DE <i>Salvinia biloba</i> .....	23
FIGURA 3 - INDIVÍDUOS DE <i>Pistia stratiotes</i> .....	24
FIGURA 4 - MEMORIAL DO RIO IGUAÇU LOCALIZADO NO PARQUE DA IMIGRAÇÃO JAPONESA.....	28
FIGURA 5 - EXEMPLO DE CROMATOGRAMA GERADO PELO CLAE PARA IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DE GLUTATIONA E FITOQUELATINAS.....	32
FIGURA 6 - EXTRAÇÃO DO PIGMENTO DE CLOROFILA COM AUXÍLIO DO GRAL E DO PISTILO.....	34
FIGURA 7 - CROMATOGRAMA GERADO PELO PROGRAMA DO CLAE QUE REPRESENTA O PICO DE GLUTATIONA E OS DOS TIÓIS DE CISTEÍNA (1 GLUTATIONA (GSH), 2 CISTEÍNA E 3 FITOQUELATINAS (PC)).....	38
FIGURA 8 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS CATALASE (CAT), ASCORBATO PEROXIDASE (APX) E GUAICOL PEROXIDASE (GPX) NA FOLHA E RAIZ DE <i>Eichhornia crassipes</i> 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.....	41
FIGURA 9 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS CATALASE (CAT), ASCORBATO PEROXIDASE (APX) E GUAICOL PEROXIDASE (GPX) NA FOLHA E RAIZ DE <i>Salvinia biloba</i> 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 COBRE.....	42
FIGURA 10 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS CATALASE (CAT), ASCORBATO PEROXIDASE (APX) E GUAICOL PEROXIDASE	

(GPX) NA FOLHA E RAIZ DE *Pistia stratiotes* 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 COBRE .....43

FIGURA 11 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CLOROFILAS  $\alpha$ , b E c EM *Eichhornia crassipes*, EM a) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE CROMO; b) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE COBRE 44

FIGURA 12 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CLOROFILAS  $\alpha$ , b E c EM *Salvinia biloba*, EM a) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE CROMO; b) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE COBRE .....45

FIGURA 13 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CLOROFILAS  $\alpha$ , b E c EM *Pistia stratiotes*, EM a) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE CROMO; b) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE COBRE .....45

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DE CROMO E COBRE NAS PORÇÕES AÉREAS E DE ABSORÇÃO DE <i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Salvinia biloba</i> E <i>Pistia stratiotes</i> E NAS SOLUÇÕES DE METAIS.....	36
TABELA 2 - FATORES DE BIOACUMULAÇÃO .....	37
TABELA 3 - DADOS DE CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA E DE FITOQUELATINAS NA FOLHA E RAIZ DE <i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Salvinia biloba</i> E <i>Pistia stratiotes</i> OBTIDOS POR CLAE .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

a.C.	- Antes de Cristo
APX	- Ascorbato peroxidase
CAT	- Catalase
CHES	- Ácido 2-(N-ciclohexalamino)
CLUE	- Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
DTPA	- Ácido dietilenotriamino pentacético
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetracético
ERO	- Espécies Reativas de Oxigênio
GPX	- Guaiacol peroxidase
GSH	- Glutathiona
MBB	- Monobromobimano
PC	- Fitoquelatina
TCA	- ácido trifluoroacético
UV	- Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$	- microlitro
$\mu\text{m}$	- micrômetro
As	- arsênio
Cd	- cádmio
cm	- centímetro
Co	- cobalto
Cr	- cromo
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$	- dicromato
$\text{CrO}_4^{-2}$	- cromato
Cu	- cobre
FB	- Fator de Bioacumulação
h	- horas
$\text{H}_2\text{O}_2$	- peróxido de hidrogênio
HCl	- ácido clorídrico
Hg	- mercúrio
$\text{HNO}_3$	- ácido nítrico
kDa	- quilodalton
L	- litro
M	- molar
mg	- miligrama
mL	- mililitro
mm	- milímetro
mM	- milimolar
Ni	- níquel
nm	- nanômetro
$\text{OH}^-$	- radical hidroxila
Pb	- chumbo
ppm	- partes por milhão
rpm	- rotações por minuto
Se	- selênio
Zn	- zinco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS .....	17
1.1.1 Objetivo geral .....	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1 METAIS PESADOS.....	18
2.1.1 Cromo.....	19
2.1.2 Cobre.....	19
2.2 BIORREMEDIAÇÃO .....	20
2.2.1 Fitorremediação .....	20
2.3 MACRÓFITAS AQUÁTICAS .....	21
2.3.1 <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.....	21
2.3.2 <i>Salvinia biloba</i> Raddi emend. de La Sota.....	22
2.3.3 <i>Pistia stratiotes</i> L.....	23
2.4 MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS.....	24
2.4.1 Catalase (CAT).....	25
2.4.2 Ascorbato peroxidase (APX) .....	26
2.4.3 Guaiacol peroxidase (GPX).....	26
2.4.4 Fitoquelatinas e metalotioneínas.....	26
2.4.5 Glutaciona .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
3.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA .....	28
3.2 O EXPERIMENTO .....	29
3.2.1 Determinação da concentração de metais .....	30
3.2.1.1 Fator de bioacumulação .....	30
3.2.2 Preparação do extrato de enzima .....	30
3.2.3 Derivação de tióis.....	31
3.2.4 Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT) .....	32
3.2.5 Determinação da atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) .....	33
3.2.6 Determinação da atividade enzimática da guaiacol peroxidase (GPX) .....	33
3.2.7 Cálculos das atividades enzimáticas.....	33
3.2.8 Determinação da clorofila.....	34

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>36</b>
4.1 CONCENTRAÇÃO DE METAIS.....	36
4.2 ANÁLISE DAS METALOTIONEÍNAS.....	38
4.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	40
4.4 DETERMINAÇÃO DA CLOROFILA.....	44
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

## 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). Quando a água utilizada para abastecimento se encontra abaixo dos padrões de qualidade, ela se torna um problema para a saúde humana. 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, ou classe especial. Ou seja, não podem ser verificados efeitos tóxicos crônicos nos organismos, não pode haver materiais flutuantes, incluindo espumas não naturais, a concentração de clorofila  $\alpha$ , não deve ultrapassar 10  $\mu\text{g/L}$ , 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.

Sperling (1995) enumerou as seguintes fontes como as principais poluidoras de rios urbanos: esgotos domésticos não tratados, agricultura, mineração e atividades industriais. Os efluentes industriais e lodos da agricultura podem conter metais pesados. Esses, por sua vez, são considerados tóxicos aos seres humanos, flora e fauna. Elementos como arsênio (As), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), selênio (Se) e zinco (Zn), em pequenas quantidades, são de extrema importância para os organismos. O problema está no momento em que as elevadas concentrações tornam-se insuportáveis à sobrevivência de algumas espécies, levando ao desequilíbrio no ambiente.

Para resolver casos de contaminação em corpos hídricos, a comunidade científica e acadêmica está sempre buscando meios de remediação. Um deles é a possibilidade do uso de plantas, uma forma de biorremediação, 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 nos tecidos das 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).

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, as espécies *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Salvinia biloba* Raddi Emend. de La Sota e *Pistia stratiotes* L., a fim de determinar se essas seriam boas alternativas como metodologia de remediação de áreas impactadas, especialmente águas com excesso de cromo e cobre.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial de remediação, em pequena escala, das espécies *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Salvinia biloba* Raddi Emend. de La Sota e *Pistia stratiotes* L., encontradas na região de Curitiba, imersas em solução de cromo III e de cobre II.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a capacidade de sobrevivência das espécies selecionadas em soluções saturadas de cromo III e cobre II;
- Avaliar em quais porções vegetais (submersas ou aéreas) ocorreu o maior acúmulo de metal;
- Verificar o efeito do estresse causado pelo acúmulo de metal sobre o metabolismo enzimático e a concentração de clorofilas das espécies estudadas;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A falta de consciência ambiental da população leva à crescente disposição incorreta de resíduos, sejam eles industriais ou domésticos (VIEIRA et al., 2011). Muitos desses resíduos acabam em corpos hídricos, causando inúmeros danos à dinâmica do ecossistema, prejudicando a fauna e a flora local, além de causar problemas à saúde humana caso não ocorra um tratamento adequado.

As técnicas de remediação *in situ* estão sendo cada vez mais aplicadas no mundo, devido aos baixos custos e por não haver a necessidade do transporte para realizar a descontaminação (TAVARES, 2009). A fitorremediação é uma das formas de biorremediação que pode ser bastante útil nesse objetivo, por utilizar plantas específicas no processo (COUTINHO; BARBOSA, 2007).

A fitorremediação pode ser estudada para outras espécies de macrófitas aquáticas, diferentes das citadas nesse trabalho, e outros tipos de contaminantes. Dessa forma, as diferentes pesquisas envolvendo a utilização de plantas como forma de biorremediar áreas contaminadas contribuem no objetivo de expandir o conhecimento de novas soluções ambientais para os diferentes problemas envolvendo poluição que são enfrentados atualmente.

### 2.1 METAIS PESADOS

Metal pesado é um termo amplamente associado a elementos contaminantes e potencialmente tóxicos. No entanto, essa utilização por si só é equivocada. Há outras definições aplicáveis, segundo as quais esses elementos podem ser classificados pela densidade, peso atômico, número atômico e a mais usual que seriam os elementos utilizados em indústrias, que podem ser tóxicos ao ecossistema de uma forma geral. Nessa categoria podemos incluir As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Se e Zn (DUFFUS, 2002).

Em pequenas quantidades, algumas espécies de macrófitas aquáticas se utilizam do metal para o seu desenvolvimento. No entanto, desde a revolução industrial, a concentração desses elementos no ambiente vem aumentando de forma alarmante, prejudicando o crescimento das espécies (DIXIT et al., 2015).

As resoluções 357/2005 e 430/2011 do CONAMA dispõem, respectivamente, sobre a classificação e enquadramento dos corpos d'água e sobre

condições e padrões de lançamento de efluentes. Segundo as resoluções, para os padrões adequados de qualidade de água, cobre dissolvido não pode ultrapassar uma concentração de 0,009 mg/L Cu e para lançamento em efluentes, esse valor deve ser no máximo de 1,0 mg/L Cu. Já as concentrações de cromo total não devem ser maiores que 0,05 mg/L Cr enquanto cromo hexavalente precisa estar abaixo de 0,1 mg/L Cr<sup>+6</sup> e cromo trivalente abaixo de 1,0 mg/L Cr<sup>+3</sup>.

### 2.1.1 Cromo

Na indústria, o cromo é amplamente utilizado para eletrodeposição, proteção contra corrosão e curtimento do couro (BAIRD; CANN, 2011). É um elemento muito presente no acabamento de metais, indústrias de plástico, entre outros (SPARKS, 2005). Os sais de cromo, cromato (CrO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) e dicromato (Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>-2</sup>), são as formas mais usuais do cromo em efluentes industriais e ambas são altamente tóxicas e nocivas à saúde humana (HAYASHI, 2001).

O cromo hexavalente é uma das maiores preocupações ambientais, uma vez que é altamente solúvel e biologicamente reativo, sendo extremamente tóxico e cancerígeno, atingindo níveis letais à saúde (COSTA et al., 2016).

No ambiente, o cromo encontra-se em baixas concentrações. Suas maiores fontes de descarga em corpos hídricos são os processos de galvanoplastia, abrillantamento e decapagens ácidas (HAYASHI, 2001).

### 2.1.2 Cobre

O cobre, em pequenas quantidades, é um elemento essencial no desenvolvimento de plantas. Sparks (2005) relatou que esse elemento pode ser encontrado na sua forma natural no ambiente, ou nas formas minerais calcocita (Cu<sub>2</sub>S) e calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>). No processo de obtenção do cobre bruto, o enxofre é removido pela calcinação desses minérios e pode ser submetido à eletrólise para um maior grau de pureza.

O cobre tem função estrutural associada às enzimas que reagem com oxigênio molecular, catalisando processos de oxidação. É um elemento presente nos processos de fotossíntese, respiração e desintoxicação de radicais livres de superóxidos (MARTINS, 2014).

Em pequenas quantidades, o cobre é um micronutriente essencial ao desenvolvimento de plantas e para nutrição animal. Porém, em excesso, torna-se um elemento tóxico, causando problemas ao ambiente e na saúde humana (WRENCKE, 2014).

## 2.2 BIORREMEDIAÇÃO

Caracterizada pelo uso de organismos vivos, em especial plantas e microorganismos, a biorremediação é uma forma de remediar áreas contaminadas, com a remoção de metais e poluentes orgânicos. Essa técnica está entre as mais eficazes, além de ser adequada ecologicamente em comparação com processos químicos ou físicos. Suas aplicações incluem tratamento de corpos d'água, solos, aterros e áreas de contenção (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Por apresentar um custo menor, essa técnica é vantajosa quando comparada a outras, como incineração ou simplesmente a remoção do material em que esteja localizado o ponto de contaminação. A biorremediação permite a destruição ou transformação do poluente em substância que não prejudique o ambiente. Entretanto, nem todos os contaminantes são biodegradáveis, podendo gerar outros contaminantes tóxicos, caso não seja feito um estudo prévio da situação (BOOPATHY, 2000).

### 2.2.1 Fitorremediação

Salt et al. (1995) definiram a poluição de águas e solos por metais pesados como um grande problema ambiental, em que métodos convencionais não fornecem soluções adequadas. Para esses autores, o uso de plantas acumuladoras de metal é uma alternativa eficaz. O processo de fitorremediação é composto por cinco mecanismos de atuação: fitotransformação, fitoextração, fitovolatilização, fitoestimulação e fitoestabilização (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2014). O enfoque desse estudo são as plantas que utilizam o mecanismo da fitoextração. Esse mecanismo consiste na absorção da substância contaminante pela planta e retenção nos tecidos vegetais.

A fitoextração se limita a acumular substâncias, sem as degradar. Diante disso, deve ser realizado um estudo acerca da destinação final do material vegetal,

levando-se em conta o potencial de acumulação da espécie utilizada e quais contaminantes estão acumulados no organismo (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2014). Dentre as opções para destinar o material remanescente da fitorremediação, podem-se citar a disposição em aterros, incineração e compostagem, aplicação na geração de energia, produção de artesanatos e ainda a recuperação econômica de metais, caso viável economicamente (MARQUES et al., 2011).

## 2.3 MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Por macrófitas aquáticas entende-se o conjunto de vegetais que habitam desde brejos até ambientes que sejam totalmente aquáticos, incluindo grupos de macroalgas e plantas vasculares. Em regiões tropicais, estabelecem uma importante conexão entre sistemas terrestres e aquáticos. Outro papel importante do grupo é a proteção de margens de corpos hídricos contra erosão, além de servir de abrigo para organismos em fases jovens e ainda servirem de substrato para outras espécies (FERREIRA et al., 2016).

Uma das principais características desses vegetais é a alta produtividade, principalmente em ambientes lênticos e rasos. As macrófitas aquáticas podem ser classificadas como emersas, flutuantes e submersas, podendo ser enraizadas ou de vida livre (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 em seus tecidos, diminuindo sua concentração no meio em que estão inseridas.

### 2.3.1 *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms

*Eichhornia crassipes* (FIGURA 1) é uma planta da família *Pontederiaceae* do gênero *Eichhornia*. Essa espécie é popularmente conhecida como aguapé. Trata-se de uma planta aquática flutuante livre que pode variar seu tamanho de acordo com o ambiente em que se encontra. Desenvolvem-se melhor em ambientes lênticos,

geralmente águas rasas e são bastante tolerantes a variações de pH, temperatura e presença de substâncias tóxicas (FERREIRA et al., 2016).

FIGURA 1 - INDIVÍDUOS DE *Eichhornia crassipes*



FONTE: Conrad (2008).

É uma planta em que o caule flutuante é rastejante e sua reprodução se dá na forma de estolões (BORTOLOTTI; NETO, 2005). Sua raiz e pecíolos alongados conferem uma vantagem à espécie na sobrevivência em águas mais profundas (PEREIRA, 2010). Pode apresentar problemas para outras espécies já que se propaga rapidamente e tem uma alta taxa de crescimento, podendo entupir tubulações de navegações e prejudicar o transporte marítimo (TÉLLEZ et al., 2008).

Todavia, mesmo com os problemas causados pela espécie, por sua alta capacidade em hiperacumular metais pesados, em especial o cromo, atualmente é muito utilizada nos processos de fitorremediação (PEREIRA, 2010) e isso está diretamente atrelado à sua resistência a ambientes tóxicos e suas características morfológicas, considerando que o acúmulo ocorre principalmente nos pecíolos e estolões (RODRIGUES et al., 2016).

### 2.3.2 *Salvinia biloba* Raddi emend. de La Sota

*Salvinia biloba* (FIGURA 2) é uma erva aquática flutuante livre da família *Salviniaceae*, gênero *Salvinia* com tricomas hidrofóbicos nas folhas. Essa espécie

pode habitar os mais diferenciados ecossistemas de água doce, ocorrendo em altas densidades com acumulação nas margens devido à ação dos ventos (FERREIRA et al., 2016).

FIGURA 2 - INDIVÍDUOS DE *Salvinia biloba*



FONTE: Pierre J-P (2013).

Apesar dos estudos relacionados à espécie serem escassos, já foi constatada a eficiência no âmbito da fitorremediação, principalmente na retirada de cobre do ambiente (FREITAS et al., 2017). Sua propagação se dá por meio da brotação e ocorre rapidamente, ocupando extensas superfícies aquáticas (CASAGRANDE, 2017).

*Salvinia biloba* acumula facilmente os poluentes em seus tecidos, visto que possui sistema de absorção de nutrientes com grande área de superfície que capta os elementos em suspensão antes de serem sedimentados no fundo dos corpos hídricos (CASAGRANDE, 2017).

### 2.3.3 *Pistia stratiotes* L.

Da família *Araceae* e gênero *Pistia*, esta é uma erva flutuante livre e perene (FIGURA 3), formadora de colônias (FERREIRA et al., 2016). Espécie nativa do continente sul-americano foi levada para vários locais do mundo, por conta de suas

características ornamentais, causando problemas aos múltiplos usos dos corpos hídricos (KISSMAN, 1997).

FIGURA 3 - INDIVÍDUOS DE *Pistia stratiotes*



FONTE: Stüber (2004).

Ainda que os estudos de bioacumulação de metais com essa espécie estejam pouco desenvolvidos, a literatura já confere destaque à sua eficiência em remoção de compostos orgânicos (PEREIRA, 2010; RODRIGUES et al., 2016). Sua biomassa seca foi testada na remoção e retenção de chumbo de ambientes contaminados (PEREIRA et al., 2015).

#### 2.4 MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS

Embora o oxigênio seja um elemento essencial para a sobrevivência, apresenta algumas desvantagens para os organismos aeróbicos. Há uma eficiente produção energética por combustão enzimática de compostos orgânicos, mas ao mesmo tempo o oxigênio é o líder dos danos aeróbicos na célula, por formar Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que reagem com todas as classes de biomoléculas (BARTOSZ, 1997).

Os organismos desenvolveram diferentes formas para reduzir e minimizar os efeitos das ERO, com a elaboração de um sistema antioxidante que minimiza as ações prejudiciais e, em alguns casos, utilizando-se destas espécies como meio de defesa, e às vezes como um mensageiro secundário (KHAN; WILSON, 1995).

Os diferentes estresses ambientais, sejam bióticos ou abióticos, podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio, tais como  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{OH}^\bullet$ . Como forma de se proteger destes tóxicos intermediários do oxigênio, as organelas das células vegetais, como mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, possuem um sistema de defesa antioxidante, composto por enzimas e outras moléculas não enzimáticas como carotenoides, ácido ascórbico, vitamina E, flavonoides, pirolina, glutathione, entre outras (DAVAR et al., 2013).

A exposição a metais pesados tem como consequência diferentes respostas biológicas a nível bioquímico, celular e fisiológico, entre os quais se podem citar: aumento da peroxidação lipídica, variações na relação clorofila/carotenoides, alterações na concentração de ácido jasmônico, nicotiana, glutathione (GSH) e tióis, aparição de peptídeos quelantes e fitoquelatinas, além de alteração da atividade de enzimas antioxidantes (PÉRNIA et al., 2008). A atividade de peroxidases está classificada como resposta de tolerância para evitar danos celulares.

#### 2.4.1 Catalase (CAT)

Presente nos peroxissomos, a catalase é uma enzima intracelular, produzida por diversos organismos, que auxilia na degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , resultando na formação de água e oxigênio (MAGALHÃES, 2018). O peróxido de hidrogênio, tóxico aos vegetais, necessita ser neutralizado, e a peroxidase trabalha para transformá-lo em uma substância que não seja nociva (BUNDE, 2018).

Em baixas concentrações, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  desempenha funções importantes para a planta, enquanto que em grandes quantidades, causa intoxicação nesses organismos, ativando a enzima CAT para que as células voltem a ser saudáveis mesmo em condições de estresse (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014).

#### 2.4.2 Ascorbato peroxidase (APX)

Assim como a catalase, a APX também catalisa a reação de decomposição do peróxido de hidrogênio. Essa enzima atua doando elétrons para a redução do  $H_2O_2$  em água. Ela também protege os cloroplastos e outras partes da célula da atividade da água oxigenada e do radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (LOPES et al., 2006).

Estudos afirmam que essa enzima previne organismos fotossintéticos de estresse oxidativo. A resposta da APX indica que ela é importante no controle intracelular da concentração de  $H_2O_2$  (SHIGEOKA et al., 2002).

#### 2.4.3 Guaiacol peroxidase (GPX)

Trata-se de enzima que atua indiretamente sobre o estresse do peróxido de hidrogênio, dependendo de elétrons liberados pelo enxofre, que está associado ao ciclo de formação da glutathione. As isoenzimas aniônicas da guaiacol peroxidase estão relacionadas à formação de parede celular e síntese de lignina e suberina (FIELDES; GERHARDT, 1998).

É um composto fenólico muito solúvel formador do tetraguaiacol quando oxidado, um produto de cor marrom também solúvel (FIELDING; HALL, 1978).

#### 2.4.4 Fitoquelatinas e metalotioneínas

As fitoquelatinas (PCs) são pequenos peptídeos (2 a 10 kDa) ricos em cisteína, que, normalmente, contém somente três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina.

As metalotioneínas constituem uma superfamília de proteínas que são produzidas naturalmente em um organismo, de acordo com a presença em alta concentração de metais. Estas proteínas atuam na regulamentação intracelular, suprimindo a demanda biológica de elementos essenciais como zinco e cobre, e protegem as células dos efeitos da exposição a elevadas quantidades de metais.

A produção de fitoquelatinas e metalotioneínas ocorre com a finalidade de proteger o organismo da ação dos metais tóxicos não essenciais, como Cd e As, ou metais essenciais que, em excesso, tornam-se tóxicos, como Zn e Cu (MELENDEZ et al., 2012).

#### 2.4.5 Glutathiona

A glutathiona (GSH) pode ser utilizada como um indicador de lesão oxidante. Trata-se de um tripeptídeo composto de aminoácidos não essenciais, descrito como um importante agente antioxidante. Esta enzima alterna a oxidação das espécies reativas com a catalase. Em altas concentrações de peróxido de hidrogênio, a catalase é que faz a conversão, mas quando os níveis são baixos, a glutathiona é a enzima ativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA

Na primeira etapa do experimento foram coletadas manualmente plantas aquáticas encontradas na região de Curitiba. A coleta ocorreu em um lago localizado no Parque da Imigração Japonesa (FIGURA 4), na Avenida das Torres, s/n, Uberaba, próximo à nascente do rio Iguaçu, na bacia do Alto Iguaçu, formada no encontro dos rios Atuba e Iraí. Em março deste ano, em comemoração aos 325 anos da cidade de Curitiba, o parque, anteriormente interditado, foi reaberto e restaurado a fim de se instaurar o memorial do Parque Iguaçu.

A bacia do Alto Iguaçu tem uma área de 20.010 km<sup>2</sup> e sua temperatura média anual é de 16,4°C. Em 2006, a maioria dos rios formadores da bacia, incluindo o Iguaçu, eram oficialmente classificados como classe 2 (CURITIBA. Instituto das Águas do Paraná, 2013). No entanto, estima-se que tais rios estejam enquadrados como classe 4, ou seja, inadequados para consumo (CURITIBA. Instituto das Águas do Paraná, 2007).

FIGURA 4 - MEMORIAL DO RIO IGUAÇU LOCALIZADO NO PARQUE DA IMIGRAÇÃO JAPONESA



FONTE: SANEPAR (2018).

### 3.2 O EXPERIMENTO

O experimento de fitorremediação foi montado em local arejado e com luz adequada para as plantas, no Laboratório de Engenharia Ambiental II da Universidade Federal do Paraná. As plantas foram lavadas com água de torneira, para retirar de seu sistema de absorção (que nesse trabalho serão tratados por folha e raiz) qualquer resquício de material do local onde foram recolhidas e em seguida, foi realizado um período de adaptação das espécies coletadas, *Eichhornia crassipes*, *Salvinia biloba* e *Pistia stratiotes*. Para reduzir o efeito de possíveis poluentes ambientais, as plantas foram mantidas por duas semanas em água potável, sem adição de nutrientes.

Para simular um efluente contaminado com metal pesado, foram preparadas duas soluções, sendo uma de nitrato de cromo III ( $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) e outra de nitrato de cobre II ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). 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*, quatro com três indivíduos de *Salvinia biloba* e quatro com três indivíduos de *Pistia stratiotes*. 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. Outras 200 mg de porções vegetativas foram maceradas para a determinação de clorofilas e 200 mg de folhas e raízes foram utilizadas para a determinação dos metais nos tecidos vegetais.

### 3.2.1 Determinação da concentração de metais

A preparação das amostras se deu da seguinte forma: inicialmente homogeneizou-se a amostra e transferiu-se 100 mL do extrato para um erlenmeyer, e foram adicionados 3 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado (65%). Em seguida, aqueceram-se as amostras a uma temperatura de 130°C. Uma quantidade de 2 mL de ácido clorídrico 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 para depois serem 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.

#### 3.2.1.1 Fator de bioacumulação

O fator de bioacumulação (FB) é um dos parâmetros utilizados para identificar a capacidade de hiperacumulação de elementos que as plantas podem absorver. É calculado pela fórmula (1) (MARTINS, 2014):

$$FB = \frac{CT}{CA} \quad (1)$$

Em que:

FB – fator de bioacumulação.

CT – concentração dos elementos na planta (folha + raiz).

CA – concentração dos elementos na solução.

#### 3.2.2 Preparação do extrato de enzima

Para cada amostra, foram maceradas, a frio, 200 mg de folhas e 50 mg de raízes. Para que as fibras pudessem ser trituradas no processo, em geral com pistilo,

ambos de porcelana, foram misturados 1 mL de HCl a 0,38%, com 99% de grau de pureza, e 1 mL de uma solução de DTPA 5 mM (ácido dietilenotriamino pentacético), uma vez que esse é o reagente mais adequado para realizar a extração das enzimas. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 1300 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi coletada e mantida congelada até a realização das análises.

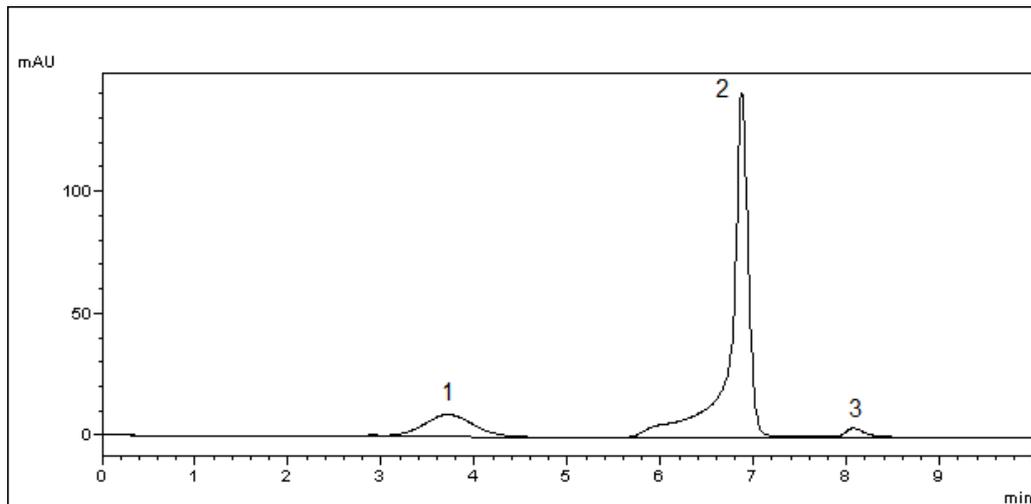
### 3.2.3 Derivação de tióis

Do extrato de enzimas, foram retirados 400  $\mu$ L e misturados com 540  $\mu$ L de CHES-DTPA tamponado (solução de 200 mM de CHES, ácido 2-(N-ciclohexilamino) – etanosulfônico, e 5 mM de DTPA em pH 7,8). Foram adicionados 10  $\mu$ L de MBB (monobromobimano) 9 mM dissolvidos em acetonitrila. As amostras foram encaminhadas para estufa por 30 minutos a 45°C. A reação foi interrompida quando foram adicionados 50  $\mu$ L de HCl 36%. As amostras então foram filtradas com um filtro de 0,45  $\mu$ m.

Para a realização da leitura dos picos das metalotioneínas, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), a um comprimento de onda de 254 nm, da marca SHIMADZU, com coluna de octadecylsilane, de 4,6 mm de diâmetro e 150 mm de comprimento. O CLAE é um equipamento que utiliza a técnica da cromatografia líquida para separar, identificar e quantificar os compostos analisados (MALVIYA et al., 2010).

A presente pesquisa adotou a metodologia descrita por Jacques-Silva et al. (2001). Dessa forma, 20  $\mu$ L do extrato proteico derivado foram injetados no CLAE, utilizando-se como fase móvel uma solução de 5% de acetonitrila e 0,5% de ácido trifluoroacético (TCA) a uma taxa de 1,5 mL/min, durante 10 minutos. O cromatograma gerado pelo aparelho mostrava os picos de glutathione e os picos de tióis, sendo o primeiro referente à GSH e os demais os tióis associados à cisteína (FIGURA 5). O conteúdo de tióis não proteicos deve ser expresso em  $\mu$ mol/mg de proteína (WOOD; FELDMANN, 2012).

FIGURA 5 - EXEMPLO DE CROMATOGRAMA GERADO PELO CLAE PARA IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DE GLUTATIONA E FITOQUELATINAS



FONTE: A autora (2018).

### 3.2.4 Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)

Para a determinação da atividade da 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $2,8 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ , com resultados expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

A leitura de todas as amostras de extrato enzimático foi realizada em um espectrofotômetro de UV visível da marca KASUAKI. Esse é um equipamento que detecta a quantidade de luz que uma amostra absorve, em determinados comprimentos de onda. A concentração das substâncias é medida a partir da absorção de energia radiante em um solvente (MARTINEZ, 2018).

### 3.2.5 Determinação da atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX)

A determinação da atividade da 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 (ácido etilenodiamino tetracético), 0,25 mM de ascorbato e por fim, 1,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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<sup>-1</sup>, com resultados em µmol/min/µg de proteína.

### 3.2.6 Determinação da atividade enzimática da guaiacol peroxidase (GPX)

A 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A solução foi levada à estufa a 30°C 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<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em µmol/min/µg de proteína.

### 3.2.7 Cálculos das atividades enzimáticas

As atividades das enzimas foram calculadas pela seguinte fórmula:

$$U = \frac{A}{T} \times \frac{1}{E} \times \frac{1}{Ve} \times FD \times 1000$$

(2)

Em que:

U – unidade de enzima, que pode ser definida como a quantidade de extrato enzimático que causou um aumento na absorbância de 0,001 unidade por minuto.

A – absorbância, obtida pela diferença entre a maior e a menor absorbância.

E – absortividade molar da enzima, sendo que para a CAT e APX o valor foi de 2,8 e para a GPX, foi de 26,6.

Ve – volume da solução da enzima utilizada.

T – tempo de reação em minutos.

FD – fator de diluição, calculado pela relação extrato bruto e solução final lida.

### 3.2.8 Determinação da clorofila

Para análise da clorofila, as amostras foram armazenadas e manipuladas em local escuro e a extração do pigmento foi realizada pela técnica de maceração a frio com 2 mL de solução aquosa de acetona 90%, em gral com pistilo (EATON et al., 2005) (FIGURA 6). As amostras foram armazenadas em tubos de ensaio e centrifugadas, a 3000 rpm por 20 minutos, a fim de sedimentar as fibras remanescentes.

FIGURA 6 - EXTRAÇÃO DO PIGMENTO DE CLOROFILA COM AUXÍLIO DO GRAL E DO PISTILO



FONTE: A autora (2018).

A leitura das amostras foi realizada no mesmo espectrofotômetro que foi utilizado para a leitura dos extratos enzimáticos, após transferência para uma cubeta de quartzo. Os comprimentos de onda utilizados foram de 630 nm, 647 nm e 664 nm, referentes às clorofilas  $\alpha$ , b e c respectivamente.

As concentrações absolutas de clorofila, em mg/L, foram obtidas com as equações (3), (4) e (5) (EATON et al., 2005).

$$\text{Clorofila } \alpha = [11,85 \times (\text{absorbância } 664)] - [1,54 \times (\text{absorbância } 647)] - [0,08 \times (\text{absorbância } 630)] \quad (3)$$

$$\text{Clorofila } b = [21,03 \times (\text{absorbância } 647)] - [5,43 \times (\text{absorbância } 664)] - [2,66 \times (\text{absorbância } 630)] \quad (4)$$

$$\text{Clorofila } c = [24,52 \times (\text{absorbância } 647)] - [7,60 \times (\text{absorbância } 647)] - [1,67 \times (\text{absorbância } 664)] \quad (5)$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As alterações nas concentrações dos metais nas três espécies se refletiram sobre os parâmetros biológicos, como mudanças nas atividades enzimáticas de cada espécie e na forma de recuperação metabólica em relação à atividade fotossintética.

### 4.1 CONCENTRAÇÃO DE METAIS

A absorção de metais, para as três espécies, 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*, *Salvinia biloba* E *Pistia stratiotes* 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)
<i>Eichhornia crassipes</i>						
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
<i>Salvinia biloba</i>						
0h	8,6	9,9	180,9	10,7	5,9	130,4
24h	114,7	5599,0	144,0	1926,7	5197,6	55,7
48h	207,0	2655,171	100,5	1413,5	2198,6	130,0
<i>Pistia stratiotes</i>						
0h	14,6	46,6	180,9	4,8	6,9	130,4
24h	190,8	6702,2	38,1	548,4	4136,6	38,0
48h	806,1	2511,3	18,0	50,4	935,7	17,9

FONTE: A autora (2018).

Durante as primeiras 24 horas, *S. biloba* absorveu uma quantidade grande de cobre e cromo em relação à concentração inicial, aumentando nas raízes em quase mil vezes (TABELA 1). Tanto na absorção de cromo quanto na absorção de cobre há um acúmulo maior nas raízes do que nas folhas. No entanto, ao final das 48 horas, o acúmulo de cobre nas folhas e na raiz diminuiu, e a concentração na

solução retorna aos níveis iniciais, enquanto que o cromo continuou sendo removido da solução, reduzindo em 44% a concentração em relação à inicial, além de continuar acumulando o metal nas folhas (TABELA 1). As altas concentrações de cobre nas soluções não têm se mostrado inibidora da capacidade de absorção desta espécie, ao contrário, as maiores concentrações fazem com que a velocidade de absorção aumente (FREITAS et al., 2017).

Na solução em que se encontrava *P. stratiotes* a porcentagem de redução na concentração de cromo foi de 90%, sendo acumulado nas raízes e folhas, com maior concentração nas raízes (TABELA 1). Estes dados corroboram o que foi observado por Lima (2011), que também obteve o maior acúmulo de cromo nas raízes em seu experimento, e indica esta espécie como bioacumuladora. Outro dado importante apontado por Cruz et al. (2009) foi de que *P. stratiotes* removeu quase que completamente o Mn e o Zn da água, demonstrando a tendência da absorção de elementos traço pela espécie, além do necessário para o metabolismo.

Com base nos dados das concentrações de metais nos tecidos das plantas, calculou-se o fator de bioacumulação, sempre com o intervalo de 48 horas. Os resultados do fator de bioacumulação apontam que, nesse estudo, *P. stratiotes* obteve a maior capacidade acumuladora para os dois metais, sendo que o fator de bioacumulação de cromo foi maior (TABELA 2).

TABELA 2 - FATORES DE BIOACUMULAÇÃO

Espécie	Fator de bioacumulação (FB)	
	Cromo	Cobre
<i>Eichhornia crassipes</i>	0,103	0,762
<i>Salvinia biloba</i>	28,43	27,75
<i>Pistia stratiotes</i>	180,98	54,16

FONTE: A autora (2018).

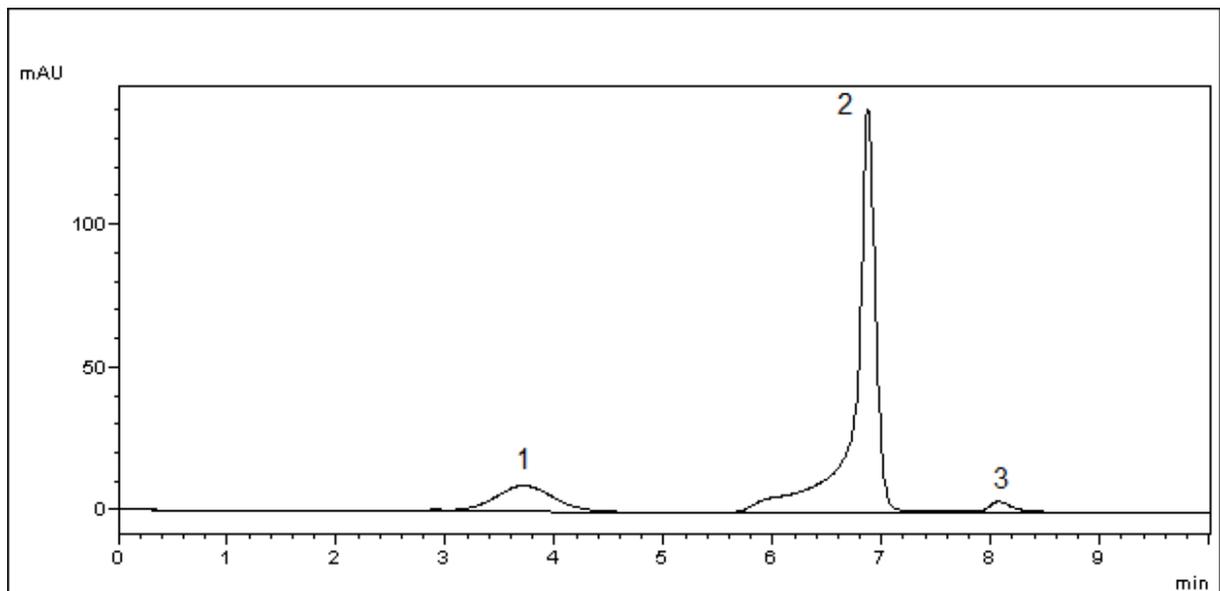
A espécie que apresentou o menor fator de bioacumulação foi *E. crassipes*, que para os dois metais foi relativamente mais baixo. *S. biloba* obteve fatores de bioacumulação semelhantes para os dois metais (TABELA 2).

Os resultados para o FB apontam que *E. crassipes* teve um desempenho baixo no acúmulo dos metais em seus tecidos, enquanto que *S. biloba* e *P. stratiotes* demonstraram que foram eficientes na absorção dos dois metais.

## 4.2 ANÁLISE DAS METALOTIONEÍNAS

O tripeptídeo glutationa (GSH) foi medido nas porções vegetais das três espécies e nos dois intervalos de experimento, resultando em um cromatograma com o pico de glutationa, representado pelo número (1) na imagem, próximo aos 3 minutos e os picos das fitoquelatinas, representados na figura pelos números (2) e (3), próximo aos 7 minutos (FIGURA 7). O cromatograma da figura é um exemplo referente à solução de cromo com 48 horas em que *P. stratiotes* se encontrava. O GSH é o mais abundante dos compostos tióis da cisteína (fitoquelatinas), sendo parte de processos biológicos, principalmente à resposta ao estresse por metais. É também substrato para a biossíntese dos peptídeos de ligação a metais pesados, e a partir do GSH, as fitoquelatinas (PCs) são sintetizadas pela enzima PC sintase (COBBETT et al., 1998). Após a complexação dos metais, o conjunto fitoquelatina-metal é transportado ao vacúolo para ser armazenado e compartimentalizado (MIRZA et al., 2014).

FIGURA 7 – CROMATOGRAMA GERADO PELO PROGRAMA DO CLAE QUE REPRESENTA O PICO DE GLUTATIONA E OS DOS TIÓIS DE CISTEÍNA (1 GLUTATIONA (GSH), 2 CISTEÍNA E 3 FITOQUELATINAS (PC))



FONTE: A autora (2018).

Podem-se observar, ao longo do período de estresse, variações nas concentrações de fitoquelatinas, pois o respectivo aumento indica a necessidade de

produção de enzimas. A maior concentração de glutatona foi observada nas raízes de *E. crassipes* após 24 horas de exposição ao cromo (TABELA 3). Trabalhos anteriores indicam esse aumento dos níveis de GSH como o observado em *Brassica juncea*, cujos níveis foram 5 vezes maiores nas raízes do tratamento com Cd (ZHU et al., 1999).

TABELA 3 - DADOS DE CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA E DE FITOQUELATINAS NA FOLHA E RAIZ DE *Eichhornia crassipes*, *Salvinia biloba* E *Pistia stratiotes* OBTIDOS POR CLAE

	Cromo				Cobre			
	Glutationa (µmol/min)		Fitoquelatinas (µmol/min)		Glutationa (µmol/min)		Fitoquelatinas (µmol/min)	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
<i>Eichhornia crassipes</i>								
0h	10751	0	12277	0	10751	0	12277	0
24h	0	11633	10626	18841	0	10708	9013	26092
48h	9926	10416	18887	12256	0	6019	8988	19944
<i>Salvinia biloba</i>								
0h	3167	0	10381	8897	3167	0	10381	8897
24h	0	0	9310	57398	0	0	16836	11683
48h	0	0	7845	16613	0	0	12558	11780
<i>Pistia stratiotes</i>								
0h	0	0	9562	7916	0	0	9562	7916
24h	5639	4116	7694	12348	4464	0	11461	13899
48h	0	6839	8612	8137	6269	0	12506	8807

FONTE: A autora (2018).

A glutatona não foi observada nas raízes de *S. biloba*, porém, mesmo assim, os níveis de concentração das fitoquelatinas aumentaram ao longo do tempo, sendo a maior concentração de fitoquelatinas observadas na solução de cromo após 24 horas de experimento (TABELA 3). Este mesmo intervalo coincide com a maior concentração deste metal, nas raízes de *S. biloba* (TABELA 1). Alguns autores apontam que o Cd absorvido em *Salvinia* é complexado com fitoquelatinas e compartimentalizado nos vacúolos das células das raízes (OLIVEIRA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2016).

O fato de não terem sido identificadas concentrações de glutatona pode indicar que esta foi rapidamente convertida em fitoquelatinas. Há também a possibilidade do tripeptídeo glutatona ter ocorrido em níveis baixos, fora do intervalo de detecção. A glutatona é sintetizada dos seus aminoácidos constituintes, em duas reações enzimáticas sequenciais, dependentes de ATP, catalisadas pelas enzimas  $\gamma$ -glutamil-cisteína e sintase glutatona (CHEN; ZHOU; GOLDSBROUGH, 1997). Alguns autores demonstram que a elevada susceptibilidade a metais pesados de

certas espécies está relacionada com a deficiência de glutathione (MENDOZA-CÓZATL et al., 2005). A glutathione é um marcador da saúde celular e sua queda é indicativa de lesão oxidante.

No intervalo de 24 horas de experimento, ocorreram as maiores concentrações dos metais, nas três espécies, e coincidem com as maiores concentrações de fitoquelatinas em raízes nas soluções de cromo (TABELAS 1 e 3). Nas soluções de cobre e cromo, a exceção ocorre nas folhas de *P. stratiotes*, cuja maior concentração se deu após 48 horas (TABELA 3).

### 4.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Além da glutathione e fitoquelatinas, outras enzimas atuam para minimizar o efeito dos compostos que se formam no metabolismo celular sob o estresse. Entre elas, catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX).

Nas três espécies de macrófitas, a GPX teve uma atividade extremamente baixa, quando comparada com a CAT e APX (FIGURAS 8, 9 E 10). 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.

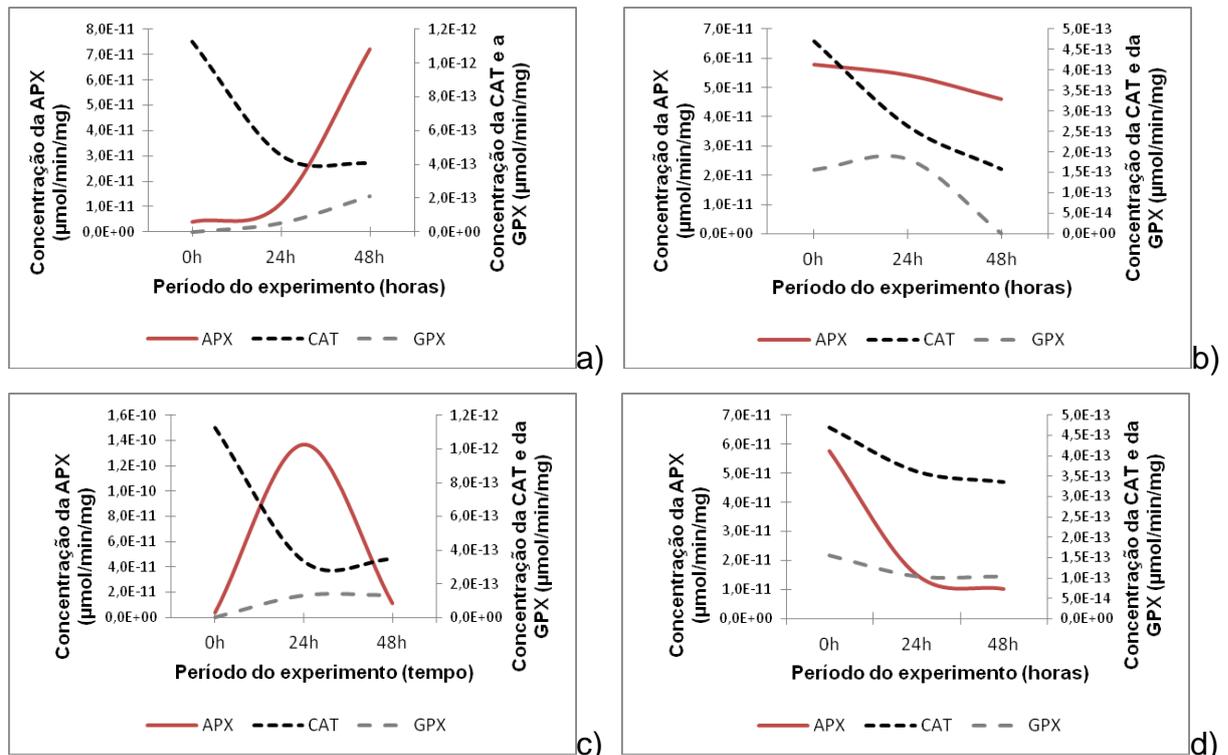
O contato de compostos metálicos com a membrana plasmática está associado a diversos danos metabólicos, em consequência de diferentes processos, como as ligações com grupos sulfidríla das proteínas, peroxidação dos lipídeos, inativação de proteínas chave e mudanças na composição e fluidez da membrana 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 8a e 8b) 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 8c e 8d).

Com os dados de acúmulo de metais em *E. crassipes* é possível notar que a planta não transportou cromo para as folhas, enquanto que 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 8). 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 8a).

FIGURA 8 - VARIÇÃO 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



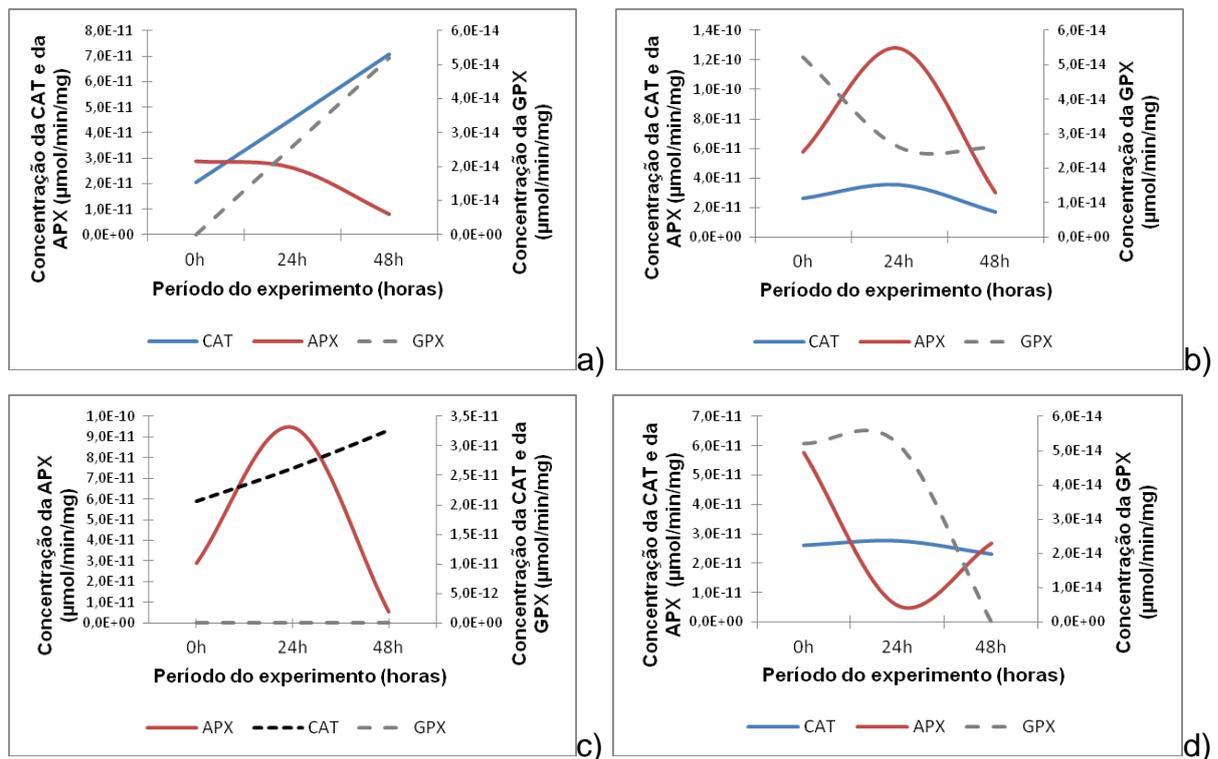
FONTE: A autora (2018).

Na absorção de cromo por *S. biloba*, a CAT apresentou um aumento na atividade, tanto na folha quanto na raiz, com 24h de experimento (FIGURA 9), indicando que houve um aumento de peróxido de hidrogênio causado pelo estresse da absorção do metal. A partir deste ponto, a atividade caiu na raiz (FIGURAS 9b e 9d), e aumentou mais ainda na folha (FIGURAS 9a e 9c).

Comparando com os dados de acúmulo de metal, no interior da planta (TABELA 1), verifica-se que houve um aumento de 45% na concentração de cromo, nas últimas 24 horas finais de experimento. Os níveis de cobre nas folhas ficaram próximos, entre as últimas 24 horas. A CAT mostra-se muito eficiente, energeticamente, na remoção de peróxido de oxigênio, sendo mais eficiente quanto maior for sua concentração (SHARMA et al., 2012).

A atividade da GPX, em eixo secundário, representada pela linha tracejada (FIGURA 9), na folha em solução de cromo apresentou intensa atividade saindo de zero no instante inicial e se igualando a CAT nas últimas 48 horas (FIGURA 9a). A atividade na folha em solução de cobre foi nula (FIGURA 9c).

FIGURA 9 - VARIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS CATALASE (CAT), ASCORBATO PEROXIDASE (APX) E GUAICOL PEROXIDASE (GPX) NA FOLHA E RAIZ DE *Salvinia biloba* 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 COBRE



FONTE: A autora (2018).

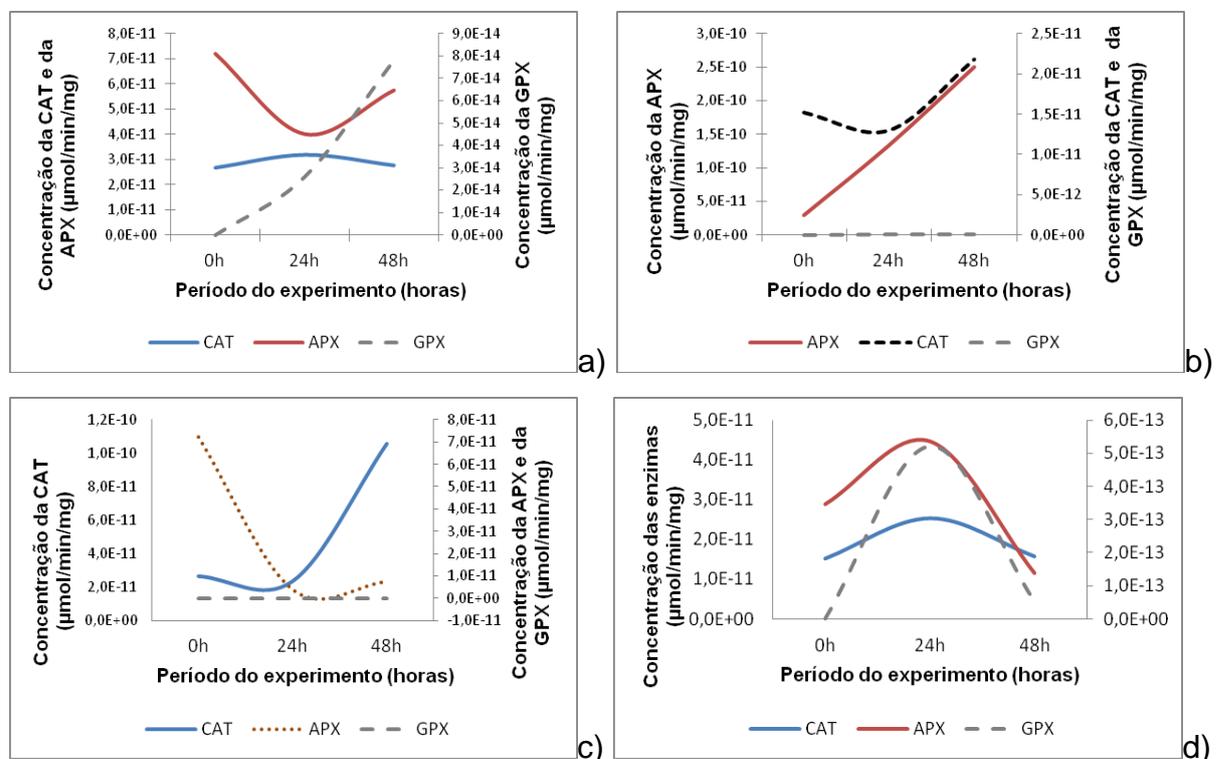
A atividade enzimática da CAT, na solução de cromo, na folha em *P. stratiotes*, aumentou nas primeiras 24 horas de experimento e diminuiu nas últimas 24 horas, enquanto que a atividade da APX diminuiu até 24 horas e aumentou a

partir disso (FIGURAS 10a e 10c). O acúmulo desse metal, na folha, aumentou tanto no primeiro dia quanto no segundo dia de experimento (TABELA 1) e a concentração de glutatona é alta, nas folhas, no intervalo de 24 horas (TABELA 3).

Embora as duas enzimas tenham alta afinidade pelo peróxido de hidrogênio, a CAT atua melhor em altas concentrações, pois não necessita de redutor. À medida que as concentrações do peróxido diminuem a APX passa a ser mais atuante, esta utiliza o ácido ascórbico como redutor, com alta afinidade com o  $H_2O_2$  e grande capacidade reativa, eliminando-o mesmo em baixas concentrações (SHARMA et al., 2012).

A atividade da GPX em *P. stratiotes* variou entre as partes da planta e nas soluções. No caso da raiz em solução de cromo, não apresentou atividade (FIGURA 10b). O mesmo ocorreu na folha em solução de cobre, mas assim como em *S. biloba* a maior atividade foi observada na folha em solução de cromo (FIGURA 10a).

FIGURA 10 - VARIACÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS CATALASE (CAT), ASCORBATO PEROXIDASE (APX) E GUAIACOL PEROXIDASE (GPX) NA FOLHA E RAIZ DE *Pistia stratiotes* 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 COBRE



FONTE: A autora (2018).

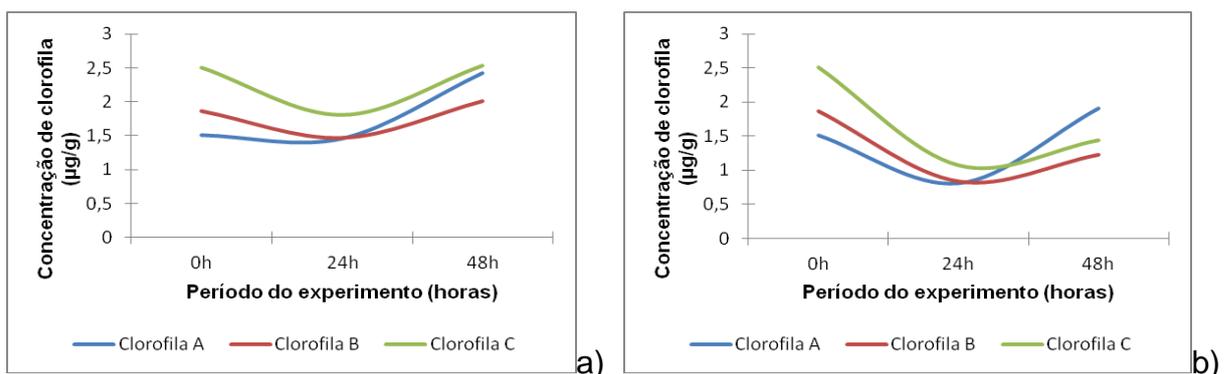
Nas raízes de *P. stratiotes* as enzimas tiveram comportamento semelhante, mas a APX apresentou maior atividade (FIGURAS 10b e 10d). Na raiz, houve um aumento do acúmulo dos dois metais, nas primeiras 24 horas, e uma queda nas 24 horas seguintes (TABELA 1). O mesmo comportamento da atividade enzimática ocorreu na raiz em solução de cobre (FIGURA 10d).

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA CLOROFILA

A atividade fotossintética responde às atividades enzimáticas em condições de estresse. Dessa forma, é possível avaliar o metabolismo vegetal pela concentração de clorofila. Em *E. crassipes* houve uma redução da mesma, nas primeiras 24 horas, seguida por uma retomada (FIGURA 11).

Embora não tenha ocorrido transferência de metais para as folhas, a alta atividade da APX (FIGURAS 8a e 8c) explica o comportamento da concentração de clorofilas, que, em cobre, não retornam ao nível inicial (FIGURA 11a). Nos cloroplastos e mitocôndrias a APX atua no ciclo ascorbato-glutationa, nos cloroplastos, durante a fase clara da fotossíntese, quando ocorre a fotorredução do oxigênio à água, e pode gerar  $O_2\cdot$  e  $H_2O_2$  (ASADA, 2006).

FIGURA 11 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CLOROFILAS  $\alpha$ , b E c EM *Eichhornia crassipes*, EM a) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE CROMO; b) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE COBRE

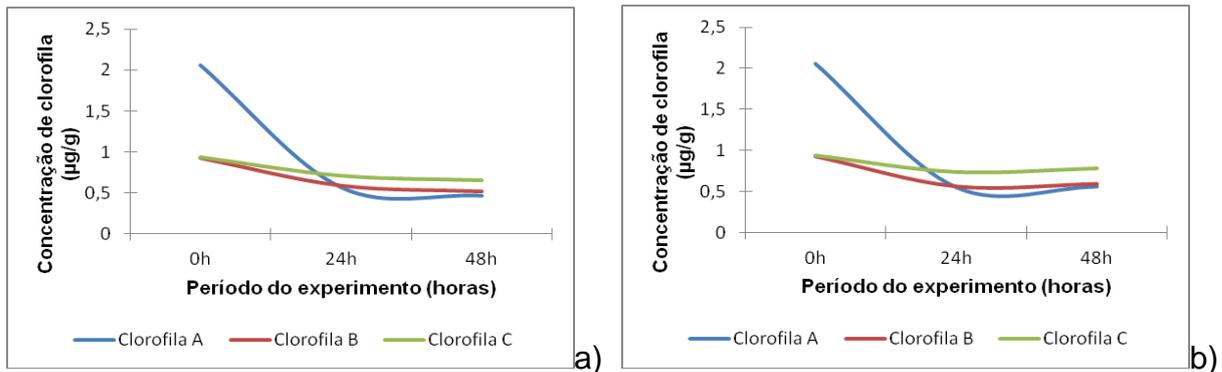


FONTE: A autora (2018).

Em *S. biloba*, é possível perceber a queda da concentração das três formas de clorofila, o que representa uma redução no metabolismo da planta com a absorção dos metais (FIGURAS 12a e 12b). Isto, provavelmente, está associado aos

altos níveis de fitoquelatinas observados nas folhas durante todo o período (TABELA 2), ou seja, a planta continua absorvendo o metal e encontra-se em alto estresse.

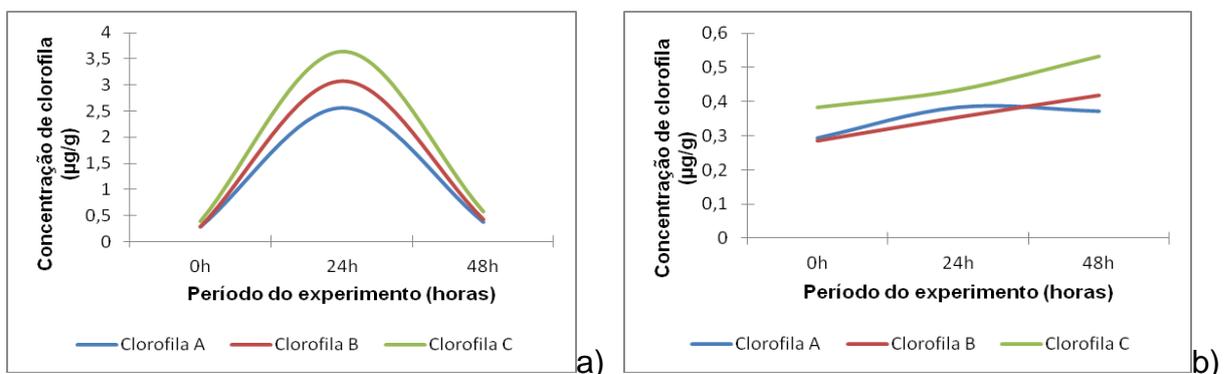
FIGURA 12 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CLOROFILAS  $\alpha$ , b E c EM *Salvinia biloba*, EM a) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE CROMO; b) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE COBRE



FONTE: A autora (2018).

A concentração de clorofila  $\alpha$  em *P. stratiotes* alcançou seu máximo, em 24 horas, na solução com cromo (FIGURA 13a), seguida de estabilização. A partir deste intervalo, a concentração de cromo na solução é baixa (TABELA 1), a glutathione ocorre nas folhas (TABELA 3) e a enzima, que está mais ativa APX, tem sua menor atividade registrada (FIGURA 10a). Esse conjunto demonstra, claramente, que a espécie embora tenha absorvido o metal, foi capaz de se proteger dos efeitos do estresse e retomar seu metabolismo.

FIGURA 13 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CLOROFILAS  $\alpha$ , b E c EM *Pistia stratiotes*, EM a) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE CROMO; b) AMOSTRA DE FOLHA EM SOLUÇÃO DE COBRE



FONTE: A autora (2018).

Observando-se o comportamento da clorofila em *P. stratiotes*, na solução de cobre (FIGURA 13b), fica claro que este metal interfere mais com o metabolismo da planta do que o cromo. Provavelmente, por tratar-se de um micronutriente, os mecanismos de proteção não sejam tão eficientes. Os níveis de cobre reduzem nos tecidos, nas 24 horas finais (TABELA 1), mas as fitoquelatinas encontram-se elevadas (TABELA 3) e a catalase, nas folhas, apresenta o maior nível de atividade (FIGURA 10c).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em geral, *Pistia stratiotes* teve um desempenho melhor que *Eichhornia crassipes* e *Salvinia biloba* na retirada dos metais das soluções, obtendo, ao final do experimento, o menor valor em relação à concentração inicial de cada solução. Para os dois metais, o acúmulo foi maior na raiz, apresentando a maior transferência de cromo para a folha.

Foi observado que, *S. biloba*, apesar de acumular uma grande quantidade de cobre tanto na raiz quanto na folha, não foi eficiente na retirada do metal da solução, pois a concentração de cobre retornou ao nível inicial após 48 horas. Para o cromo, *S. biloba* teve uma eficiência maior, reduzindo a concentração inicial ao passo que acumulava cromo em suas porções vegetais.

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.

A síntese de glutathiona em fitoquelatinas indicou um aumento significativo da produção de enzimas. Isso fica evidente na raiz da solução de cobre em *Pistia stratiotes*. As três enzimas aumentam sua concentração do início do experimento até 24 horas, enquanto a concentração de fitoquelatinas também aumenta. Entre 24 horas e 48 horas, percebe-se que a concentração das enzimas e das fitoquelatinas diminui. Ao longo do experimento APX foi a enzima mais produzida.

Nas porções vegetais de *S. biloba* as enzimas APX e CAT se mostraram bem ativas, principalmente em solução de cromo nas primeiras 24 horas, ao passo que a maior concentração de fitoquelatinas da espécie também ocorreu nesse período. A GPX sofreu uma diminuição em sua produção, o que provavelmente indica que houve acúmulo de contaminante no interior da célula.

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. Foi possível observar, principalmente nas raízes, que as concentrações de glutathiona não zeraram completamente, indicando que a resposta ao estresse na espécie foi baixa.

A concentração das clorofilas  $\alpha$ ,  $b$  e  $c$ , atrelado à concentração alta das fitoquelatinas, em *S. biloba* indica que, apesar de ter seu metabolismo reduzido, continuou absorvendo metais. Em *P. stratiotes* em solução de cobre houve um aumento na concentração das clorofilas nas primeiras 24 horas, período em que o acúmulo de metais tanto nas folhas quanto nas raízes. A partir desse período, a redução nos níveis de concentração indicou uma redução no metabolismo, e a absorção de cobre foi menor. *E. crassipes* reduziu seu metabolismo durante as primeiras 24 horas, seguido por um reestabelecimento, quando a planta parou de acumular metais e apresentou concentrações de glutathione em algumas análises, ao passo que se reduziram as concentrações de fitoquelatinas.

Dado o exposto, conclui-se que, nesse estudo, *P. stratiotes* e *S. biloba* foram mais eficientes que *E. crassipes* na retirada de metais da solução, com destaque para a absorção de cromo por *S. biloba* que atingiu níveis altíssimos, mesmo com a planta sob altos efeitos de estresse. *P. stratiotes* obteve um bom desempenho para ambas as soluções, porém dentre as três espécies, foi a que mais retirou cobre da solução, ainda que *S. biloba* tenha apresentado bons resultados para o acúmulo do metal.

Os estudos acerca da fitorremediação são indispensáveis para agregar conhecimento sobre descontaminação de metais pesados e outras substâncias tóxicas em ambientes terrestres e aquáticos. A cada espécie avaliada em diferentes situações de estresse, possibilidades de remediação são criadas, contribuindo com novas soluções de problemas para o meio ambiente.

## 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.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Rockville, **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 391-396, jun. 2006.
- ASSUNÇÃO, L. P. G.; ROHLFS, D. B. **Biorremediação em áreas contaminadas**. Trabalho apresentado na Semana de Ciência e Tecnologia da PUC Goiás, Goiânia, 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.
- BAIRD, C.; CANN, M. Metais Pesados Tóxicos. In: BAIRD, C.; CANN, M.: **Química Ambiental**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. p. 685-734.
- BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, n. 1, p. 47-64, mar. 1997.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Los Angeles, v. 74, n.1, p. 63-67, ago. 2000.
- BORTOLOTTI, I. M.; NETO, G. G. O uso do camalote, *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, Pontederiaceae, para confecção de artesanato no Distrito de Albuquerque, Corumbá, MS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 331-337, jul./set. 2005.
- BUNDE, M. **Todo Estudo**. Disponível em: <https://www.todoestudo.com.br/biologia/catalase>. Acesso em: 08 nov. 2018.
- CARROLL, L. Porco e pimenta. In: CARROLL, L. **Aventuras de Alice no País das Maravilhas e Através do Espelho e o que Alice encontrou por lá**. Edição Bolso de Luxo. Rio de Janeiro: Zahar, 2010. P.67-79.
- CASAGRANDE, G. C. R. **Bioacumulação e bioexatuação de cobre e mercúrio por *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae)**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, 2017.
- CHEN, J.; ZHOU, J; GOLDSBROUGH, P. B. Characterization of phyto chelatin synthase from tomato. **Physiologia Plantarum**, v. 101, n. 1, p. 165-172, 1997.

COBBETT, C. S.; MAY, M. J.; HOWDEN, R.; ROLLS, B. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. **Plant Journal**, v. 16, n. 1, p. 73-78, 1998.

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.

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>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 92, 16 mai. 2011. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 13 dez. 2018.

CONRAD, J. **Water Hyacinth's growing inside a Cenote**. 2008. 1 fotografia, color. Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eichhornia\\_crassipes-Cenote.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eichhornia_crassipes-Cenote.jpg). Acesso em: 15 nov. 2018.

COSTA, M. H. P.; SILVA, P. C. C.; ROCHA, C. A. M. Efeitos do cromo hexavalente sobre o crescimento de raízes e ciclo celular no meristema da ponta da raiz de *Allium cepa*. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 6, n. 3, p. 40-44, 2016.

COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. **Silva Lusitana**, Lisboa, v. 15, n. 1, p. 103-117, 2007.

CRUZ, M. B.; KARAM, D.; AGUIAR, R.; MELLO, J. W. V. Absorção de metais pesados presentes em efluente de mineração por *Pistia stratiotes*. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ECOLOGIA, 3., 2009, São Lourenço. **Anais...** Brasília: Embrapa. Departamento de Estudos e Pesquisa, 2009.

CURITIBA. Instituto das Águas do Paraná. **Mapa de Enquadramento**. Curitiba: Instituto das Águas do Paraná, 2007. Escala: 1:500.000.

CURITIBA. Instituto das Águas do Paraná. **Plano das bacias do Alto Iguaçu e afluentes do Alto Ribeira**. Curitiba: Instituto das Águas do Paraná, 2013. Relatório.

DAVAR, R.; DARVISHZADEH, R.; MAJD, A. Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biologia**, v. 68, n. 5, p. 821-829, out. 2013.

DIXIT, R.; WASIULLAH; MALAVIYA, D.; PANDIYAN, K.; SINGH, U. B.; SAHU, A.; SHUKLA, R.; SINGH, B. P.; RAI, J. P.; SHARMA, P. K.; LADE, H.; PAUL, D. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: Na Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. **Sustainability**, Basel, v. 7, n. 2, p. 2189-2212, fev. 2015.

DUFFUS, J. H. "Heavy metals" – A meaningless term? **Pure Applied Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 793-807, 2002.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; RICE, E. W.; GREENBERG, A. B. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, 2005.

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.

FIELDER, M. A.; GERHARDT, K. E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. **Plant Science**, v. 132, n. 1, p. 89-99, fev. 1998.

FIELDING, J. L.; HALL, J. L. A Biochemical and Cytochemical Study of Peroxidase Activity in Roots of *Pisum sativum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 29, n. 111, p. 969-981, ago. 1978.

FREITAS, F.; LUNARDI, S.; SOUZA, L. B.; OSTEN, J. S. C. von der; ARRUDA, R.; ANDRADE, R. L. T.; BATTIROLA, L. D. Acumulação de cobre pela macrófita aquática *Salvinia biloba* Raddi (Salvinaceae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 78, n. 1, p. 133-139, jul. 2017.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. de L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **BIOTECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 34, p. 34-43, jan./jun. 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989, 543 p.

HAYASHI, A. M. **Remoção de cromo hexavalente através de processos de biossorção em algas marinhas**. 2001. 209 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

JACQUES-SILVA, M. C.; NOGUEIRA, C. W.; BROCH, L. C.; FLORES, E. M. M.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 88, n. 3, p. 119-125, mar. 2001.

KHAN, A. U.; WILSON, T. Reactive oxygen species as cellular messengers. **Chemistry & Biology**, v. 2, n. 7, p. 437-445, jul. 1995.

KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. 2ª ed. São Bernardo do Campo: BASF, 1997. 852 p.

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.

LIMA, M. V. de. Avaliação do potencial de bioacumulação de cromo por *Pistia stratiotes*. 2010. 42 p. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

LOPES, M. J. C.; SOUZA, I. R. P. de; MAGALHÃES, P. C.; GAMA, E. E. G.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; VILLAFORT, M. T. Atividade da Enzima Peroxidase do Ascorbato em Plântulas de Diferentes Ciclos de Seleção do Milho 'Saracura' sob Encharcamento Contínuo. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 26., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: ABMS, 2006. p. 93-93.

MAGALHÃES, L. **Toda Matéria**.

Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/catalase/>. Acesso em: 08 nov. 2018.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O. P.; SHARMA, P. K. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY: A SHORT REVIEW. **Journal of Global Pharma Technology**, Meerut, v. 2, n. 5, p. 22-26, jun. 2010.

MARQUES, M.; AGUIAR, C. R. C.; SILVA, J. J. L. S. da. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 1, jan./fev. 2011.

MARTINEZ, M. **InfoEscola**. Disponível em: <https://www.infoescola.com/materiais-de-laboratorio/espectrofotometro/>. Acesso em: 15 nov. 2018

MARTINS, D. F. F. **Estudo integrado do potencial fitorremediador da *Eichhornia crassipes* em ambientes naturais e sua utilização para obtenção de extratos proteicos**. 2014. 162 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Exatas e da Terra. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

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

MELENDEZ, L. B.; KÜTTER, V. T.; MONTES-BAYÓN, M.; SELLA, S. M.; SILVA-FILHO, E. V. Determinação de Metalotioneínas e Fitoquelatinas utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 4, n. 6, p. 612-622, out. 2012.

MENDOZA-CÓZATL, D.; LOZA-TAVERA, H.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, A.; MORENO-SÁNCHEZ, R. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 653-671, set. 2005.

MIRZA, N.; MAHMOOD, Q.; MAROOF, S. M.; PERVEZ, A.; SULTAN, S. Plants as Useful Vectors to Reduce Environmental Toxic Arsenic Content. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 1, p. 1-11, 2014.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 234-250, 2014.

OLIVEIRA, J. A.; CABRAIA, J.; CANO, M. A. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.

PEREIRA, A. C. C.; RODRIGUES, A. C. D.; ROCHA, M. C. de C.; SANTOS, A. M. dos; SANTOS, F. S. dos; SOBRINHO, N. M. B. do A. **Avaliação do potencial da Alface d'água (*Pistia stratiotes*) na biossorção de Pb ao longo do tempo**. Trabalho apresentado no 35. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Natal, 2015.

PEREIRA, J. P. **Características anatômicas e fisiológicas de aguapé e índice de fitorremediação de alface d'água cultivados na presença de arsênio, cádmio e chumbo**. 116 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PERNIA, B.; SOUSA, A.; REYES, R.; CASTRILLO, M. Biomarcadores de contaminación por cádmio em las plantas. **Interciência**, v. 33, n. 2, p. 112, 2008.

PIERRE J-P, B. ***Salvinia biloba* Raddi (ou *Salvinia herzogii*) dans La serre Du Botanischer Garten de Berlin-Dahlem**. 2013. 1 fotografia, color. Disponível em: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/Salvinia\\_biloba\\_Raddi.JPG](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/Salvinia_biloba_Raddi.JPG). Acesso em: 15 nov. 2018.

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.

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.

SALT, D. E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N. P. B. A.; DUSHENKOV, V.; ENSLEY, B. D.; CHET, I.; RASKIN, I. Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. **Bio/Technology**, v. 13, n. 5, p. 468-474, jun. 1995.

SANEPAR. Parque que homenageia imigração japonesa é reaberto em Curitiba. Curitiba, 2018. Disponível em: <http://site.sanepar.com.br/noticias/parque-que-homenageia-imigracao-japonesa-e-reaberto-em-curitiba>. Acesso em: 18 nov. 2018.

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.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHIGEOKA, S.; ISHIWAKA, T.; TAMOI, M. MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, mai. 2002.

SPARKS, D. L. Toxic Metals in the Environment: The Role of Surfaces. **Elements**, Richmond Hill, v. 1, n. 4, p. 193-197, set. 2005.

SPERLING, M. von. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 1995, p. 15-239.

STÜBER, K. ***Pistia stratiotes***. 2004. 1 fotografia, color. Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pistia\\_stratiotes0.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pistia_stratiotes0.jpg). Acesso em: 15 nov. 2018.

TAVARES, S. R. de L. Fitorremediação em solo e água de áreas contaminadas por metais pesados provenientes da disposição de resíduos perigosos. 2009. 371 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

TÉLLEZ, T. R.; LÓPEZ, E. M. de R.; GRANADO, G. L.; PÉREZ, E. A.; LÓPEZ, R. M.; GUZMÁN, J. M. S. The Water Hyacinth, *Eichhornia crassipes*: na invasive plant in the Guadiana River Basin (Spain). **Aquatic Invasions**, Badajoz, v. 3, n. 1, p. 42-52, mar. 2008.

VIEIRA, G. E. G.; SILVEIRA, C. R. da; CUTRIM, J.; RIBEIRO, J. Avaliação dos principais aspectos da fitorremediação aplicados na redução da poluição no solo e água. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 8, n. 2, p. 182-192, abr./jun. 2011.

WOOD, B. A.; FELDMANN, J. Quantification of phytochelatins and their metal(loid) complexes: critical assessment of current analytical methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3299-3309, 2012.

WRENCKE, D. **Cobre: etiopatogênia e tratamento**. 8 p. Seminário (Transtornos Metabólicos dos Animais Domésticos) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

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.

ZHU, Y. L.; PILON-SMITS, E. A. H.; JOUANIN, L.; TERRY, N. Overexpression of Glutathione Synthetase in Indian Mustard Enhances Cadmium Accumulation and Tolerance. **Plant Physiology**, v. 119, n. 1, p. 73-79, jan. 1999.