

PIGMENTOS LIPOSSOLÚVEIS E HIDROSSOLÚVEIS EM PLANTAS DE SALVÍNIA SOB TOXICIDADE POR CROMO¹

Liposoluble and Hydrosoluble Pigments in Salvinia under Chromium Toxicity

PEREIRA, P.F.², ANTUNES, F.³, BRAGA, V.F.⁴, RESENDE, C.F.⁵, RIBEIRO, C.⁶ e PEIXOTO, P.H.P.⁷

RESUMO - Devido à intensa utilização industrial, o cromo é considerado um importante poluente ambiental. O presente trabalho objetivou determinar os teores de pigmentos hidro e lipossolúveis em plantas de salvinia expostas a concentrações crescentes de Cr, visando estabelecer parâmetros bioquímicos para utilização dessa macrófita em programas de biomonitoramento e/ou fitorremediação da poluição causada por esse poluente metálico em ambientes aquáticos. As plantas foram submetidas a concentrações crescentes de Cr e avaliadas após quatro, seis e dez dias de tratamento. Os resultados dos ensaios permitiram concluir que plantas de salvinia sob condições de estresse por Cr apresentam reduções nas concentrações das clorofilas a, b e total e, em contraste, aumentos nas concentrações de antocianinas totais. Embora a concentração de carotenoides totais não tenha sido alterada em resposta ao Cr, as variações nas concentrações dos demais pigmentos lipossolúveis e dos pigmentos hidrossolúveis observadas nas folhas das plantas de salvinia podem ser utilizadas como parâmetros bioquímicos de biomonitoramento da poluição causada por esse elemento metálico em ambientes aquáticos.

Palavras-chave: *Salvinia auriculata*, biomonitoramento, fitorremediação, macrófitas, pteridófitas.

ABSTRACT - Due to widespread industrial use, chromium is considered a serious environmental pollutant. This study aimed to determine the content of hydrosoluble and liposoluble pigments in salvinia plants exposed to increasing concentrations of Cr, to establish biochemical parameters for the use of macrophyta in pollution bio-monitoring programs and/or phyto-remediation in aquatic environments by this pollutant metal. The plants were exposed to increasing concentrations of Cr and evaluated after four, six, and ten days of treatment. The test results showed that salvinia plants under stress conditions for Cr exhibit decreases in the concentrations of chlorophylls a, b, and total, and, in contrast, increases in anthocyanin concentrations. Although the concentration of carotenoids has not been altered in response to Cr, the variations in the concentrations of other liposoluble and hydrosoluble pigments found in salvinia plant leaves can be used as biochemical parameters for biomonitoring of pollution caused by this metallic element in aquatic environments.

Keywords: *Salvinia auriculata*, bio-monitoring, phyto-remediation, macrophyte, ferns.

INTRODUÇÃO

A poluição em ambientes aquáticos, especialmente em reservatórios de água doce, é um dos mais importantes problemas ambientais do mundo moderno (Chandra et al., 2004). Nas

últimas décadas, a quantidade de cromo (Cr) liberada nos ecossistemas aquáticos e terrestres aumentou como consequência de diferentes atividades humanas (Saha & Orvig, 2010). O cromo pode ser liberado naturalmente no ambiente a partir da decomposição da cromita

¹ Recebido para publicação em 11.7.2011 e aprovado em 9.4.2012.

² Bióloga, Mestranda em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa – DBV/UFV, <pauladafonsecapereira@yahoo.com.br>

³ Pesquisadora, Dra., do CCA, UFRR, <antunes.flavia@bol.com.br>; ⁴ Bióloga, Mestre em Ecologia, PGECOL/UFJF, <viplanta@yahoo.com.br>; ⁵ Biólogo, Doutorando em Ecologia, PGECOL/UFJF, <cristianoig2004@hotmail.com>; ⁶ Professor, Dr., Dep. de Biologia Geral, DBG/UFV, <cleberon.ribeiro@ufv.br>; ⁷ Professor, Dr., Dep. de Botânica, UFJF, <paulo.peixoto@ufjf.edu.br>



(FeCr_2O_4) e de outros minerais da crosta terrestre (Augustynowicz et al., 2010). Todavia, a principal fonte de liberação do cromo nos ecossistemas aquáticos está relacionada à aplicação industrial desse metal na metalurgia e nos curtumes (Saha & Orvig, 2010) e na fabricação de tintas e de corantes (Augustynowicz et al., 2010). Uma vez no ambiente, os estados de oxidação mais estáveis do cromo são o Cr(III) e o Cr(VI) (Soares et al., 2008; Gupta et al., 2009), sendo este último o mais tóxico devido à sua elevada mobilidade no solo e em ambientes aquáticos (Sun et al., 2010) e à capacidade de atravessar membranas biológicas, agindo como oxidante, interferindo na absorção de nutrientes e na fotossíntese, além de apresentar propriedades carcinogênicas e mutagênicas (Pandey et al., 2010; Nichols et al., 2000).

Em concentrações reduzidas, íons metálicos são essenciais à manutenção e ao desenvolvimento de todos os organismos, uma vez que muitas moléculas, enzimas e reações requerem elementos metálicos (Kucera et al., 2008). Entretanto, quando em quantidades excessivas, os metais podem interferir no metabolismo celular normal e tornando-se tóxicos às plantas e animais (Bertrand et al., 2005; Kucera et al., 2008). Como a maioria das tecnologias utilizadas para remover o excesso de cromo são onerosas e pouco eficientes, a fitorremediação se apresenta como uma alternativa de grande interesse na descontaminação de águas poluídas (Prado et al., 2010). Plantas aquáticas vasculares desempenham papel importante na captura, armazenamento e reciclagem de metais (Chandra et al., 2004), sendo utilizadas na remoção de resíduos sólidos em suspensão, nutrientes, metais pesados, bactérias e outras substâncias orgânicas tóxicas. Dados de fitotoxicidade para plantas aquáticas podem ser utilizados em decisões relacionadas aos riscos ambientais para muitos contaminantes. No caso do cromo, tem sido demonstrado que várias macrófitas aquáticas são capazes de reduzir Cr(VI) para a forma menos tóxica Cr(III) durante o processo de bioabsorção desse metal nas raízes (Prado et al., 2010). *Salvinia auriculata* é uma pequena pteridófito flutuante de água doce encontrada em regiões tropicais e temperadas. Sob condições favoráveis, essas plantas se disseminam rapidamente por propagação vegetativa

(Baral et al., 2009), colonizando extensas áreas de água em reduzido período de tempo.

O presente trabalho objetivou determinar os teores de pigmentos hidro e lipossolúveis em plantas de salvinia expostas a concentrações crescentes de Cr, visando estabelecer parâmetros bioquímicos específicos que possibilitem a utilização dessa macrófito em programas de biomonitoramento e/ou de fitorremediação da poluição causada por esse poluente metálico em ambientes aquáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em sala de crescimento nos meses de outubro e novembro de 2010, utilizando-se plantas aquáticas de *Salvinia auriculata* mantidas em condições controladas de temperatura (25-30 °C), fotoperíodo (16-8 h) e luminosidade (40 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As plantas foram cultivadas em vasos de PVC com 1,5 L de solução nutritiva de Clark (1975), pH 6,0, com 1/3 da força, sendo submetidas ao estresse por cromo [Cr(VI)], na forma de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg L^{-1} . As folhas das plantas mantidas nessas condições foram analisadas quanto à composição dos pigmentos lipossolúveis e hidrossolúveis após quatro, seis e dez dias da aplicação do cromo.

As concentrações das clorofilas *a*, *b* e totais e dos carotenoides totais foram determinadas pelo método de Lichtenthaler (1987). Amostras de 0,2 g de tecidos foliares foram maceradas em acetona 80% (v/v). O extrato foi filtrado e o volume completado para 25 mL. Em seguida, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro. A concentração de cada pigmento foi expressa em mg g^{-1} de matéria fresca.

A concentração de antocianinas foi determinada segundo Mancinelli (1990). Para a extração, foi utilizado 0,2 g de tecidos foliares mantidos em 5 mL de metanol HCl 1% (v/v) por 24 h, sob refrigeração (Downs & Siegelman, 1963). O extrato foi filtrado e completado para 10 mL. Em seguida, foi submetido à leitura em espectrofotômetro. A absorvância encontrada foi convertida em moles de antocianina, usando o coeficiente de extinção de $34.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a absorção máxima a 530 nm (Sielgeman & Hendricks, 1958). A concentração de antocianinas totais foi expressa em $\mu\text{moles g}^{-1}$ de matéria fresca.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os dados foram submetidos a análises de variância (teste F, $P < 5\%$), e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e totais não apresentaram alterações significativas nas folhas das plantas tratadas com o cromo (Cr) nas análises realizadas no quarto e no sexto dia após a aplicação dos tratamentos (Figura 1). Contudo, no décimo dia, observou-se redução significativa nas concentrações de clorofilas *a*, *b* e totais. Essa redução foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações de Cr (Figura 1).

Diversos trabalhos relatam variações na concentração de pigmentos em resposta ao estresse por Cr em plantas de *Salvinia* (Nichols et al., 2000; Shanker et al., 2005; Dhir et al., 2008, 2009), *Glycine max* e *Pistia stratiotes* (Ganesh et al., 2008), bem como de *Nymphaea spontanea* (Choo et al., 2006). Segundo relatos da literatura, o declínio observado nos teores de clorofila pode ser resultante da redução do conteúdo de ferro (Fe) nos tecidos, da redução da eficiência de enzimas envolvidas na biossíntese de clorofilas e/ou da substituição do átomo de Mg por metais pesados no centro do tetrapirrol das moléculas de clorofila (Dhir et al., 2008, 2009). Shanker et al. (2005) atribuem os decréscimos observados na relação clorofila *a/b* provocados pela exposição ao Cr à redução do tamanho da fração periférica do complexo antena. Conforme considerações desses autores, as reduções nos conteúdos de clorofila *b* pelo Cr se devem à desestabilização ou à degradação de proteínas da parte periférica do complexo antena; a inativação de enzimas envolvidas na rota de biossíntese das clorofilas também poderia contribuir para a redução geral no conteúdo de clorofilas em resposta ao estresse. As reduções nas concentrações de clorofilas também podem estar associadas ao aumento da atividade de clorofilases (Prado et al., 2010) ou, ainda, a alterações ultraestruturais nas membranas (Pettersson et al., 1985). Bassi et al. (1990) sugerem que essa redução seja decorrente do aumento do tamanho dos cloroplastos ou da

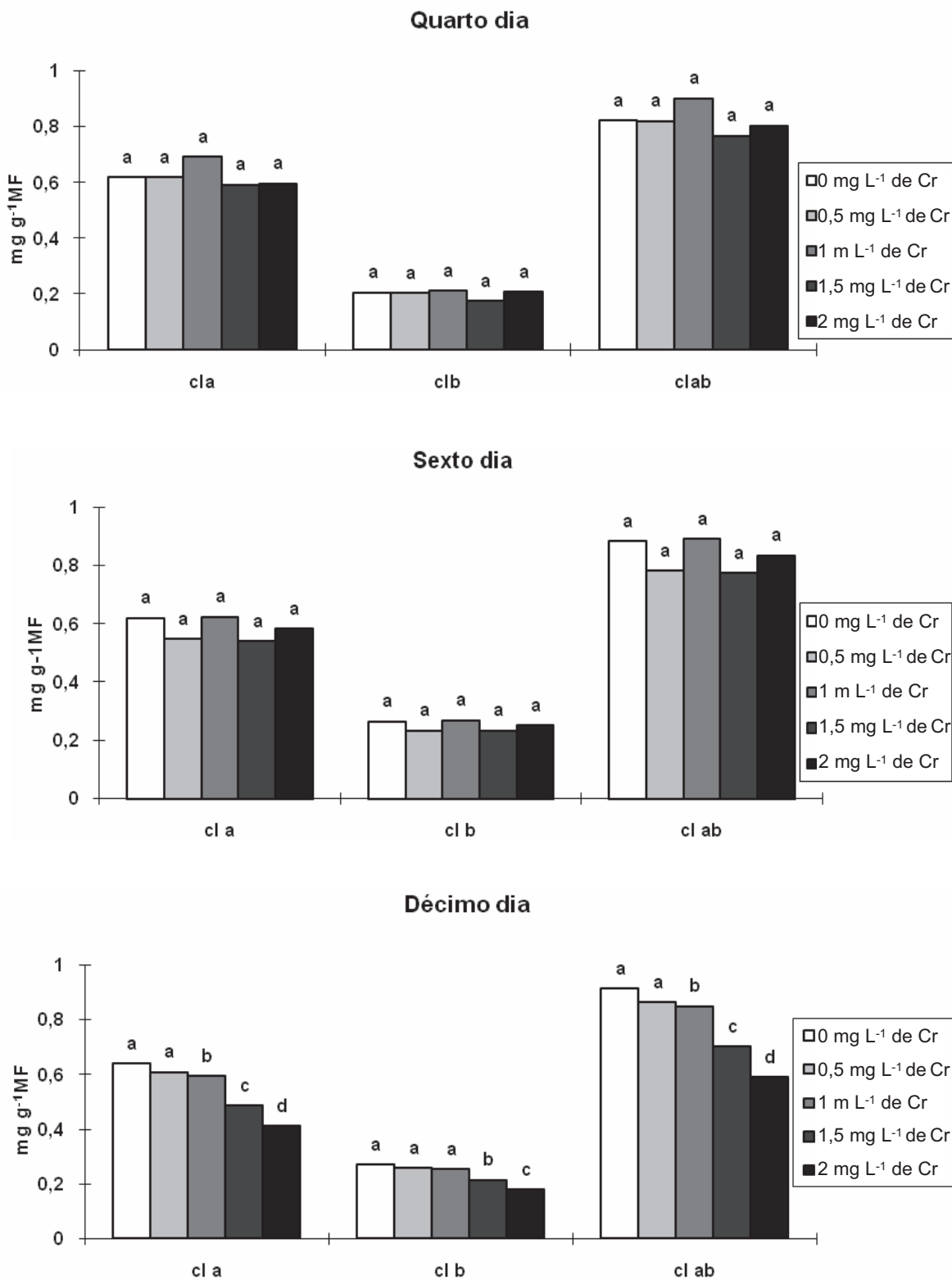
desestruturação dos tilacoides. Segundo Subrahmanyam (2008), a exposição ao cromo pode induzir alterações na ultraestrutura dos cloroplastos, o que reduz o desenvolvimento do sistema lamelar, originando tilacoides com menos grana.

Em contraste ao observado no presente trabalho, Augustynowicz et al. (2010) mostraram que plantas de *Callitriche cophocarpa* crescidas em solução com 50 μM de Cr(VI) exibiram atividade fotossintética e morfologia da parte aérea e raízes similares às do controle. Espinoza-Quiñones et al. (2008) também obtiveram resultados semelhantes com plantas de *Salvinia auriculata* e *Eichhornia crassipes*, que não exibiram sinais de estresse quando submetidas a concentrações de Cr(VI) menores que 3,5 mg L^{-1} e de Cr(III) menores que 5,0 mg L^{-1} . Em *Pistia stratiotes*, Mufarrije et al. (2010) verificaram que concentrações de até 7 mg L^{-1} de Cr não resultaram em alterações das taxas de crescimento relativo. Todavia, os mecanismos de síntese de clorofila foram alterados pelo metal, embora tenha sido observado que em concentrações reduzidas o Cr pode aumentar as concentrações de clorofila em plantas de *Pistia stratiotes*, o que é atribuído ao aumento da disponibilidade de ferro (Fe) nos tecidos das plantas (Mufarrije et al., 2010).

Em nenhuma das análises realizadas, as concentrações de carotenoides apresentaram alterações significativas em resposta ao aumento da concentração de Cr (Figura 2). Resultados similares foram observados por Nichols et al. (2000) em plantas de *Salvinia minima* tratadas com Cr(VI) nas concentrações de 1 e 2 mg L^{-1} . Os carotenoides podem atuar como antioxidantes e varredores de espécies reativas de oxigênio geradas sob condições de estresse por metais pesados (Gupta et al., 2009). Além disso, seu acúmulo nos tecidos foliares está relacionado à proteção do aparelho fotossintético contra radiações de alta energia (Demmig-Adams, 1990). Contudo, os resultados encontrados no presente trabalho indicam que esse sistema de fotoproteção não foi significativamente afetado, pelo menos durante o período de avaliação do ensaio.

Em contraste, as concentrações de antocianinas totais foram significativamente maiores na presença de Cr nas análises realizadas com quatro, seis e dez dias após a imposição dos





Médias seguidas por mesmas letras (para cada pigmento) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Figura 1 - Concentrações de clorofila a (cl a), clorofila b (cl b) e clorofila total (cl ab) em folhas de *Salvinia auriculata* após quatro, seis e dez dias de aplicação do cromo.

tratamentos (Figura 3). Trabalhos anteriores reportaram que as antocianinas são produzidas em plantas aquáticas em resposta a diversos fatores de estresse, contribuindo para o

sequestro de metais no vacúolo e para a consequente redução da toxicidade citoplasmática (Nichols et al., 2000; Bertrand et al., 2005). No presente estudo, o conteúdo total de

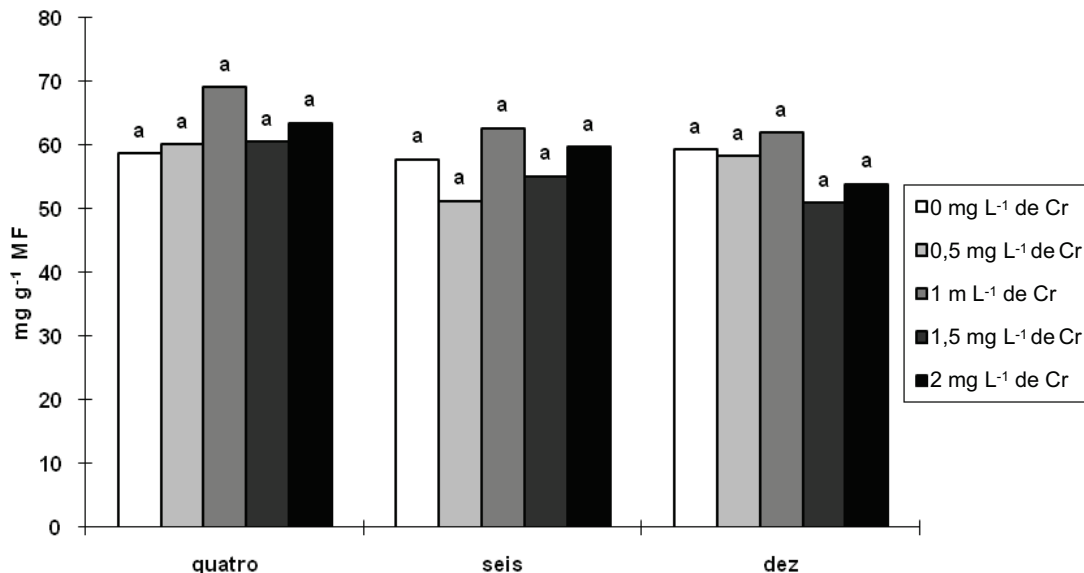


Figura 2 - Concentrações de carotenoides totais em folhas de *Salvinia auriculata* após quatro, seis e dez dias de aplicação do cromo. Médias seguidas por mesmas letras em cada uma das avaliações não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

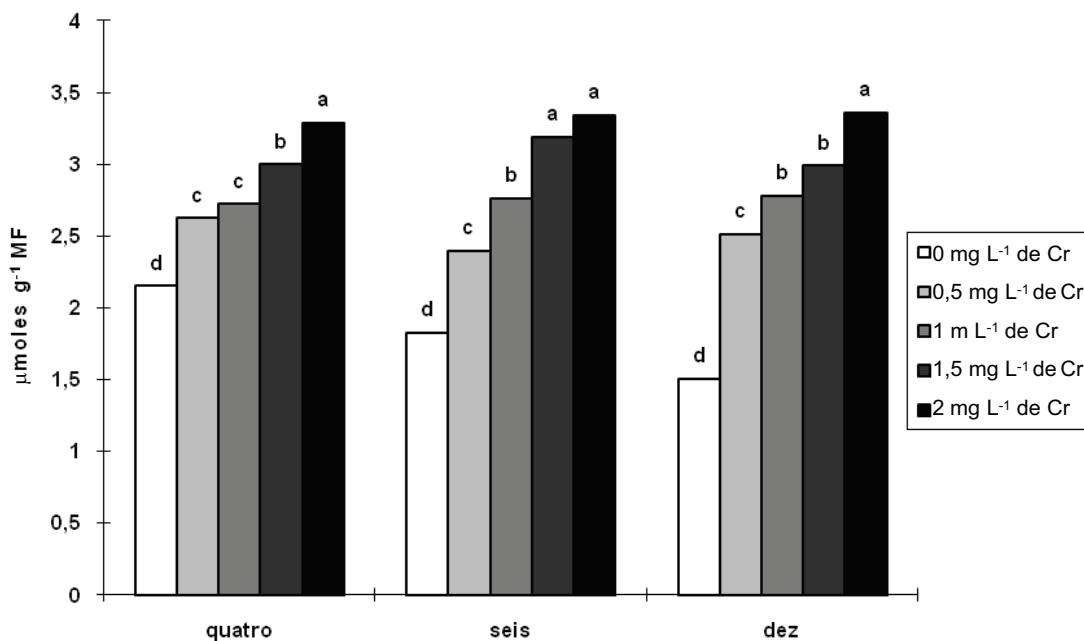


Figura 3 - Concentrações de antocianinas em folhas de *Salvinia auriculata* após quatro, seis e dez dias de aplicação do cromo. Médias seguidas por mesmas letras em cada uma das avaliações não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



antocianinas aumentou linearmente em resposta ao incremento da concentração do Cr, o que sugere a participação desses flavonoides nas respostas metabólicas das plantas ao estresse causado por esse íon metálico. Um dos efeitos metabólicos associados às antocianinas é a proteção do aparelho fotossintético (Zhang et al., 2010). Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que, sob condições de toxicidade por Cr, as antocianinas podem ter contribuído mais intensamente na proteção do aparelho fotossintético do que os carotenoides. As antocianinas são antioxidantes muito potentes, atuando em resposta a diferentes estresses oxidativos (Steyn, 2002), o que provavelmente ocorreu neste trabalho em resposta ao estresse causado pelo Cr.

Embora a concentração de carotenoides totais não tenha sido alterada, verificou-se que, sob condições de estresse por Cr, plantas de salvinia apresentam aumentos nas concentrações das clorofilas *a*, *b* e totais e, também, nas concentrações de antocianinas totais. Conclui-se, portanto, que as variações nas concentrações dos pigmentos hidro e lipossolúveis em plantas de salvinia podem ser utilizadas como parâmetros bioquímicos no monitoramento da poluição causada pelo Cr em ambientes aquáticos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro na execução e publicação deste trabalho.

LITERATURA CITADA

- AUGUSTYNOWICZ, J. et al. Chromium(VI) bioremediation by aquatic macrophyte *Callitriche cophocarpa* Sendtn. **Chemosphere**, v. 79, n. 11, p. 1077-1083, 2010.
- BARAL, S. S. et al. Removal of Cr(VI) by thermally activated weed *Salvinia cucullata* in a fixed-bed column. **J. Hazard Mater.**, v. 161, n. 2-3, p. 1427-1435, 2009.
- BASSI, M.; CORRADI, G.; RICCI, A. Effects of chromium (VI) on two freshwater plants, *Lemna minor* and *Pistia stratiotes*; biochemical and physiological observations. **Cytobios**, v. 62, n. 249, p.101-109, 1990.
- BERTRAND, M.; POIRIER, I. Photosynthetic organisms and excess of metals. **Photosynthetica**, v. 43, n. 3, p. 345-353, 2005.
- CHANDRA, P.; KULSHRESHTHA, K. Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. **Bot. Rev.**, v. 70, n. 3, p. 313-327, 2004.
- CHOO, T. P. et al. Accumulation of chromium (VI) from aqueous solutions using water lilies (*Nymphaea spontanea*). **Chemosphere**, v. 62, n. 6, p. 961-967, 2006.
- CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric. Food Chem.**, v. 23, n. 3, p. 458-460, 1975.
- DEMMIG-ADAMS, B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophylls zeaxanthin. **BBBA-Bioenerg.**, v. 1020, n. 1, p. 1-24, 1990.
- HIR, B.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. P. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 20, n. 1, p. 61-70, 2008.
- HIR, B. et al. Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 72, n. 6, p. 1790-1797, 2009.
- DOWNS, R. J.; SIEGELMAN, H. W. Photocontrol of anthocyanin synthesis in milo seedlings. **Plant Physiol.**, v. 38, n. 1, p. 25-30, 1963.
- ESPINOZA-QUIÑONES, F. R. et al. Chromium ions phytoaccumulation by three floating aquatic macrophytes from a nutrient medium. **World J. Microbiol. Biot.**, v. 24, n. 12, p. 3063-3070, 2008.
- GANESH, K. S. et al. Chromium stress induced alterations in biochemical and enzyme metabolism in aquatic and terrestrial plants. **Colloids Surfaces B: Biointerf.**, v. 63, n. 2, p. 159-163, 2008.
- GUPTA, S.; SRIVASTAVA, S.; SARADHI, P. P. Chromium increases photosystem 2 activity in *Brassica juncea*. **Biol. Plant.**, v. 53, n. 1, p. 100-104, 2009.
- KUÈERA, T.; HORÁKOVÁ, H.; ŠONSKÁ, A. Toxic metal ions in photoautotrophic organisms. **Photosynthetica**, v. 46, n. 4, p. 481-489, 2008.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzimol.**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- MANCINELLI, A. L. Interaction between light quality and light quantity in photoregulation of anthocyanin production. **Plant Physiol.**, v. 92, n. 4, p. 1191-1195, 1990.
- MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R.; MAINE, M. A. Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and Phosphorous. **Archi. Environ. Cont. Toxicol.**, v. 58, n. 1, p. 53-61, 2010.



- NICHOLS, P. B.; COUCH, J. D.; AL-HAMDANI, S. H. Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. **Aquat. Bot.**, v. 68, n. 4, p. 313-319, 2000.
- PANDEY, V.; DIXIT, V.; SHYAM, R. Chromium effect on ROS generation and detoxification in pea (*Pisum sativum*) leaf chloroplasts. **Protoplasma**, v. 236, n. 1-4, p. 85-95, 2010.
- PETTERSSON, A. L.; HAELLBOM, L.; BERGMAN, B. Physiological and structural responses of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* to aluminum. **Physiol. Plant.**, v. 63, n. 2, p. 153-158, 1985.
- PRADO, C. et al. Uptake of chromium by *Salvinia minima*: effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism. **J. Hazard. Mater.**, v. 177, n. 1-3, p. 546-553, 2010.
- SAHA, B.; ORVIG, C. Biosorbents for hexavalent chromium elimination from industrial and municipal effluents. **Coordin. Chem. Rev.**, v. 254, n. 23-24, p. 2959-2972, 2010.
- SHANKER, A. K. et al. Chromium toxicity in plants. **Environ. Int.**, v. 31, n. 5, p. 739- 753, 2005.
- SIEGELMAN, H. W.; HENDRICKS, S. B. Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin. **Plant Physiol.**, v. 33, n. 3, p. 185-190, 1958.
- SOARES, D. C. F. et al. *Salvinia auriculata*: aquatic bioindicator studied by instrumental neutron activation analysis (INAA). **Appl. Radiat. Isotopes**, v. 66, n. 5, p. 561-564, 2008.
- STEYN, W. J. et al. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. **New Phytol.**, v. 155, n. 3, p. 349-361, 2002.
- SUBRAHMANYAM, D. Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Photosynthetica**, v. 46, n. 3, p. 339-345, 2008.
- SUN, X-F. et al. Sorption and detoxification of chromium(VI) by aerobic granules functionalized with polyethylenimine. **Water Res.**, v. 44, n. 8, p. 2517-2524, 2010.
- ZHANGA, K-M. et al. Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. **Plant Sci.**, v. 179, n. 3, p. 202-208, 2010.

