



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
2007

**André Luiz  
Nunes Ferreira**

Exposição de Crómio em alface: acumulação e  
efeitos na fisiologia e genotoxicidade



**Universidade de Aveiro**

**Departamento de Biologia**

**Laboratório de biotecnologia vegetal**

**Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia**

# Exposição de Crómio em alface: acumulação e efeitos na fisiologia e genotoxicidade

Andre Luiz  
Nunes Ferreira  
Orientadora  
Dra.: Conceição Santos



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
**2007**

**Andre Luiz  
Nunes Ferreira**

## Exposição de Crómio em alface: acumulação e efeitos na fisiologia e genotoxicidade

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em toxicologia e ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

**O júri**  
Presidente

Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves  
Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro  
Departamento de Biologia

Prof. Doutor Jorge Manuel Soares  
Professor auxiliar da Universidade de Aveiro,  
Departamento de Física

Prof. Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira  
Professor auxiliar convidado da Universidade de Aveiro,  
Departamento de Biologia

Prof. Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira Santos  
Professora associada da Universidade de Aveiro  
Departamento de Biologia

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Conceição Santos, agradeço a possibilidade de realização deste trabalho, por ser crítica, por ter Orientado, por ter fortalecido. Obrigado.

Ao Engº Armando Costa, agradeço a colaboração nas tarefas laboratoriais e os conhecimentos profundos sobre dentre outros assuntos, botânica, e por partilha-los.

Aos colegas de Laboratório, em especial, Lic.: Eleazar Rodrigues e Mónica Almeida pelas sugestões, críticas, e colaboração.

Ao Professor Doutor Jorge Soares, pela oportunidade de trabalhar consigo, de pelas sugestões e pela técnica em EPR.

Aos amigos que fiz em Aveiro.

Aos amigos que sempre mantive

A Erica pela força, apoio e incentivo

A minha família, minha preciosa família.

Este trabalho foi apoiado pelo laboratório de biotecnologia e Citomica, o Cientista financiado pelo Fundo Nelson Ferreira de apoio a ciência

## Resumo

O crómio geralmente ocorre no meio ambiente nas suas 2 valências mais estáveis Cr(III) e Cr(VI). A contaminação dos solos com estas valências precisa ser melhor compreendida quanto aos seus efeitos nos vegetais (fisiologia e genoma). Este trabalho utilizou três variedades de plantas de alface cultivadas em meio sólido expostas a 20 50 100 150 200 e 300 mgCrL<sup>-1</sup>. Após 30 dias de exposição e 4 doses de solução com Cr, as plantas foram analisadas nos comprimentos, conteúdos hídricos, conteúdo em matéria orgânica, elementos inorgânicos, isoformas paramagnéticas de Cr e diferenças de ploidia percentagem G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>:G<sub>2</sub> e conteúdo em ADN. Os resultados comprovaram que a variedade Pova foi a mais susceptível e a Teide mais resistente aos efeitos fitotóxicos do Cr. A valência Cr(VI), como era de esperado, mostrou maior potencial tóxico, na generalidade dos parâmetros analisados, teve maior acumulação tanto na porção aérea como na raiz, interferiu com P, K e Zn em suas maiores concentrações; já as plantas expostas a Cr (III) mostraram interferência apenas nas quantidades de P. A análise preliminar por ressonância paramagnética (EPR) evidenciou que o Cr(VI), ao ser absorvido pela raiz, é oxidado para a uma forma paramagnética, provavelmente Cr(III). Contrariamente o sinal paramagnético de material exposto a Cr(III) era não detectável. As amostras de alface não demonstraram diferenças de ploidia, no entanto foram encontradas diferenças nas percentagens de G<sub>2</sub> nas plantas submetidas a 300 mgCr(VI) L<sup>-1</sup> mas não nas plantas expostas a Cr(III) o que revela alterações de ciclo celular sob efeito desta valência de metal. O conteúdo em ADN mostrou diferenças para as folhas da variedade Pova Cr(VI) e nas raízes da variedade Teide e Twistil. Este trabalho confirma o maior efeito tóxico do Cr(VI) face ao Cr(III), a resposta heterogénea entre as variedades de alface. Estes resultados abrem perspectivas a desenvolver muitos outros estudos, sobretudo ao nível do EPR, ao nível dos efeitos de ciclo celular, fotossíntese e stress oxidativo.

## Abstract

Chromium occurs in environment mainly in the 2 most stable valence states Cr(III) and Cr(VI). The increasing soil contamination with these Cr states claims for a better understanding of their effects in plants (from physiology to genomics). This work used three varieties of cultivated plants of lettuce on solid medium exposed to (20 50 100 150 200 and 300 mgCr L<sup>-1</sup>, either Cr(III) or Cr(VI)). Thirty days after exposure, the plants were analyzed in the lengths, water contents, inorganic elements, content in organic matter, paramagnetic Cr signal, and differences of ploidy and percentage G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>: G<sub>2</sub> and content in DNA. Results show that the variety Povia was the most sensitive, and the Teide was the most resistant one. The form Cr(VI), as expected, showed higher toxicity, in the general parameters analysed. It also had higher accumulation in roots than Cr(III), and roots in general accumulated more Cr than shoots. Cr(VI) affected P, K e Zn accumulation, mostly in roots. Plants exposed to Cr(III) showed interference only with P accumulation. The preliminary analysis of paramagnetic Cr signal by electronic paramagnetic resonance (EPR) showed that Cr(VI), being absorbed by roots, accumulated large amounts of paramagnetic form, probably, Cr(III). On other hand material exposed to Cr(III) showed no detectable levels of paramagnetic signal. The samples of lettuce did not show differences in ploidy level, showing no genotoxicity effects of Cr at this level. However, differences were found with respect to G<sub>2</sub> percentage in plants exposed to 300 mg Cr(VI) L<sup>-1</sup> but not in plants exposed to Cr(III), showing that the Cr(VI) form induces changes in the cell cycle. The content of DNA, in these preliminary studies showed that leaves of Povia exposed to Cr(VI) and roots Teide e Twistil. This work supports different behaviour of lettuce varieties. It also confirms the higher toxicity of Cr(VI) than Cr(III). The results open perspectives to other studies mostly at the level of EPR, cell cycle, photosynthesis and oxidative stress

# Índice

1	Introdução	1
	Breves considerações sobre o Cromio	1
1.1	Valências de Cromio : ênfase em Cr (III) e Cr (VI)	1
1.2	Cromio nos solos e plantas	2
1.3	Toxicidade do Cromio.	3
1.4	Morfologia e fisiologia	5
1.5	Genotoxicidade	13
1.6	Considerações gerais sobre <i>Lactuca sativa</i> L.	15
1.7	Utilização da <i>Lactuca sativa</i> em estudos toxicológicos	16
1.8	Objetivos do Trabalho	17
2.	Material e Métodos	18
2.1	Material biológico, condições de crescimento e de exposição a crômio	18
2.2.	Determinação de parâmetros de crescimento	20
2.3	Determinação da osmolalidade dos tecidos	21
2.4	Análise de elementos inorgânicos	21
2.5	Ressonância eletrônica paramagnética (EPR)	22
2.6	Citometria de Fluxo	23
2.7	Análise estatística	24
3.	Resultados	25
3.1	Análise de crescimento	25
3.2	Conteúdo hídrico	28
3.3	Conteúdo em material orgânica	30
3.4	Osmolalidade dos tecidos	31
3.5	Análise dos elementos inorgânicos	37
3.5.1	Conteúdo de Crômio total	33
3.5.2	Análise dos macronutrientes	34
3.5.3	Análise dos micronutrientes	39
3.6	Deteção por EPR de formas paramagnéticas de Cr	45
3.7	Análise do Crômio na genotoxicidade e no ciclo celular por Citometria de fluxo	48
4.	Discussão	50
5.	Bibliografia	57

## Índice de figuras

Figura 1.1: Curvas padrão da resposta da distribuição relativa das doses envolvendo efeito Hormesis. A curva em forma de U invertida foi usada para finalidades ilustrativas, visto que os exemplos na base de dados do Hormesis incluem curvas invertidas do tipo <i>e.g.</i> U. Modificado de Calabrese (2003).	5
Fig 1.2: Modelo de entrada do Crómio (Cr(III) e Cr(VI)) em célula Animal.(O'Brien 2003).	14
Fig.2.1: Variedades de <i>Lactuca sativa</i> L.: a ) Twistil; b) Teide; c) Povia	18
Fig.2.2: Crescimento das diferentes variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. em estufa.	18
Fig.2.3: Ilustração da composição, recipiente-substrato-vegetal, onde plantas de <i>L.sativa</i> foram expostas a Crómio	22
Fig 3.1: Comprimento (cm) da parte aérea de três variedades de <i>L.sativa</i> expostas a Cr(III) e Cr(VI) Controlo = 0 (vermelho), eixo x = concentração do crómio (mg Cr/L). Tabelas referentes ao resultados da análise de variância das médias (s-significativo $p < 0.05$ , ns- não significativo $p > 0.05$ ).	26
Fig 3.2: Comprimento (cm) da Raiz de três variedades de <i>L.sativa</i> expostas a Cr(III) e Cr(VI) Controlo = 0 (vermelho), eixo x = concentração do crómio (mg Cr/L). Tabelas referentes ao resultados da análise de variância das médias (s-significativo $p < 0.05$ , ns- não significativo $p > 0.05$ ).	27
Fig 3.3: Conteúdo Hídrico da P.A de três variedades de <i>L.sativa</i> expostas a Cr(III) e Cr(VI) Controlo = 0 (vermelho), eixo x = concentração do crómio (mg Cr/L). Tabelas referentes ao resultados da análise de variância das médias (s-significativo $p < 0.05$ , ns- não significativo $p > 0.05$ ).	28
Fig 3.4: Conteúdo Hídrico da raiz de três variedades de <i>L.sativa</i> expostas a Cr(III) e Cr(VI) Controlo = 0 (vermelho), eixo x = concentração do crómio (mg Cr/L). Tabelas referentes ao resultados da análise de variância das médias (s-significativo $p < 0.05$ , ns- não significativo $p > 0.05$ ).	29
Fig 3.5: Efeito do Crómio (20, 50,100,150, 200 mgCr/L) no conteúdo em matéria orgânica para três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. (A- Parte aérea, B- Raiz).	30
Fig 3.6. Efeito do cromio na osmolalidade dos tecidos (folha e raiz) para três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L.	32

Fig 3.7 : Acumulo de Cr em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. expostas a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	34
Fig 3.8 : Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) nas concentrações de Mg em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	35
Fig3.9: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) nas concentrações de K em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	36
Fig 3.10: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) nas concentrações de Ca em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	37
Figura 3.11: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) nas concentrações de P em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	38
Figura 3.12: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) nas concentrações de Zn em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	40
Figura 3.13: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) nas concentrações de B em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	41
Figura 3.14: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) nas concentrações de Mn em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	42
Figura 3.15: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) nas concentrações de Cu em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	43
Figura 3.16: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg Cr/L) nas concentrações de Fe em três variedades de <i>Lactuca sativa</i> L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).....	44
Fig 3.17: Espectro de análise por ressonância electrónica paramagnética (EPR), para raízes da variedade Pova de <i>Lactuca sativa</i> . ....	45
Fig 3.18: Espectro de análise por ressonância electrónica paramagnética (EPR), para raízes da variedade Pova de <i>Lactuca sativa</i> expostas a Cr (VI) nas concentrações 50 (A), 150 (B) e 300 (C) mg L <sup>-1</sup> (a letra b e a seta evidenciam o pico referente à forma paramagnética de Crómio).....	46

Fig 3.19: Espectro de análise por ressonância electrónica paramagnética (EPR), para raízes da variedade Pova de *Lactuca sativa* expostas a Cr (III) nas concentrações 50 (A), 150 (B) e 300 (C) mgCr/L.....47

Fig 3.19: Histograma relativo a intensidade de fluorescência (FL) obtido através de simultâneas análises de núcleos isolados de *P. sativum* cv. Ctirad e *L. sativa* raízes e folhas do controlo e expostas a Cr. Médias (FL) de *L.sativa* L, variedade Pova, (picos 1 and 3), e *Pisum sativum* “standard” (peak 2 and 4). A- Folha controlo, B- raiz controlo C- folha em 200 mg Cr(VI)/L D- Raiz em 200 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI).....48

### **Índice de Tabelas.**

Tabela 1.1: Valências do Crómio e meio ambiente.....	1
Tabela 1.2: Concentrações de Crómio no ambiente.....	3
Tabela 2.1: Composição da solução comercial Hoagland, a partir da qual se preparou a solução de rega Hoagland a meia força.....	19
Tabela 2.2. Limites de detecção do ICPS para os elementos em estudo.....	22
Tabela 3.1, Percentagem média da fase G2 em três cultivares de <i>Lactuca sativa</i> expostas a Crómio.....	49
Tabela 3.2.: Médias (n=3) dos conteúdos em ADN (pg) de três variedades de <i>Lactuca sativa</i> expostas a Cr(III) e Cr(VI).....	49

## 1. Introdução

### Breves considerações sobre o Crómio

#### 1.1 Valências de Crómio: ênfase em Cr (III) e Cr(VI)

O cromo (Cr) é encontrado naturalmente como resultado do intemperismo das rochas, pode existir em águas fluviais, oceânicas e no solo. As suas valências mais estáveis são o Cr(III) e o Cr(VI), enquanto as valências I, II, IV e V, são encontradas raramente devido a serem muito instáveis (tabela I) (Who, 1988). o seu estado de oxidação Cr(III) é altamente insolúvel e imóvel, tendendo a formar complexos com aniões inorgânicos e orgânicos (CCME, 1999; Mc Neely et al., 1979).

Tabela 1.1: Valências do Crómio e meio ambiente.

Espécie química	Estado de oxidação	Exemplos	Observações
Cr elemental	Cr(0)	-	Não ocorre naturalmente
Cr divalente	Cr(II)	CrBr <sub>2</sub> , CrCl <sub>2</sub> , CrF <sub>2</sub> , CrSe, Cr <sub>2</sub> Si	Relativamente instável, com tendência a oxidação para o estado trivalente
Cr trivalente	Cr(III)	CrB, CrB <sub>2</sub> , CrBr <sub>3</sub> , CrCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O, CrCl <sub>3</sub> , CrF <sub>3</sub> , CrN, KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	Forma estável, ocorrendo na natureza comumente como ferrocromite (FeCr <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ).
Cr tetravalente	Cr(IV)	Dióxido de Cr - CrO <sub>2</sub> , Tetrafluorido de Cr - CrF <sub>4</sub>	Não ocorre naturalmente e representa um importante intermediário para a redução do estado Cr(V). Compostos com Cr(IV) são pouco comuns. O ion Cr(IV) e seus compostos são muito pouco estáveis e por causa de sua curta meia-vida é detectado como um estado entre Cr(VI) e Cr(III).
Cr pentavalente	Cr(V)	Tetraperoxidocromato -CrO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , percrômato de potássio	Não ocorre naturalmente e representa um importante intermediário da redução do Cr(VI). Cr(V) é uma forma derivada do anião CrO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> e tem vida longa podendo ser observado diretamente, entretanto poucos compostos estáveis contêm Cr(V)
Cr hexavalente	Cr(VI)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> , BaCrO <sub>4</sub> , CaCrO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	A segunda forma mais estável do Cr. Pode ocorrer naturalmente como um raro mineral chamado crocoíte (PbCrO <sub>4</sub> ) e raramente no estado livre, mas é muito produzido por atividade antropogénica.

Fonte: (Niboer e Jusys, 1988; Syracuse Research corporation, 1993; Katz and Salem, 1994) *Apud* de Zayed (2003)

O Cr(VI) é muito solúvel e relativamente estável em ambientes aquáticos aeróbicos. A ocorrência desta valência é predominante em meios oxidantes e de pH superior a 5 (Mills et al., 1985; CCME, 1989). Em condições anaeróbicas ou redutoras, ou ainda em condições de pH neutro ou levemente alcalino, o Cr(VI) é reduzido a Cr(III), tornando-se assim pouco biodisponível (Taylor et al., 1979). A valência Cr(VI), não sendo essencial, apresenta – provavelmente devido a diversos factores como a maior solubilidade, mobilidade, e pelo facto de atravessar as membranas celulares mais facilmente que a valência (III) – maior toxicidade/carcinogenicidade para os animais, e em particular para o ser humano, do que o Cr(III) (O'Brien et al., 2003).

## **1.2. Crómio nos solos e plantas.**

A contaminação da água e do solo por resíduos industriais tem sido a maior causa de exposição: destacam-se nesta origem antropogénica, efluentes/solos contaminados por metalurgia, indústria de papel, tinturaria, cromagem de diversos materiais (Kotas e Stasicka, 2000; Zayed e Terry, 2003) e ainda curtumes de couros (Nriagu, 1988; Barnhart, 1997; Jordão et al., 1999).

No solo, a distribuição e biodisponibilidade do Cr na biota depende basicamente de três tipos de reacções: oxidação/redução, a precipitação/dissolução, e absorção/desabsorção. Estas reacções lidam, basicamente, com a capacidade de transformação e biodisponibilidade do material (Saleh et al., 1989). A redução de Cr (VI) a Cr(III) tem sido proposta como uma estratégia para reduzir os níveis da forma Cr(VI) do solo. Esta estratégia passa pela adição de H<sub>2</sub>S, ferro reduzido (FeII) e ainda adição de carbono orgânico (e.g. ácidos orgânicos) (Tokunaga et al., 2003). Esta remediação pode ser efectuada por processos abióticos e por microrganismos. Assim, para além das condições ambientais abióticas (e.g. clima, pH do solo), a microbiota do solo será condicionante da capacidade de remediação de um solo contaminado em Cr(VI) (Tokunaga et al., 2003).

As concentrações de Cr em plantas de solos não contaminados são comumente menores que  $1 \text{ mg kg}^{-1}\text{Cr}$  (DW), raramente excedendo  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , e tipicamente na ordem de  $0.02 - 0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ (DW) (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Pratt, 1966). Em condições naturais este elemento é raramente tóxico para as plantas, tornando-se tóxico em solos altamente básicos ou na presença de rochas que naturalmente possuem concentrações elevadas de crómio (Adriano, 1986).

Tabela 1.2: Concentrações de Crómio no ambiente.

Table 2	
Concentrações do Cromio no ambiente.	
Tipo	Concentrações
Solos naturais	$5-1000 \text{ mg kg}^{-1}$
	$5-3000 \text{ mg kg}^{-1}$
	$5-1500 \text{ mg kg}^{-1}$
	$30-300 \text{ mg kg}^{-1}$
	residual 5.23%
Solos de “Serpentine”	$634-125,000 \text{ mg kg}^{-1}$
Solos (mundiais)	$200 \text{ mg kg}^{-1}$ (média)
	$100-300 \text{ mg kg}^{-1}$
	$10-150 \text{ mg kg}^{-1}$ ( Média $40 \text{ mg kg}^{-1}$ )
Solos (EUA)	$25-85 \text{ mg kg}^{-1}$ (Média $37 \text{ mg kg}^{-1}$ )
	$57 \text{ mg kg}^{-1}$ (Média)
Solos (Canadá)	$100-5000 \text{ mg kg}^{-1}$ (Média $43 \text{ mg kg}^{-1}$ )
Solos (Japão)	$87 \text{ mg kg}^{-1}$ (Média)
Solos (Suíça)	$74 \text{ mg kg}^{-1}$ (Média)
Sedimentos	$0-31,000 \text{ mg kg}^{-1}$
Água doce	$0-117 \mu\text{g L}^{-1}$ (avaliado - $9.7 \mu\text{g L}^{-1}$ )
Águas oceânicas	$0-0.5 \mu\text{g L}^{-1}$
Ar	$1-545,000 \text{ ng m}^{-3}$
	$100 \text{ ng m}^{-3}$
Plantas	$0.006-18 \text{ mg kg}^{-1}$
Animais	$0.03-1.6 \text{ mg kg}^{-1}$

Modificado de Zayed and Terry (2003) por Shanker (2005).

### 1.3. Toxicidade do Crómio.

A elevada disponibilidade deste elemento pode trazer sérios riscos para o ambiente. O crómio (Cr III) é considerado um micronutriente essencial fisiologicamente activo e bastante relatado em estudos no metabolismo da glucose em animais (Schwartz e Mertz, 1959, O’Brien et al., 2003). Contudo, apesar de essencial, o Cr(III) em concentrações elevadas mostra-se tóxico, em particular, carcinogénico,

embora o risco carcinogénico dependa do composto químico contendo Cr e da sua forma de administração (O'Brien et al., 2003), por exemplo, a exposição a  $K_2CrO_4$  e a  $PbCrO_4$  é menos carcinogénica que a exposição a  $ZnCrO_4$  que tem uma solubilidade intermédia relativamente aos dois compostos anteriores (O'Brien et al., 2003). Apesar de bem estudados em sistemas animais, muito pouco se sabe, comparativamente, sobre a toxicidade deste elemento nas plantas. Aparentemente, o Cr não é um elemento essencial para plantas (*e.g.* Zayed e Terry 2003).

Huffman and Allway (1973) confirmam que plantas de alface, tomateiro, trigo e feijoeiro apresentaram, em geral, um crescimento normal quando expostas a soluções de  $3,8 \times 10^{-4} \mu M$ . Nesse ensaio, os autores discutem efeitos dispersos e/ou contraditórios (descritos por outros autores) onde o Cr frequentemente estimula o crescimento. Dentro das explicações possíveis, encontra-se o efeito nos microrganismos da rizosfera, e possível interacção com outros nutrientes como o Mo.

Noutros estudos, plantas de *P. vulgaris*, deficientes em ferro, apresentaram menor clorose, enquanto no controlo (plantas suplementadas com ferro) se verificou um estímulo do crescimento, quando expostas a pequenas doses de Cr(III) (Bonet et al. 1991). Os mesmos autores referiram também que o Cr não interfere nas relações do Fe-Mn e P-Fe (Bonet et al. 1991). Este aparente estímulo de baixas concentrações (*e.g.* 22 ng Cr para *P. vulgaris*) de Cr no crescimento de plantas pode ter relação com o “efeito Hormesis” que, é definido por Calabrese et al. (2002) como “o fenómeno caracterizado por um estímulo em pequenas doses e inibição a elevadas doses de um determinado composto. Os mesmos autores referem a ocorrência frequente deste fenómeno em estudos de toxicidade (Fig 1). Existem ainda outros trabalhos, como o de Huffman and Allway (1973), que confirmam que alface, tomate, trigo e feijoeiro apresentam um crescimento normal em soluções de  $3.8 \times 10^{-4} \mu M$ .

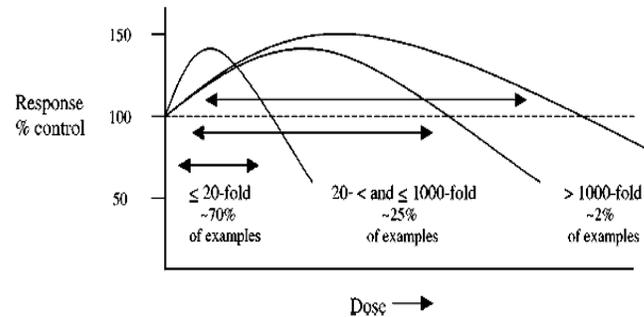


Figura 1.1: Curvas padrão da resposta da distribuição relativa das doses envolvendo efeito Hormesis. A curva em forma de U invertida foi usada para finalidades ilustrativas, visto que os exemplos na base de dados do Hormesis incluem curvas invertidas do tipo *e.g.* U. Modificado de Calabrese (2003).

Os sintomas da toxicidade do Cr em plantas são evidenciados por uma redução do crescimento, desenvolvimento rudimentar do sistema radicular, murchidão foliar, descoloração, clorose e crescimento irregular das folhas (Hunter e Vergnano, 1953, Pratt, 1966). A morte das plantas é reportada quando estas são expostas a elevadas concentrações de Cr (*e.g.* até 10 ppm Cr total em *Brassica* sp.) (Hara e Sonoda, 1979; Parr, 1982, para revisão ver Zayed e Terry 2003, Panda e Patra 2000).

O efeito tóxico do Cr no sistema vascular da raiz foi descrito em beterraba (*Beta vulgaris* L.) como responsável por danos no restante do organismo (Terry, 1981). Esta explicação baseia-se na sua baixa translocabilidade, o que leva a que a maior quantidade de Cr absorvido é acumulado nos tecidos da raiz (para revisão ver Zayed and Terry 2003). Relativamente à porção aérea, as concentrações mais baixas de Cr tendem a ser encontradas no fruto, medianamente no caule e mais elevadas concentrações nas folhas (Kubota, 1990).

#### 1.4 Morfologia e Fisiologia

Trabalhos realizados por Huffman e Allaway (1973) mostraram que, para *Lactuca sativa* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Triticum aestivum* L. e *Phaseolus vulgaris* L. o Cr não era essencial. Num trabalho de revisão, Zayed e Terry (2003) apoiam-se nesse trabalho para afirmar que o Cr pode ser conclusivamente

considerado não-essencial. Contudo esta afirmação pode carecer de estudos mais amplos e padronizados, envolvendo um maior leque de espécies, períodos de exposição, parâmetros avaliados ou ainda compostos a que as plantas são expostas.

Os estudos sobre o efeito do Cr em plantas têm incidido sobretudo nos seguintes parâmetros: a) germinação, b) crescimento vegetativo, c) produção de matéria seca; d) nutrição e absorção/alocação do Cr. e) conteúdo hídrico, f) fotossíntese e g) stress oxidativo.

Discutiremos em seguida alguns dos efeitos conhecidos do Cr nestes parâmetros:

a) **Germinação:** a germinação das sementes expostas a pequenas concentrações de Cr mostra-se sensivelmente afectada, isto porque, possivelmente, o stress ao Cr tem um efeito repressor da actividade das amilases e, subsequentemente, no transporte de açúcares ao embrião (Zeid, 2001). Por outro lado as proteases parecem aumentar de actividade sob tratamento com crómio, podendo assim contribuir para reduções da taxa de germinação das sementes (Zeid, 2001).

Roout et al. (2000) observou que em sementes de *Echinochloa colona* (L) a germinação é reduzida em até 25% com 200  $\mu$ M Cr. Sementes de *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro comum) expostas a 500 ppm de Cr (VI) em solo, tiveram a germinação reduzida em 48% (Parr e Taylor, 1982). Em concentração de 40 ppm de Cr (VI) a germinação e o crescimento *Medicago sativa* cv. (Malone) são reduzidos em quase 30% (Peralta et al 2001). Em *Saccharum* sp. (cana-de-açúcar) foi observada uma redução em 32% da germinação quando as sementes eram expostas a 20ppm de Cr (VI) e de 57% quando eram expostas a 80ppm (Jain et al., 2000).

b) **Crescimento vegetativo:** A presença do Cr no ambiente externo conduz a mudanças nos padrões de crescimento e do desenvolvimento da planta (Shanker et al., 2005). Grande parte dos danos causados as plantas, submetidas a stress por Cr, pode ser relacionada com o decréscimo da funcionalidade da raiz que, ao perder a capacidade de explorar os recursos no solo, pode levar a efeitos secundários nas partes aéreas. Neste aspecto o Cr (VI) possui maior efeito tóxico, levando ao declínio

da condutividade dos estomas possivelmente por ter alta permeabilidade e alto potencial oxidativo (Shanker et al., 2005).

O efeito do crómio na estrutura radicular causa decréscimo do comprimento e massa seca, aumento no diâmetro e capilaridade da raiz, variações proporcionais nos tecidos cortical e camadas de tecido medular (Prasad et al., 2001; Igbal et al., 2001; Panda e Patra, 2000; Suseela et al., 2002; Shanker, 2003). Estas podem ter origem em alterações celulares, como a inibição da divisão/alongamento celular da raiz ou extensão do ciclo celular. Elevadas concentrações diminuem o crescimento pois o contacto directo com as células de crescimento da raiz causam-lhe colapso e subsequentemente a inibição da absorção de água do meio (Barcelo et al., 1986).

A exposição a Crómio tem efeitos na parte aérea vegetal (Shanker et al., 2005). O transporte do crómio para os tecidos aéreos da planta pode ter impacto directo no metabolismo celular da parte aérea contribuindo para a redução do tamanho do organismo, adicionado o facto do crómio causar danos directos nas raízes (Shanker et al., 2005).

No desenvolvimento do caule, Anderson et al. (1972) observou que plantas de aveia expostas a 2, 10 e 25ppm de Cr (em solução nutritiva) apresentavam uma redução de, respectivamente, 11% 22% e 41% do tamanho da planta comparativamente às plantas em condições controlo. Em *Curcumas sativus*, *Lactuca sativa* e *Panicum miliaceum* foi descrito um decréscimo semelhante por exposição a Cr(VI) (Joseph et al., 1995). Sob efeito de Cr(III) Barton et al. (2000) observou uma inibição do crescimento em *Medicago sativa*.

Relativamente às folhas, tal como o caule também são afectadas por crómio, são relatadas características como decréscimo no número e no tamanho das folhas, clorose e necrose (Shanker et al 2005). O crescimento foliar (e.g. área numero total) em plantas de trigo expostas a 0.5 mM de Crómio. A área foliar e a biomassa de plântulas de *Albizia lebbek* germinadas sob concentrações de 200 ppm de Cr(VI) também foram severamente reduzidos. Sigth (2001) estudou o efeito do Cr(III) e Cr(VI) em plantas de espinafre, demonstrando que concentrações de 60mg Kg<sup>-1</sup>

reduziram a dimensão foliar, levando ao surgimento de necroses na margem foliar e retardamento do crescimento. Jain et al. (2000), observou cloroses em folhas de plantas expostas a 40 ppm Cr que tornam-se necroses quando aumentada a concentração para 80 ppm Cr.

O efeito tóxico do Cr nas folhas pode ser relacionado com o estágio de desenvolvimento destas, como observado por Pedreno et al. (1997) em estudo realizado com *Lycopersicon esculentum* Mill., onde o efeito do crómio era predominante nas folhas novas comparativamente com as antigas. Karunyal et al. (1994) estudaram o efeito de efluentes de curtumes (ricos normalmente em crómio) em *Oryza sativa*, *Acacia holosericea* e *Leucaena leucocephala*, concluindo que estes efluentes levaram a uma diminuição da área foliar e do peso seco das plantas.

Relativamente ao efeito do Cr na no ciclo reprodutivo (e.g. produção de flores, frutos e sementes) existe, ao que sabemos, muito pouca informação disponível. Huffman e Allaway (1973) referem que, para concentrações de  $3,8 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$  Cr, *Lemna* sp. tiveram um ciclo de crescimento vegetativo e reprodutivo normal. Em *Triticum* sp. expostas a 0.05  $\mu\text{M}$  de Cr o número de flores e de sementes por planta decresceu em mais de 50% face ao controlo.

**c) produção de matéria seca:** da matéria seca produzida pelas plantas, cerca de 85% é constituída por compostos de carbono (Bishop et al 1993a,b *vide* Shanker 2005). Alterações nas quantidades de matéria seca, em geral, significam alterações no processo de fotossíntese (Bishop et al., 1993a,b *vide* Shanker 2005). Vários trabalhos relataram a influência da exposição a crómio na produtividade de matéria seca: o Cr(VI) reduziu a produtividade de matéria seca em *Vallisneria spiralis* (Vajpayee et al., 2001). Resultados semelhantes foram obtidos em *Portulaca oleracea* num estudo de relação entre salinidade e Cr (Zurayk et al., 2001) e em porções aéreas e radiculares de plantas de soja expostas a concentrações de Cr (VI) superiores a 5 mg L<sup>-1</sup> (Castilhos et al., 2001), em plantas de couve flor (*Brassica oleracea* cv. Maghi) expostas a 0,5 mM Cr(VI) (Chatterjee and Chatterjee, 2000) e, ainda, em plantas de

*Sinapsis alba*, na época de floração, expostas a 200 e 400 mg kg<sup>-1</sup> Cr(VI) (Hanus e Tomas, 1993).

Em contrapartida, em plantas de girassol, milho e feveira expostas a concentrações de até 200mg kg<sup>-1</sup> Cr(VI), não foi possível observar efeitos sobre a produção, a qualidade e a quantidade de matéria seca (Kocik e Ilavsky, 1994), o que confirma a heterogeneidade/complexidade de respostas das espécies vegetais a este metal.

Plantas de *Phaseolus vulgaris* e de milho (*Zea mays*) expostas ao 1 µM Cr(III) mostraram maior peso seco da raiz e das folhas, relativamente ao controlo. Este efeito foi ainda observado em plantas deficientes em Fe (Barcelo et al., 1993). Em cultura hidropónica de plantas de *Brassica sp.*, Hara e Sonota (1979) observaram uma redução na peso seco (PS) das plantas quando Cr (de 88,4 gPS nas plantas controlo, para 28,4 gPS nas plantas expostas a 10 ppm Cr).

**d) Nutrição e absorção/alocação do Cr:** O crómio afecta também a acumulação dos nutrientes nas plantas (e.g., Zayed 2003). Existem diferentes mecanismos de absorção para as suas principais valências (Cr III e VI); a absorção destas formas pode ser via mecanismos existentes na célula para outros elementos essenciais (Zaccheo et al., 1985), podendo interferir severamente nas concentrações destes (Skeffington et al., 1976).

A valência Cr (VI) em solução nutritiva induz o decréscimo das concentrações de Ca, K, Mg, Mn, P, B e Cu, em raízes de soja cultivadas em solo, enquanto as concentrações de Fe, Mn e Zn aparentemente não foram afectados (Turner and Rust, 1971). Barcelo et al. (1985) descrevem que a exposição de plantas de feijoeiro a crómio inibiu a translocação de P, K, Zn, Cu e Fe. Também em soja, a produção de matéria seca, assim como a fixação de azoto, e a absorção de P, K, Ca e Mg decresceram em culturas com concentrações de Cr VI superiores a 5mg L<sup>-1</sup> Castilhos et al. (2001).

Em plantas de azevém (*Lolium multiflorum*), a influência do Cr na nutrição mineral é variável e dependente do tipo de Cr e das propriedades do solo (Ottabbong, 1989a). O mesmo autor encontrou, para a mesma espécie, interacções entre a exposição a Cr e a acumulação de Mn, Cu, Zn, Fe e Al (Ottabbong, 1989b). Em muitos trabalhos sobre a exposição vegetal a crómio, é dada importância ao Fe (e.g. Ottabbong, 1989b). Existem evidências que a exposição a Crómio induz clorose floriar (e.g. Ottabbong, 1989). Embora não se conheçam ainda bem os mecanismos envolvidos neste efeito, uma hipótese levantada é a possível interferência do Cr com a absorção/translocação de nutrientes (e.g. Fe) (Ottabbong, 1989). Esta relação de stress provocada por crómio também foi estudada por Barcelo et al. (1985), tendo encontrado uma forte relação entre os níveis de Fe e Zn e pigmentos da clorofila. Acresce que, em solos não-calcários contaminados com Cr(III), foi observado um decréscimo da translocação do Fe, Zn e Mo em estudo conduzido com plantas de feijoeiro (Wallace et al., 1976).

A concentração de N, P, K, Na, Ca e Mg em caules e ramos é significativamente afectada pela exposição a crómio (50 e 100 mg L<sup>-1</sup>) em tomateiro (Moral et al., 1995). Também foi descrito o seu efeito negativo na absorção de Fe, a sua interacção competitiva com Cu nas raízes caules e folhas. Contudo a sua interacção com o Mn não parece clara. O Cr tem uma interacção sinérgica com o B nas raízes mas antagónica na parte aérea. Nos frutos os tratamentos com Cr não afectaram as quantidades de Fe, Mn, Cu e Zn (Moral et al., 1996).

Em milho, os efeitos do Cr nas concentrações do Fe variam conforme o órgão da planta e a qualidade de Cr. As concentrações de Mn e Cu geralmente decrescem com o aumento da concentração externa de Cr. Entretanto, em plantas expostas a Cr, os conteúdos de Zn decrescem em folhas e flores, embora aumentem no caule e na raiz (Sharma e Pant, 1994). Num estudo sobre a interacção do Cr (III) com Fe, Bonet et al. (1991) reportaram que Cr aumentou o crescimento nos Fe-control e Fe-deficiente.

Assim, a ligação competitiva pelo CrVI a alguns transportadores pode ter reduzido a absorção de muitos nutrientes, decrescendo a absorção de muitos dos nutrientes em plantas expostas a Cr. Um exemplo deste efeito pode ser a inibição da  $H^+$ -ATPase na membrana plasmática (Shanker, 2003).

Plantas de *Cocos nucifera* (com 1 ano de idade e expostas a Cr) sofreram uma acentuada inibição de incorporação de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu (Biddappa e Bopaiah, 1989).

Khan et al. (2001) observaram que, em plantas de arroz expostas a 0,5 ppm Cr, os conteúdos de N, P e K por peso seco decresceram. Também em couve flor, a exposição a Cr 0,5 mM levou a um decréscimo das concentrações de Fe e afectou a translocação de P, S, Mn, Zn e Cu das raízes para a parte aérea (Chatterjee e Chatterjee, 2000).

A redução de N, K, P e de outros elementos pode ser causada pela redução do crescimento da raiz e portanto deficiente penetração da raiz no solo. O efeito do Cr no conteúdo de P parece, contudo, ainda ambíguo pois este aumentou em plantas de girassol expostas a 0,5 ppm de Cr (Gupta et al., 2000), mas decresceu nas folhas de trigo decresceu nas plantas expostas a 0.25 mM Cr (Sharma e Sharma 1996).

Actualmente está proposto que o Cr (VI) tem absorção activa, em contraste com o Cr (III) que é absorvido por transporte passivo sendo, essencialmente, retido na parede celular por mecanismos de troca iónica (Shanker et al., 2004). Estas diferenças explicam, em parte, a elevada acumulação de Cr (VI) nas plantas. Registe-se ainda que o Cr pode competir com Fe, S, Mn ao nível dos transportadores membranares (Shanker et al. 2004).

Tal como para outros metais, a baixa translocabilidade do Cr das raízes para as porções aéreas pode dever-se ao sequestro deste metal nos vacúolos das células nas raízes, prevenindo a toxicidade deste metal nas porções aéreas (mecanismo excludor). Contudo, o grau de translocabilidade para a porção aérea é variável com a espécie/variedade, condicionando assim o seu grau de toxicidade nas plantas (e.g. dependente dos mecanismos existentes de transporte/sequestração para este metal).

**e) Conteúdo hídrico:** A exposição ao Cr leva a um decréscimo do potencial hídrico foliar (Barcelo et al., 1985), assim como diminui a transpiração, aumenta a resistência difusiva e o conteúdo hídrico relativo em folhas de *B. oleracea* (couve-flor) (Chatterjee and Chatterjee 2000). As células epidérmicas e corticais de *P. vulgaris* sofrem um decréscimo de turgor quando expostas a Cr. A diminuição do diâmetro dos elementos traqueais e consequente redução do movimento longitudinal da seiva xilémica também foi descrita (Vazques et al., 1987).

Anomalias na distribuição espacial da raiz sob stress por Cr, causando incapacidade das plantas de explorar a água do solo foram também descritas. O significativo efeito da alta toxicidade do Cr (VI) no declínio da conductância estomática pode ter origem no grande potencial oxidativo desta valência, o que pode afectar as membranas e células de guarda do estoma (Shanker, 2005).

**f) fotossíntese:** dentro da pouca informação existente sobre os efeitos tóxicos do crómio na fotossíntese, estes parecem envolver alterações metabólicas envolvidas no processo de absorção de energia, modificações no transporte de electrões, inativação do ciclo de Calvin, diminuição da fixação de CO<sub>2</sub> e desorganização de cloroplastos (Bishnoi et al., 1993, Davies et al., 2002, Shanker, 2003; Zeid, 2001). Apesar de bem documentada em certas espécies (e.g., lenhosas) (Foy et al., 1978; Van Assche and Clijsters, 1983), não se sabe a extensão exata dos danos que o crómio pode induzir para a inibição da fotossíntese, e até que ponto esta se deve a desorganização da ultraestrutura dos cloroplastos, à inibição do transporte de electrões ou influência directa do Cr nas enzimas do ciclo de Calvin. (e.g. Vazques et al 1987).

Krupa and Baszynski (1995) apresentaram vários modelos/hipoteses sobre os mecanismos da toxicidade por metais pesados na fotossíntese, sobretudo em enzimas chave da redução do dióxido de carbono. Biishnoi et al. (1993a), trabalhando com *Pisum sativum*, estimaram que, ao fim de 52 dias de exposição a 0,1 mM ocorria cerca de 40% de inibição da fotossíntese, e cerca de 65% e 95%, respectivamente, ao fim de 76 e 89 dias de crescimento. Uma possível explicação para este efeito pode

ser, assim, a desorganização da ultraestrutura dos cloroplastos e inibição do transporte de electrões. O efeito de iões de Cr na transferência de energia de excitação e fotossintética poderia também ser devido aos anormalidades induzidas pelo Cr VI na ultraestrutura do cloroplasto como um sistema tilacoidal/granar mal desenvolvido (Van Assche and Clijsters, 1983).

A bioacumulação e toxicidade do Cr nos pigmentos fotossintéticos em várias espécies vegetais estão também bem documentadas (Barcelo et al., 1986; Sharma and Sharma, 1996; Vajpayee et al., 1999) (Table 4). Bera et al. (1999) estudaram os efeitos da exposição de efluentes de fábricas de curtumes (contendo Cr) em feijoeiro referindo um decréscimo das concentrações de clorofila a, clorofila b relativamente ao grupo controlo. Também os níveis de clorofila decresceram em plantas de *Triticum aestivum* expostas a Cr [Cr(III) and Cr(VI)] (Sharma e Sharma 1996). Plantas de couve-flor (cv. Maghi) expostas a 0,5 mM cada de Co, Cr ou Cu mostraram uma diminuição dos níveis de chlorofilas a e b (Chatterjee and Chatterjee, 2000). Estes decréscimos descritos das clorofilas a e b (Shanker 2003) indicam assim que o Cr leva a uma redução dos complexos anteriores nos fotossistemas I e II.

O Cr pode ainda levar à peroxidação lipídica, considerada uma indicação de stress oxidativo nas plantas, podendo esta ser induzida por radicais livres ou espécies reactivas de oxigénio (ROS) que podem ser gerados pela acção do crómio, e de metais pesados em geral, nas plantas (e.g. Panda, 2002). Para além disso, o Cr pode ainda degradar proteínas, podendo esta degradação nas plantas, frequentemente um indicador de senescência (e.g. Solomonson e Basber 1990, Vajpayee et al. 2001).

### **1.5 Genotoxicidade**

Apesar de relativamente bem explorado em células animais (O'Brien 2003, Fig 1.2), mais uma vez, em células vegetais o efeitos genotóxico das valências de Cr(III) e/ou Cr(VI) em células vegetais está ainda por explorar.

O Cr(VI) pode induzir mutações genéticas (Zhitkovith 1995 2001, Chen 1994), nomeadamente aberrações cromossómicas ou alterações detectadas pela

técnica de “sister chromatide exchanges”, (para revisão ver O’Brien 2003). Contudo, o Cr (VI) sozinho parece não ter reacção com oADN isolado, sugerindo que alguns constituintes celulares do metabolismo de redução precisam estar presentes para o cromo danificar macromoléculas (O’Brien 2003).

No modelo proposto por O’Brien (2003), para células animais (figura 1.1.) a forma trivalente do crómio não é capaz de ultrapassar facilmente a membrana, permanecendo entretanto na célula ligada a macromoléculas, explica ainda que existe uma grande diferença de absorção e toxicidade entre o Cr(VI) e o Cr(III). Durante este processo, a formação de espécies reactivas de Cr, ou de oxigénio podem ter sido geradas pela redução do Cr VI (ver Brien 2003). A maior toxicidade atribuída ao Cr VI é ainda difícil de explicar dado que, quando o CrVI é absorvido pelos tecidos é reduzido imediatamente em Cr III (Gray and Sterling, 1950) (Fig 1.2).

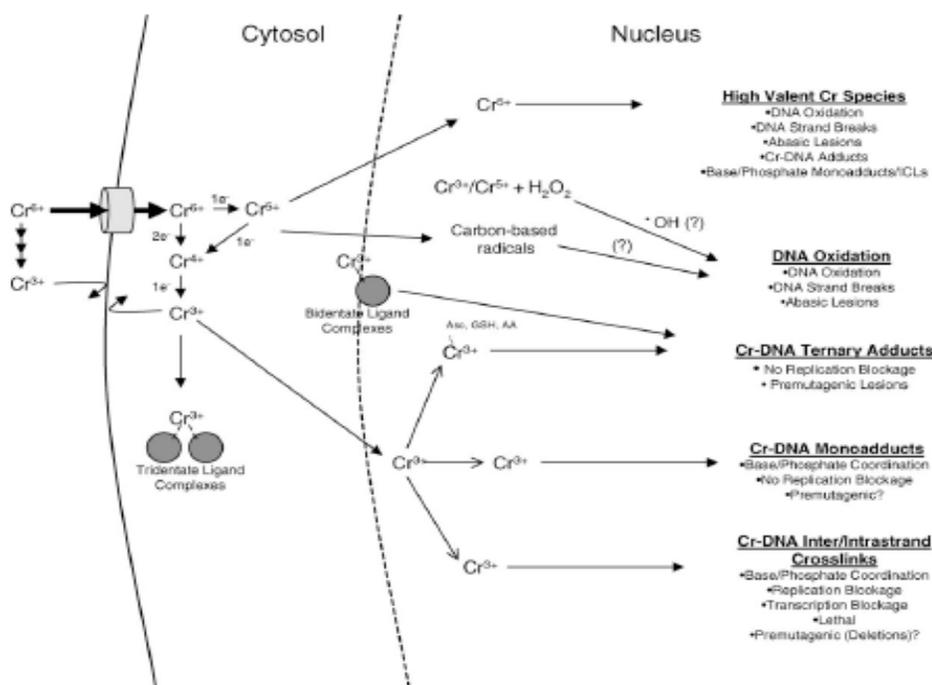


Fig 1.2: Modelo de entrada do Crómio (Cr(III) e Cr(VI)) em célula Animal.(O’Brien 2003).

Nos poucos estudos de genotoxicidade do Cr envolvendo plantas, há referências a possível inibição da divisão celular pela indução de aberrações cromossómicas (Liu et al., 1993).

## 1.6 Considerações gerais sobre *Lactuca sativa* L

*Lactuca sativa* L. é uma Asteraceae, planta de ciclo curto, com grande importância agronómica para a alimentação humana, e por isso difundida em quase todo o mundo com cerca de 65 cultivares comerciais diferentes. Esta planta é originária da região do Mediterrâneo, existindo registos, do seu uso para fins medicinais, há pelo menos 4500 a.C, e como planta de consumo alimentar desde 2500 a.C.. Nesse período foi encontrada, no estado silvestre, no sul da Europa e na Ásia ocidental (Goto e Tivelli, 1998). As suas variedades comerciais possuem elevado conteúdo de vitaminas A, B e C, além de ser uma boa fonte de cálcio, fósforo, potássio e outros minerais (Viggiano, 1990). Uma planta de alface com 350 g apresenta, aproximadamente: 56 kCal, 95,80% de água, 2,3% de hidratos de carbono, 1,20% de proteínas, 0,20% de lípidos, 0,50% de sais minerais (13,3 mg de potássio, 147,0 mg de fósforo, 133,0 mg de cálcio e 3,85 mg de sódio, magnésio e ferro). Contém ainda vitamina A (245-UI), vitaminas de complexo B (B1 – 0,31 mg e B2 – 0,66 mg) e C (35,0 mg). As folhas de coloração verde-escura, principalmente as folhas externas, contêm 30 vezes mais vitamina A que as internas (Franco, 1987).

As plantas de *L. sativa* requerem, como solos ideais, os areno-argilosos, ricos em matéria orgânica e nutrientes (Ferreira et al., 1993, Filgueira, 2000). O sistema radicular é muito ramificado e superficial, podendo atingir 60 cm de profundidade (Filgueira, 2000). A alface prefere temperaturas amenas para o seu desenvolvimento vegetativo. Sendo de origem europeia e asiática, são aconselhadas exposições a temperaturas nocturnas entre 7°C e 15°C. Temperaturas acima de 25°C alteram severamente o ciclo de vida, resultando em plantas menores, passando para fase reprodutiva (Filgueira, 1982).

### 1.7 Utilização da *Lactuca sativa* em estudos toxicológicos.

Ao longo dos anos o desenvolvimento tecnológico e industrial tem levado o meio ambiente a um stress elevado, provocando profundas alterações provenientes dos resíduos sólidos e principalmente líquidos, contaminando solos e reservas de água, o que levou ao desenvolvimento de estudos em toxicologia e, em particular, em ecotoxicologia.

A toxicologia focava-se, inicialmente, sobretudo nos efeitos dos resíduos antropogênicos nos sistemas animais. No entanto, em algumas situações, a flora é mais indicada para responder a danos e impactos no solo e nas águas, tendo agora um importante foco desta ciência.

Plantas de ciclo curto, como no caso *L. sativa*, são ideais para estudos toxicológicos laboratoriais. Esta planta é relativamente bem conhecida em seus sistemas químico-hormonais e nas respostas a intempéries ambientais e nutritivas. Cultivares de *L. sativa*, foram utilizadas em diversos estudos toxicológicos, com resultados bastante conclusivos. Por exemplo, Figliolia et al. (1992) verificaram que plantas de alface cultivadas em solo contendo 200 mg kg<sup>-1</sup> de Cr III apresentaram, aos 60 dias, 11,1 mg kg<sup>-1</sup> de Cr III no tecido, o que resultou em redução de 60% no peso de matéria seca em relação ao controlo. Também Aquino Neto e Camargo (2000) observaram uma acumulação de crómio e diminuição da produção de matéria seca de plantas de alface submetidas a doses crescentes de Cr III. Segundo Simeoni et al. (1984), cereais, gramíneas, legumes ou ainda tuberosas tendem a acumular menos metais do que plantas folhosas de crescimento rápido, como a alface. Alguns estudos do efeito de águas contaminadas foram efectuados com alface como planta modelo. Por exemplo, Lopes et al 2005 sugeriu a utilização do lodo de esgoto –substancia orgânica proveniente de estações de tratamento de agua, contendo por vezes e neste caso, quantidades significativas de metais pesados como adubador do solos para *L. sativa*, permitindo assim a utilização deste refugio. Também Gilling e Perez (2006) estudaram o efeito de dicromato de potássio e crómio em sementes de *L. sativa* tendo encontrado uma inibição do crescimento em doses entre 0,8 e 18,36 mg/Kg de

Crómio e grande efeito fitotóxico a 100 mg/kg de Crómio. Finalmente Monteiro et al (2007) utilizou a alface como modelo em estudos sobre o efeito do Cádmio na fisiologia e na genotoxicidade (ploidia, e microsátélites), tendo conseguido constituir uma metodologia viável para o estudo da genotoxicidade nesta planta.

### **1.8 Objectivos do trabalho**

Dada a importância do Crómio como micronutriente (Cr III) na dieta humana, e por outro lado a sua ocorrência na forma de múltiplas valências (Cr0-CrVI), onde o Cr(VI) se apresenta como mais tóxico para células animais e vegetais, e dado o crescente problema de contaminação do solo por Cr (sobretudo da valência VI) e o desconhecimento dos mecanismos envolvidos na fitotoxicidade do Cr(III)/(VI) nas plantas, os objectivos deste trabalho foi avaliar:

- 1) Efeito toxicológico da exposição a Crómio III e VI em três cultivares de *Lactuca sativa* L.: crescimento, distribuição do Cr (total e em formas paracmegénticas activas) na planta e efeito deste no conteúdo nutricional.
- 2) Citotoxicidade de Cr(III) e Cr(VI) em *Lactuca sativa*: estudos (citológicos) ao nível da variação de plodia, ciclo celular e conteúdo em DNA.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material biológico, condições de crescimento e de exposição a crómio

Foram utilizadas 3 variedades de *Lactuca sativa* L. - Twistil (Frisada), Teide (Roxa), Pova (Lisa) - com 15 dias após a germinação (Viveiro Litoral, Aveiro) (Fig. 2.1). As plantas foram cultivadas em estufa (Fig. 2.2) com luz suplementada por lâmpadas Osram com emissão de  $430 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16h e temperatura ( $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

As plantas foram colocadas em potes com vermiculite perfazendo o volume total do recipiente, ainda com a turfa onde germinaram, constituindo assim um meio semelhante ao solo (Fig. 2.2. e 2.3).



Fig.2.1: Variedades de *Lactuca sativa* L.: a ) Twistil; b) Teide; c) Pova



Fig.2.2 : Crescimento das diferentes variedades de *Lactuca. sativa* L. em estufa.

A solução de rega foi composta de solução comercial de Hoagland (Sigma, Tabela 2.1) a meia força (Hoagland ½, Tabela 2.1), e com pH 5,8 (ajustado com solução de NaCl ou HCl) . Cada planta era regada duas vezes por semana com 15 mL de solução Hoagland ½. Uma vez por semana cada planta era ainda irrigada com uma solução de crómio na valência Cr(III) (CrCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) e Cr(VI) (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>). As concentrações foram 0 (controlo), 20, 50, 100, 150, 200 e 300 mg Cr/L. A exposição decorreu durante 30 dias Utilizaram-se 4 réplicas para cada tratamento.

Tabela 2.1: Composição da solução comercial Hoagland, a partir da qual se preparou a solução de rega Hoagland a meia força.

<b>Macronutrientes</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
Fosfato de amónio	115.03
Nitrato de cálcio	656.40
Sulfato de magnésio	240.76
Nitrato de potássio	606.60
<b>Micronutrientes</b>	
Acido bórico	2.86
Sulfato de cobre pentahidratado	0.08
Cloreto de manganésio	1.81
Trióxido de molibdénio	0.02
Sulfato de zinco	0.22
Solução de ferro	
Tartarato de ferro	5.32

Ao longo do período de exposição determinaram-se variações qualitativas das de alterações morfológicas das plantas (e.g. clorose, necrose). No final dos ensaios determinaram-se dados de crescimento respectivamente para a porção aérea e para a raiz: a) comprimentos; b) conteúdos hídricos; c) conteúdo da matéria orgânica; d) osmolalidade; e) conteúdo nutricional (Mg, K, Ca, P, Zn, B, Mn, Cu, Fe); f) crómio total e crómio nas valências paramagnéticas. massa fresca da porção aérea e massa fresca da raiz e análise dos compostos, um segundo experimento foi montado com a concentração 20 mg Cr L<sup>-1</sup> excluída, e incluída uma maior de 300 mg Cr L<sup>-1</sup> em todas as condicionantes do primeiro experimento.

As plantas quando foram recolhidas tiveram suas raízes lavadas com uma solução de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (5%) e posteriormente lavadas em água destilada, com vista a remover os iões de Cr adsorvidos à superfície externa da raiz, assegurando que os valores de Cr determinados correspondem a Cr absorvido e não adsorvido.

## **2.2. Determinação de parâmetros de crescimento:**

Durante o ensaio foram aferidos níveis de clorose e necrose superficialmente nas folhas de alface. No término da exposição as plantas foram retiradas do meio e seccionadas em parte aérea e raiz, e determinou-se o comprimento e massa fresca. O material foi em seguida colocado em placas de petri e incubado em estufa (60°C) por três dias para estabilização do massa seca. Com as medidas de Massa fresca (MF) e massa seca (MS), determinou-se o conteúdo hídrico (CH) pela seguinte fórmula:

$$CH (\%MF) = \frac{MF-MS}{MF} \times 100$$

O material biológico resultante foi em seguida incinerado em mufla a 500°C por 7h. Para o efeito usaram-se cadinhos padronizados e de peso conhecido. Após incineração, a massa das cinzas massa foi determinada para determinação do conteúdo de matéria orgânica (CMO), utilizando a equação abaixo descrita:

$$CMO (\%MS) = \frac{MS - MC}{MS} \times 100$$

onde MS = massa seca e MC= massa das cinzas.

### **2.3. Determinação da osmolalidade dos tecidos**

Para a determinação da osmolalidade dos tecidos, colheram-se amostras de folha e raiz que se colocaram num eppendorf com tampa perfurada. As amostras foram sujeitas a dois ciclos de congelamento a  $-30^{\circ}\text{C}$  e descongelamento rápido a  $35^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos. Recolheu-se o suco celular por centrifugação a  $15000\times g$ , durante 10 minutos. A osmolalidade ( $\text{mOsKg}^{-1}$ ) foi determinada no sobrenadante com um osmómetro Osmometer Automatic (Knauer).

### **2.4. Análise de elementos inorgânicos**

A análise de elementos inorgânicos foi efectuada nas plantas expostas a 0 (controlo), 50 e 200  $\text{mgCr L}^{-1}$ . Na preparação das amostras para análise de Zn, B e Cu e Cr ( $\mu\text{g/L}$ ) P, Fe, Mn, Mg, Ca, K ( $\text{mg/L}$ ), seguiu-se o protocolo descrito por Evers e Bucking (1976). Os cadinhos contendo as cinzas foram colocados sobre uma placa de aquecimento, adicionaram-se algumas gotas de água e 1,5 mL de HCl 1:1 (v/v). Após início de ebulição, adicionou-se 1,5 mL de HCl 1:1 (v/v). Em seguida, acrescentou-se 5 mL de HCl a 5% (m/v) deixando aquecer por um curto período. Filtrou-se a solução através de papel de filtro Whatman nº1, sob vácuo e transferiu-se o filtrado para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se 22,5 mL de HCl 10% (m/v), tendo-se utilizado parte do volume para lavar o cadinho e o filtro. Perfez-se o volume de 50 mL com água ultrapura. O conteúdo final do balão volumétrico foi transferido para um tubo de 50mL.

A quantificação dos elementos inorgânicos foi feita por ICPS (Inductively Coupled Plasma Spectroscopy) num aparelho Jobin Ivon (modelo JY70 Plus, com nebulizador Meinhard C001), utilizando curvas padrão entre 0 e 100 ppm para o potássio, cálcio e magnésio e entre 0 e 20 ppm para os restantes elementos. A análise decorreu a 1000W, com fluxo de Argon de  $12 \text{ L min}^{-1}$ . Os limites de detecção nestas condições e para os elementos referidos são os que constam na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Limites de detecção do ICPS para os elementos em estudo.

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Limite de detecção (mg L <sup>-1</sup> )
K	766,5	0,2
P	213,6	0,05
C	396,2	0,01
M	279,5	0,01
M	257,6	0,01
F	238,2	0,01
B	249,7	0,01
C	324,7	0,01
Z	213,8	0,01
C	267,7	0,01

## 2.5 Ressonância Electrónica Paramagnética (EPR)

No momento de colheita foram retiradas alíquotas das raízes expostas a diferentes tratamentos e congeladas em azoto líquido e mantidas a (-80 °C). Estas amostras foram posteriormente liofilizadas (a água é removida dos tecidos por transferência do estado sólido para gasoso sob pressão controlada; este procedimento preserva integralmente as características originais dos produtos desidratados, mantendo inalterado os elementos nele contidos).

Após a liofilização as amostras foram analisadas por Ressonância Electrónica Paramagnética - Electron paramagnetic resonance (EPR) para análise das formas paramagnéticas de Cr (e.g. Cr III).

A análise foi num aparelho Bruker (Germany) efectuada em eppendorfs, à temperatura ambiente. Os espectros obtidos foram utilizados para uma análise

preliminar comparativa da presença de formas de Cr com actividade paramagética em raízes em diferentes condições de exposição a Cr(III) e Cr(VI).

## 2.6 Citometria de fluxo.

Todos os estudos foram realizados num citómetro de fluxo Coulter EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA). Para a análise de: a) ploidia, b) conteúdo em DNA e c) ciclo celular, utilizaram-se alíquotas de folhas e ápices de raízes de plantas expostas a 0 (controlo) e a 300 mgCr L<sup>-1</sup> (valências III e VI).

As amostras, foi adicionado 1ml de tampão WPB (Loureiro et al., 2007), e procedeu-se a um “chopping” do material (cortes em pequenos fragmentos) juntamente com folha do padrão interno de referência, *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 9.09 pg ), gentilmente cedido pelo Prof. Jaroslav Doležel do Laboratory of Molecular Citogenetics and Citometry do Institute of Experimental Botany, Olomouc, República Checa). Posteriormente, fez se passar a amostra por um filtro de nylon de poro 80 µm), adicionaram-se um fluorocromo (iodeto de propídeo- Fluka, 50 µl/ml) e RNase (Sigma, 50 µg/ml). Apos um período de incubação de 5 min. em gelo, as amostras foram analisadas, com especial atenção na intensidade de fluorescência (IP) dos núcleos na suspensão.

Este aparelho encontra-se equipado com um laser de Argon arrefecido com ar sintonizado para 15 mW e a operar a 488 nm. A fluorescência total juntamente com a altura e largura dos picos de fluorescência emitidos pelos núcleos foi recolhida por um filtro dicróico “long-pass”, um filtro “band-pass” de 620 nm e convertidos em canais 1024 ADC. Antes da análise, a linearidade do instrumento foi testada com esferas fluorescentes de calibração (Coulter Electronics, Hialeah, FL) e a amplificação foi ajustada de modo a que o pico correspondente aos núcleos da amostra ficasse posicionado aproximadamente no canal 200. Estes parâmetros foram mantidos constantes durante toda a experiência. Os resultados são obtidos na forma de número de eventos (eixo dos y) face à sua fluorescência (eixo dos x)

Para estimar o conteúdo em DNA, a posição do pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> da amostra do histograma foi comparada com o padrão interno de referência, cujo conteúdo em DNA é conhecido. Para cada amostra foram considerados pelo menos 5000 – 10000 núcleos.

O tamanho do genoma nuclear de *Lactuca sativa* L. foi calculado da seguinte forma:

$$cont. \text{ de } nDNA \text{ em } 2C \text{ de } L. \text{ sativa} = \frac{\text{Média de pico G}_0 / \text{G}_1 \text{ de } L. \text{ sativa}}{\text{Média de pico G}_0 / \text{G}_1 \text{ de } P. \text{ sativum}} * 2C \text{ de } P. \text{ sativum}$$

## 2.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados aplicando a Análise de Variâncias (ANOVA), utilizando o teste de F como método paramétrico, e o teste de Kruskal-Wallis como método não paramétrico. Para comparação entre médias utilizaram-se os testes de Tukey e de Newman-Keuls (Zar, 1984). Para todos os testes considerou-se um  $\alpha$  igual a 0,05.

### 3. RESULTADOS

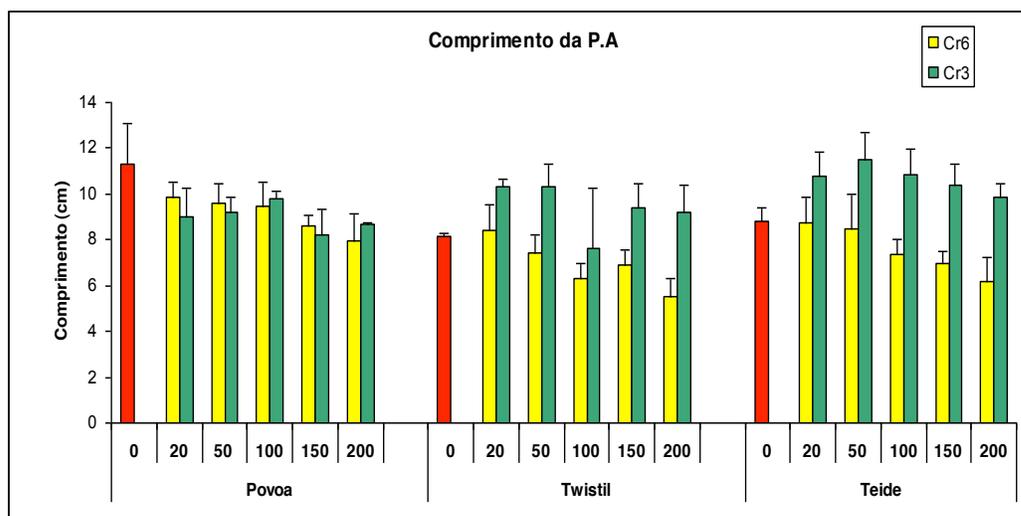
#### 3.1. Análise de crescimento

A partir de 10 dias de exposição a crómio, as plantas começaram a apresentar sintomas de toxicidade (e.g. clorose e necrose) que se prolongaram (e em geral, agravaram) ao longo do ensaio. Contudo, este efeito foi dependente das variedades. Assim, para plantas da variedade Pova expostas a doses iguais e superiores a  $150 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr(VI)}$  foi evidente a redução do comprimento da porção aérea ( $P < 0.05$ , Fig 3.1), assim como do número de folhas (dados não apresentados).

As plantas da variedade Teide expostas a Cr (VI) apresentaram também sintomas um pouco menos evidentes; estas plantas expostas a concentrações elevadas (e.g.  $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr(VI)}$ ) apresentavam maior emurchecimento foliar face ao controlo. Ainda em Cr(VI), a variedade Twistil apresentava sinais claros de nanismo nas concentrações mais elevadas concentrações (e.g.  $150, 200 \text{ mg L}^{-1}$ ) assim como manchas necróticas e emurchecimento.

Em todas as variedades era possível observar um aumento de clorose e necrose principalmente nas folhas dos primeiros nós, acompanhando a concentração crescente de Crómio, sobretudo de Cr(VI).

Os efeitos da exposição a Cr(VI) não foram iguais aos da exposição a Cr(III). Esta forma induziu poucas necroses, e apenas nas maiores concentrações, e levou a um aparente estímulo do crescimento inicial nas concentrações mais baixas ( $20$  e  $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr(III)}$ ). Os comprimentos das porções aéreas das plantas evidenciaram diferenças significativas entre as concentrações mais elevadas e os seus controlos para todas as variedades sob Cr(VI). Contrariamente, a variedade Twistil submetida a Cr(III) teve um aumento significativo de comprimento ( $P < 0.05$ , Fig. 3.1).



Comprimento da P.A variedade Povoa Cr(VI)

	20	50	100	150	200
<b>c</b>	ns	ns	ns	s	s
<b>20</b>		ns	ns	ns	ns
<b>50</b>			ns	ns	ns
<b>100</b>				ns	ns
<b>150</b>					ns

Comprimento da P.A variedade Teide Cr(VI)

	20	50	100	150	200
<b>c</b>	ns	ns	ns	Ns	s
<b>20</b>		ns	ns	Ns	s
<b>50</b>			ns	Ns	s
<b>100</b>				Ns	ns
<b>150</b>					ns

Comprimento da P.A variedade Twistil Cr(VI)

	20	50	100	150	200
<b>c</b>	ns	ns	s	ns	s
<b>20</b>		ns	s	ns	s
<b>50</b>			ns	ns	s
<b>100</b>				ns	ns
<b>150</b>					ns

Comprimento da P.A variedade Twistil Cr(III)

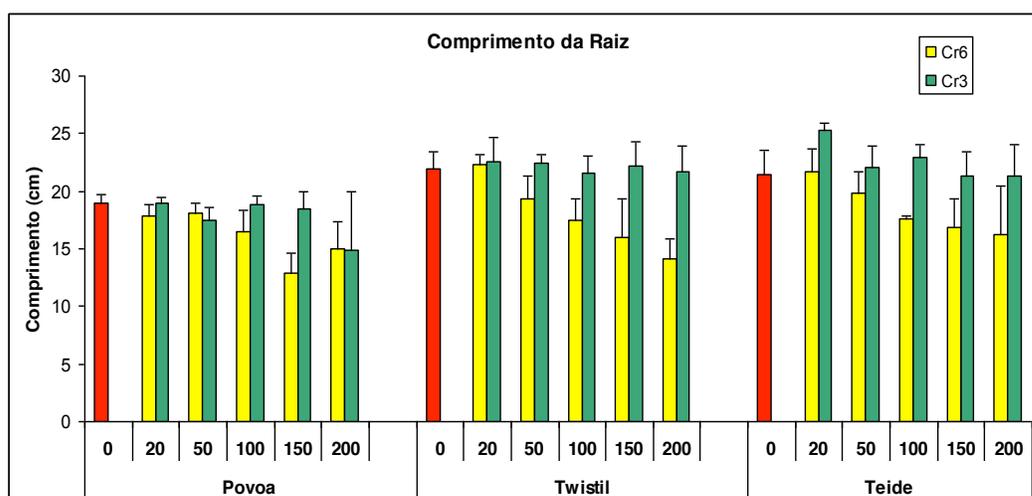
	20	50	100	150	200
<b>c</b>	s	s	ns	ns	ns
<b>20</b>		ns	s	ns	ns
<b>50</b>			ns	ns	s
<b>100</b>				ns	ns
<b>150</b>					ns

Comprimento da P.A variedade Povoa e Teide Cr (III)

	20	50	100	150	200
<b>c</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>20</b>		ns	ns	ns	ns
<b>50</b>			ns	ns	ns
<b>100</b>				ns	ns
<b>150</b>					ns

Fig 3.1: Comprimento (cm) da parte aérea de três variedades de *L. sativa* expostas a Cr(III) e Cr(VI) Controle = 0 (vermelho), eixo x = concentração do crómio ( $\text{mg L}^{-1}$  Cr). Tabelas referentes ao resultados da análise de variância das médias (s-significativo  $P < 0,05$ , ns- não significativo  $P > 0,05$ )

Relativamente ao comprimento da raiz, foi detectada uma diferença significativa entre as concentrações de Cr(VI) em todas as variedades ( $P < 0,05$ ). Nas plantas expostas a Cr(III) não foram encontradas diferenças significativas. Na comparação entre Cr(VI) e Cr(III) foi encontrada diferença significativa no tamanho da raiz para a variedade Teide ( $P < 0,05$ ; Fig 3.2).



	20	50	100	150	200
<b>c</b>	ns	ns	ns	s	s
<b>20</b>		ns	ns	s	ns
<b>50</b>			ns	s	ns
<b>100</b>				s	ns
<b>150</b>					ns

	20	50	100	150	200
<b>c</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>20</b>		ns	ns	ns	ns
<b>50</b>			ns	ns	ns
<b>100</b>				ns	ns
<b>150</b>					ns

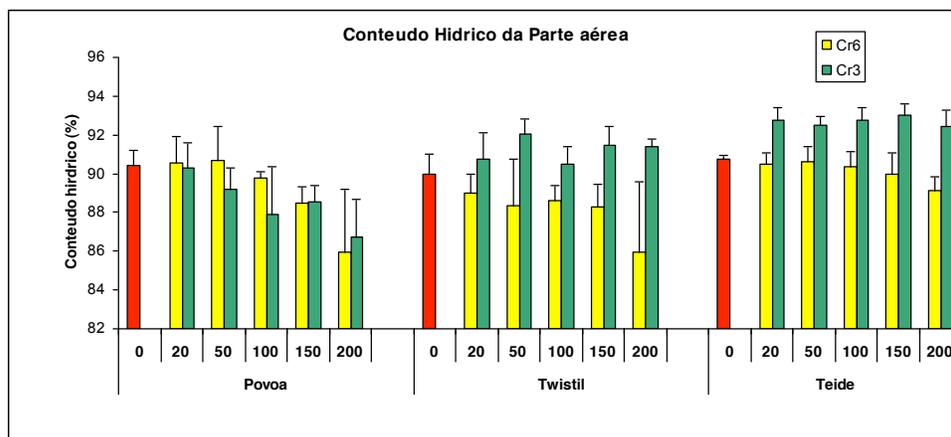
	20	50	100	150	200
<b>c</b>	ns	ns	s	s	s
<b>20</b>		ns	s	s	s
<b>50</b>			ns	ns	s
<b>100</b>				ns	ns
<b>150</b>					ns

	20	50	100	150	200
<b>c</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>20</b>		ns	ns	ns	ns
<b>50</b>			ns	ns	ns
<b>100</b>				ns	ns
<b>150</b>					ns

Fig 3.2: Comprimento (cm) da Raiz de três variedades de *L.sativa* expostas a Cr(III) e Cr(VI) Controle = 0 (vermelho), eixo x = concentração do crómio ( $\text{mg L}^{-1}$  Cr). Tabelas referentes ao resultados da análise de variância das médias (s-significativo  $P < 0,05$ , ns- não significativo  $P > 0,05$ ).

### 3.2 Conteúdo hídrico

O conteúdo hídrico foi pouco afectado nas plantas expostas a Cr. Com efeito, a exposição a Cr(VI) não afectou o conteúdo hídrico em qualquer variedade (Fig 3.3), enquanto o Cr(III) afectou este conteúdo nas concentrações mais elevadas, e nas variedades na Povia e Twistil ( $P < 0.05$ ), (Fig 3.3). Para Cr (VI), as variedades Povia e Twistil sofreram redução de conteúdo hídrico para as concentrações mais elevadas.



Conteúdo Hídrico da P.A variedade Povia Cr(VI)

	20	50	100	150	200
c	ns	ns	ns	ns	ns
20		ns	ns	ns	ns
50			ns	ns	ns
100				ns	ns
150					ns

Conteúdo Hídrico da P.A variedade Povia Cr(III)

	20	50	100	150	200
c	ns	ns	ns	ns	s
20		ns	ns	ns	ns
50			ns	ns	ns
100				ns	ns
150					ns

Conteúdo Hídrico da P.A variedade Twistil Cr(III)

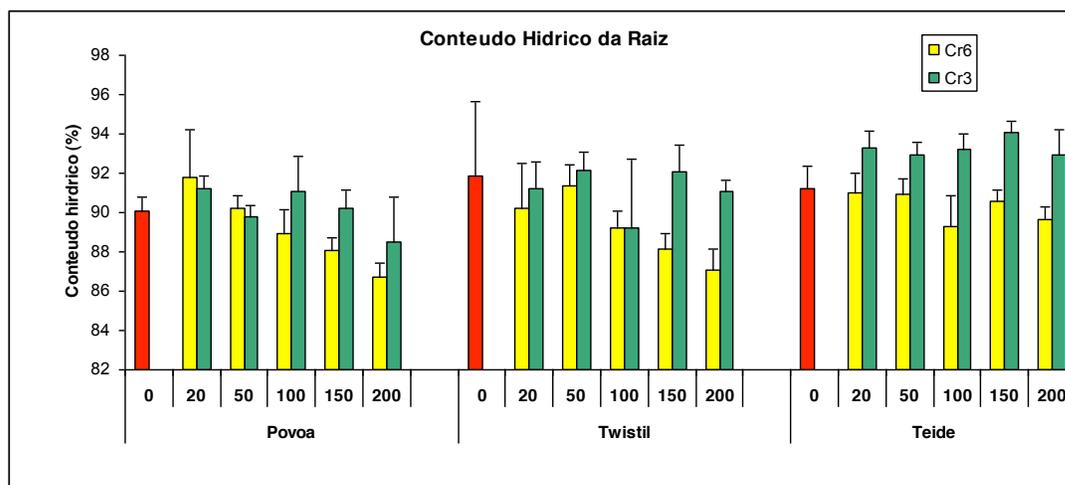
	20	50	100	150	200
c	ns	ns	s	ns	ns
20		ns	ns	ns	ns
50			ns	ns	ns
100				ns	ns
150					ns

C.H. da P.A das variedades, Teide Cr (III), Twistil e Teide Cr(VI)

	20	50	100	150	200
c	ns	ns	ns	ns	ns
20		ns	ns	ns	ns
50			ns	ns	ns
100				ns	ns
150					ns

Fig 3.3: Conteúdo Hídrico da P.A de três variedades de *L. sativa* expostas a Cr(III) e Cr(VI) Controle = 0 (vermelho), eixo x = concentração do crómio (mg L<sup>-1</sup>Cr). Tabelas referentes ao resultados da análise de variância das médias (s-significativo  $P < 0,05$ , ns- não significativo  $P > 0,05$ ).

A variedade Teide não sofreu alteração no conteúdo hídrico, quando exposta a Cr(VI). Relativamente ao Cr(III) não houve alteração no conteúdo hídrico das raízes (Fig 3.4).



Conteúdo Hídrico da Raiz variedade Twistil Cr(VI)

	20	50	100	150	200
c	ns	ns	ns	ns	ns
20		ns	ns	ns	ns
50			ns	ns	s
100				ns	ns
150					ns

Conteúdo Hídrico da Raiz variedade Povoa Cr(VI)

	20	50	100	150	200
c	ns	ns	ns	ns	ns
20		ns	ns	ns	s
50			ns	ns	s
100				ns	ns
150					ns

Conteúdo Hídrico da Raiz variedades sob Cr (III) e Teide Cr(VI)

	20	50	100	150	200
c	ns	ns	ns	ns	ns
20		ns	ns	ns	ns
50			ns	ns	ns
100				ns	ns
150					ns

Fig 3.4: Conteúdo Hídrico da raiz de três variedades de *L. sativa* expostas a Cr(III) e Cr(VI) Controle = 0 (vermelho), eixo x = concentração do crómio ( $\text{mg L}^{-1}$  Cr). Tabelas referentes ao resultados da análise de variância das médias (s-significativo  $P < 0,05$ , ns- não significativo  $P > 0,05$ ).

### 3.3 Conteúdo em matéria orgânica

O efeito da exposição a Cr(VI) no conteúdo em matéria orgânica (CMO) (Fig. 3.5 A,B) foi evidente na variedade Pova quer na raíz quer na parte aérea, onde ocorreu uma redução significativa ( $P < 0.05$ ). Em contrapartida, em plantas desta variedade expostas a Cr(III) foram encontradas diferenças apenas na porção aérea ( $P < 0.05$ ).

A variedade Twistil apresentou uma redução significativa no CMO da porção aérea de plantas expostas a concentrações de Cr(VI) mais elevadas.

Já as plantas da variedade Teide apresentaram diferenças significativas nas raízes em ambas as valências do Cr às quais as plantas foram expostas.

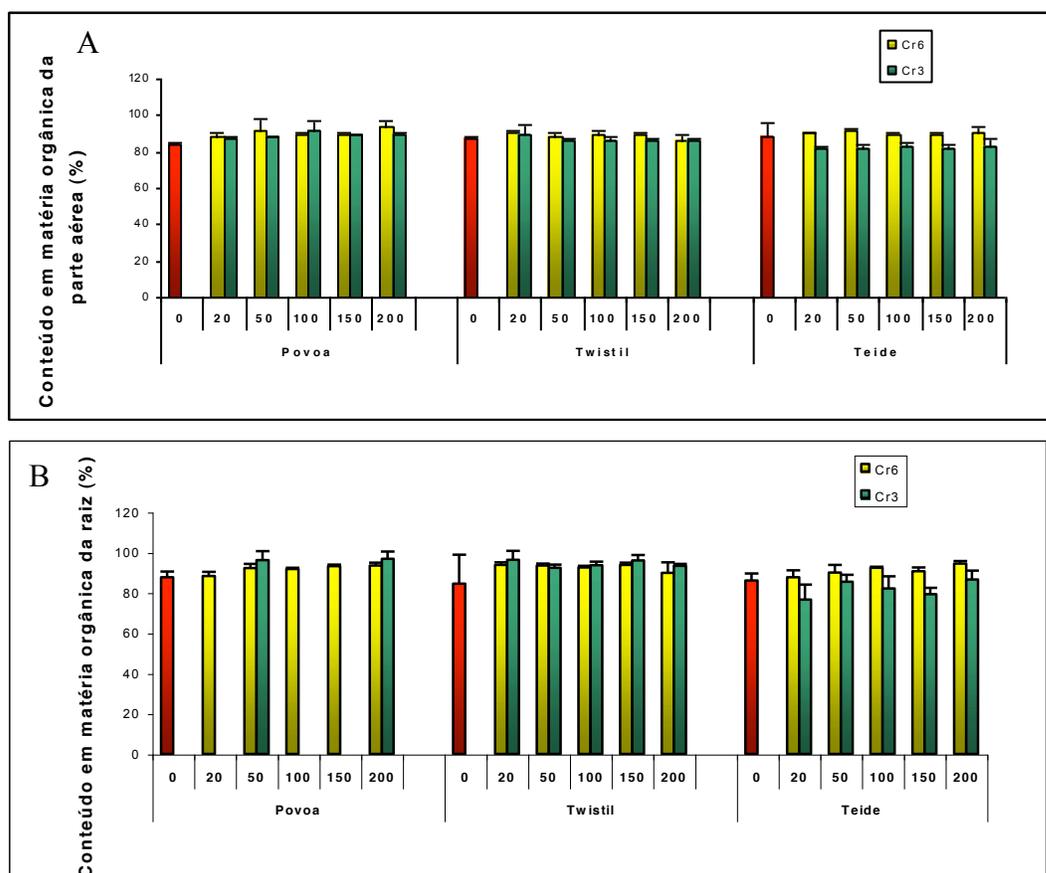


Figura 3.5: Efeito do Crómio (20, 50, 100, 150, 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) no conteúdo em matéria orgânica para três variedades de *Lactuca sativa* L. (A- Parte aérea, B- Raiz).

Quando confrontados os efeitos da exposição a Cr(VI) com Cr(III) pode-se observar que estes não diferem para a variedade Pova; contudo, são encontradas diferenças na porção aérea de Twistil e, ainda, na porção aérea e na raiz de Teide ( $P < 0.05$ , Fig 3.5 A,B).

#### 3.4 Osmolalidade dos tecidos

Foram encontradas diferenças significativas na osmolalidade de folhas de plantas da variedade Pova a partir da concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Cr (III) e a partir de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Cr para raízes em Cr(III) e (VI). Não foram encontradas diferenças significativas para folhas submetidas a Cr(VI) ( $P < 0.05$ , Fig 3.6).

A variedade Teide apresentou um aumento significativo da osmolaridade da porção aérea submetida a Cr(VI). Também a variedade Twistil apresentou um aumento da osmolalidade da porção aéreas de plantas expostas a Cr(III) e (VI) ( $P < 0.05$ , Fig 3.6).

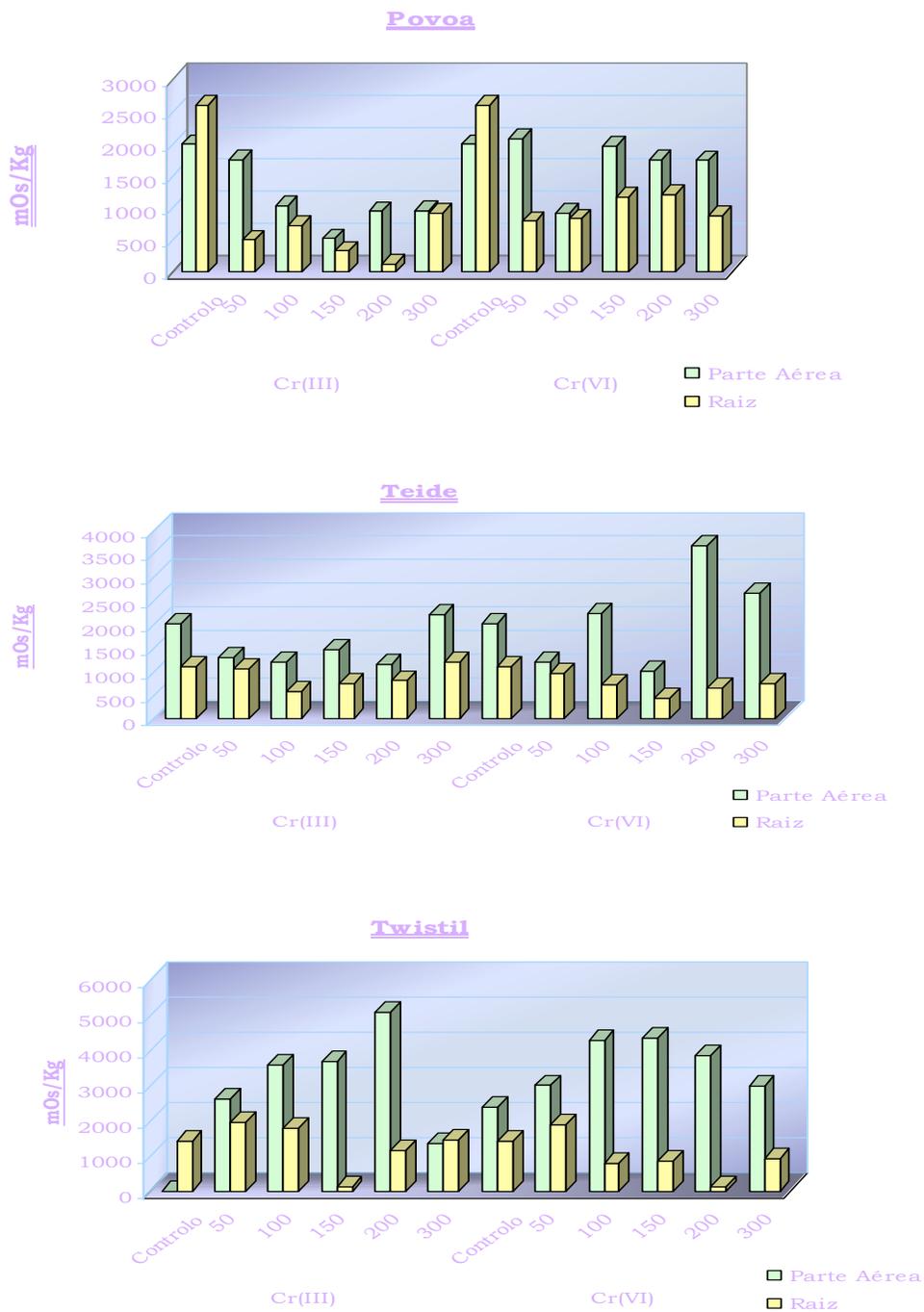


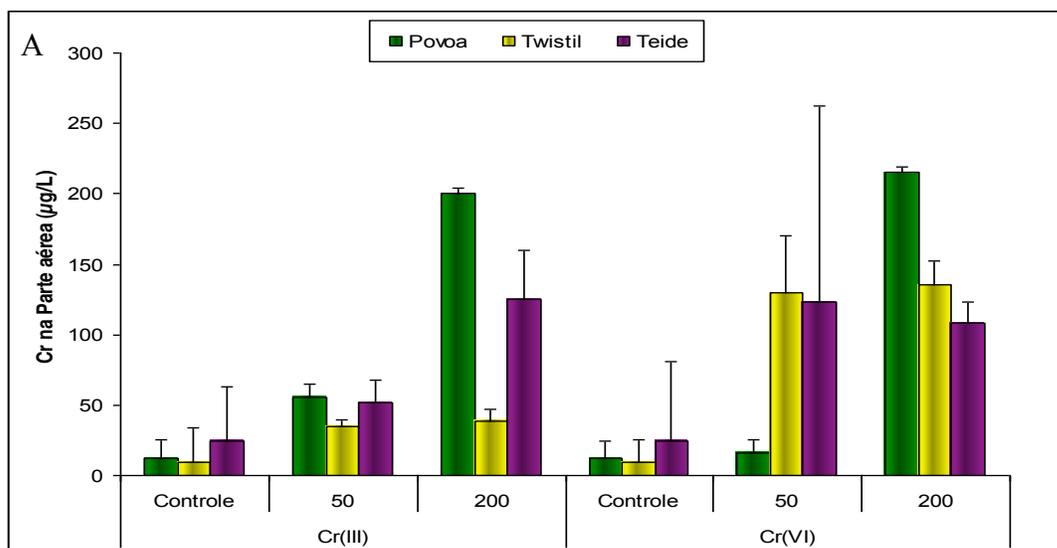
Figura 3.6. Efeito do crómio na osmolalidade dos tecidos (folha e raiz) para três variedades de *Lactuca sativa* L.

### 3.5 Análise dos elementos inorgânicos.

#### 3.5.1 Conteúdo de Crómio total

Antes de analisar os elementos inorgânicos daremos importância a um resultado obtido pela análise em ICP-MS de muita importância para este trabalho, que são o conteúdo de crómio indiferentemente da valência final em que se encontra na planta.

Foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nas raízes para todas as variedades entre o controle e o tratamento 200 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI). Também ocorreu diferença no conteúdo do metal entre as variedades Pova e Teide, sendo a primeira com sensivelmente maior acumulação de Crómio. Foi evidente a maior acumulação de metal quando comparadas raízes e parte aérea. Na parte aérea não foram encontradas diferenças significativas quer na valência usada na exposição quer nas variedades. A Fig. 3.7 mostra em, **A** o conteúdo de Cr da porção aérea e, em **B**, o seu conteúdo nas raízes.



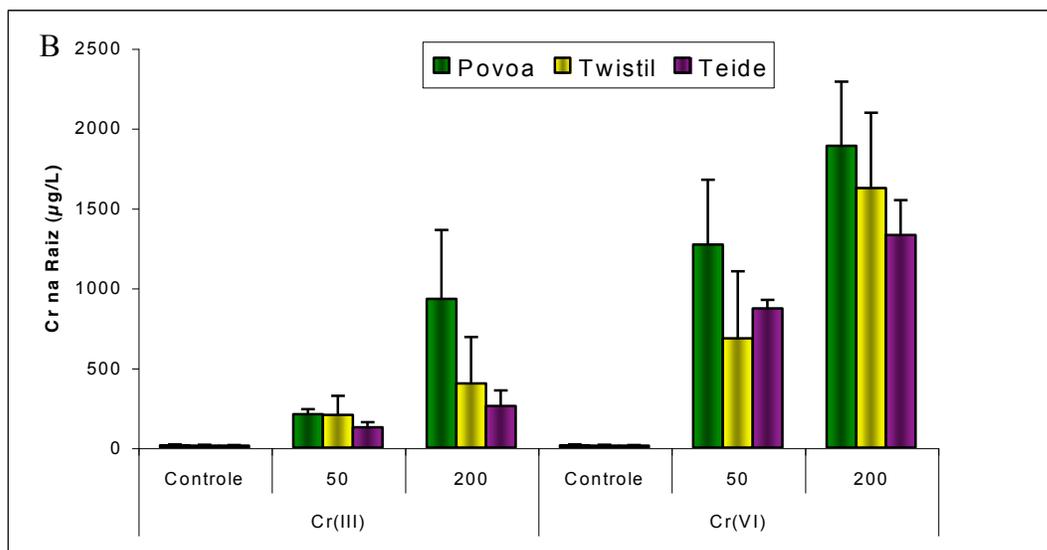


Figura 3.7 : Conteúdo de Cr em três variedades de *Lactuca sativa* L. expostas a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).

### 3.5.2 Análise dos macronutrientes

Para o macronutriente Mg não foram encontradas diferenças significativas sob influência de Crómio (figura 3.8 A e B). Para o Potássio (K) não foram detectadas diferenças significativas na parte aérea (figura 3.9 A), sendo, porém para as raízes evidente a influência negativa do Cr(VI) ( $P < 0.05$ , Fig. 3.9 B).

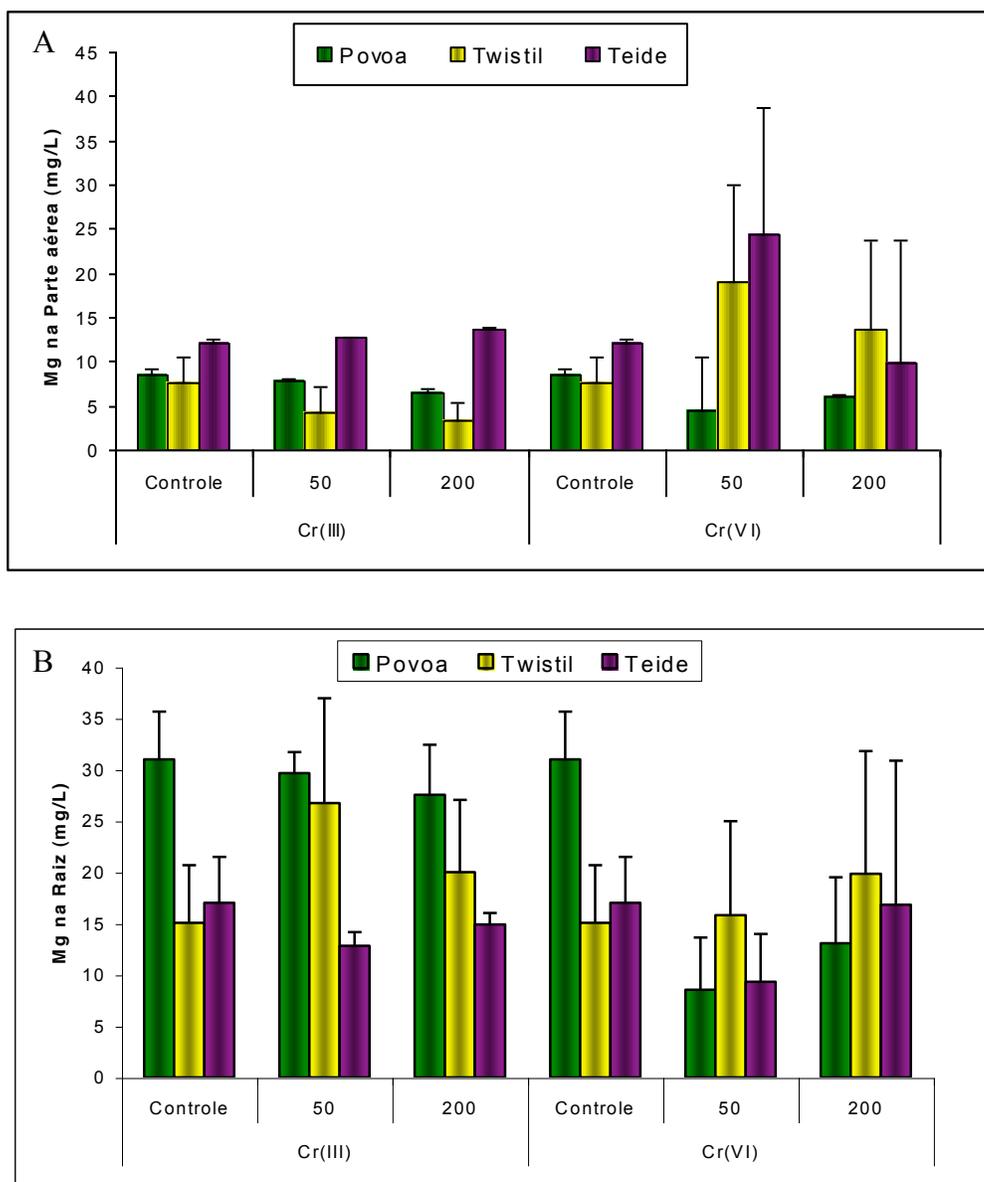


Figura 3.8 : Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) nas concentrações de Mg em três variedades de *Lactuca sativa* L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raiz).

Relativamente ao elemento cálcio (Ca) não foram encontradas diferenças sob tratamento do Crómio tanto nas porções aéreas como nas raízes (figura 3.10 A e B). Para o Fósforo (P) houve influência negativa do Cr na acumulação deste elemento nas raízes da variedade Teide ( $P < 0,05$ ; Fig. 3.11 B).

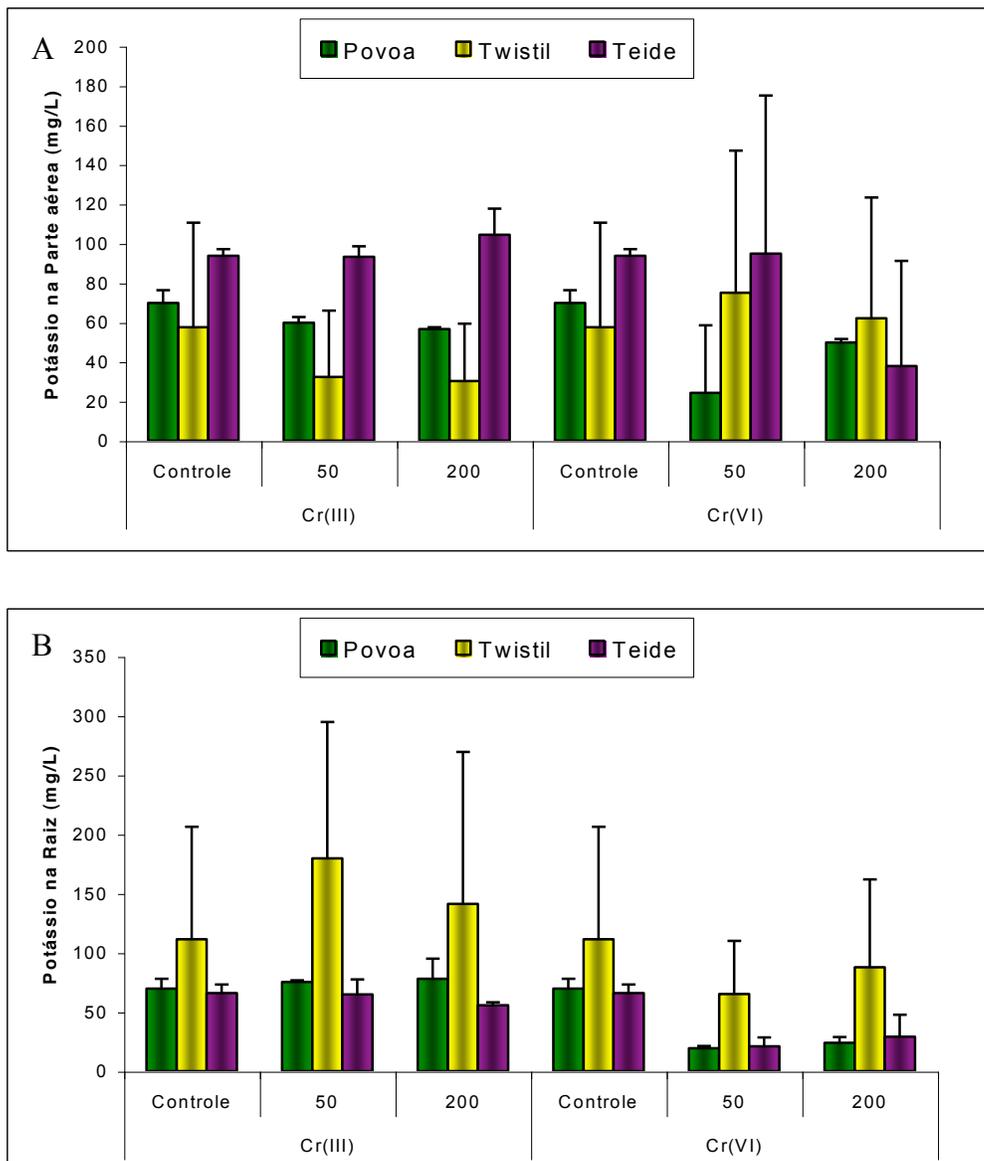


Figura 3.9: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) nas concentrações de K em três variedades de *Lactuca sativa* L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).

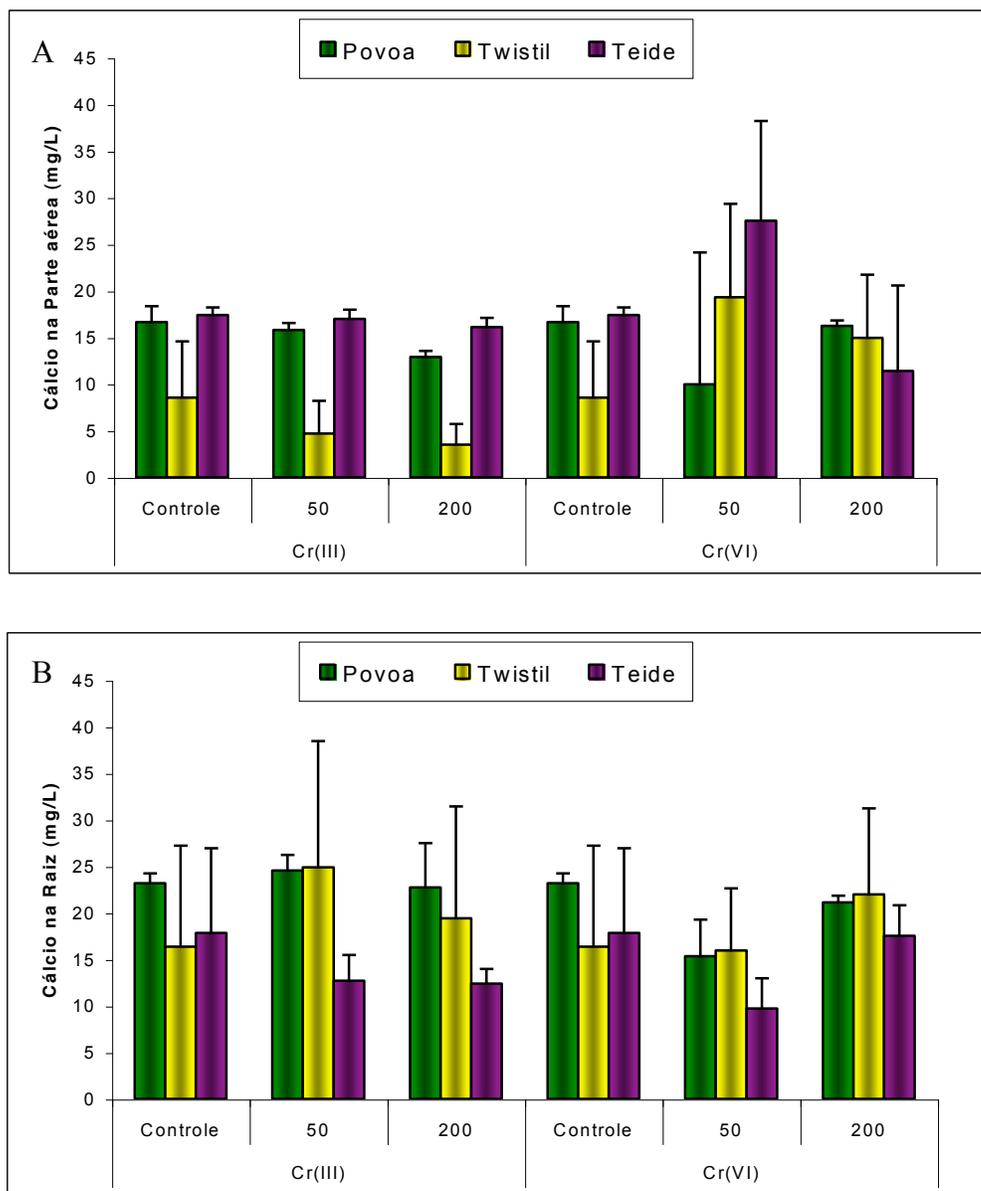


Figura 3.10: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) nas concentrações de Ca em três variedades de *Lactuca sativa* L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raiz).

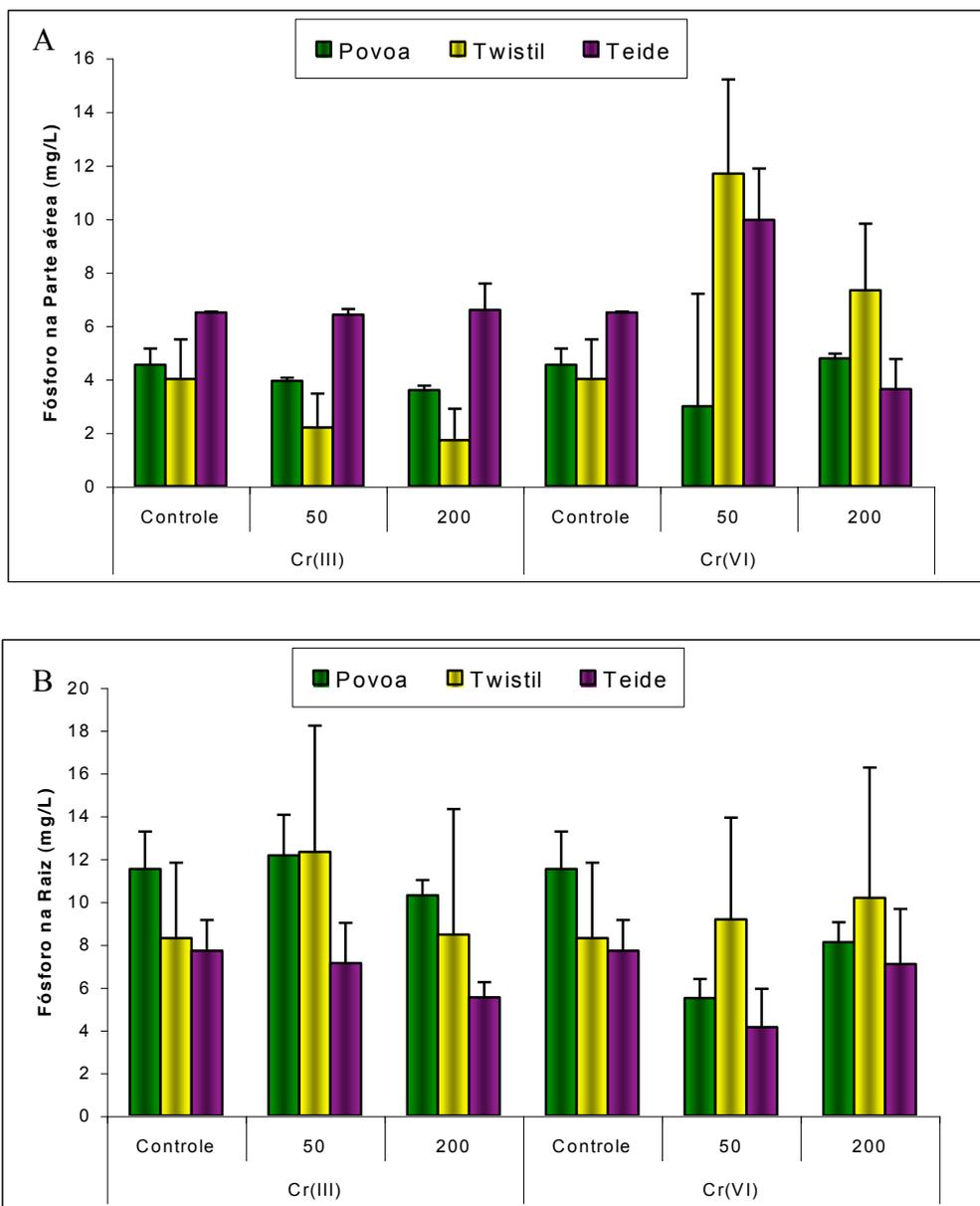


Figura 3.11: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) nas concentrações de P em três variedades de *Lactuca sativa* L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).

### 3.5.3 Análise de micronutrientes

O conteúdo de Zinco (Zn) apresentou um decréscimo significativo nas raízes da variedade Pova em Cr(VI) ( $P < 0,05$ , Fig. 3.12). Nas outras variedades este elemento não foi afectado.

Os conteúdos dos micronutrientes Boro (B) (Fig. 3.13) e Manganésio (Mn) (Fig. 3.14) apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as raízes das variedades Twistil e Teide expostas a Cr(III) ou Cr(VI), face às raízes controlo.

Os níveis de Cobre (Cu) e de Fe não variaram significativamente em qualquer uma das variedades, independentemente da forma de Cr usada na exposição (Fig. 3.15).

Saliente-se, contudo os níveis de destes nutrientes entre as variedades, mesmo em condições controlo, é variável.

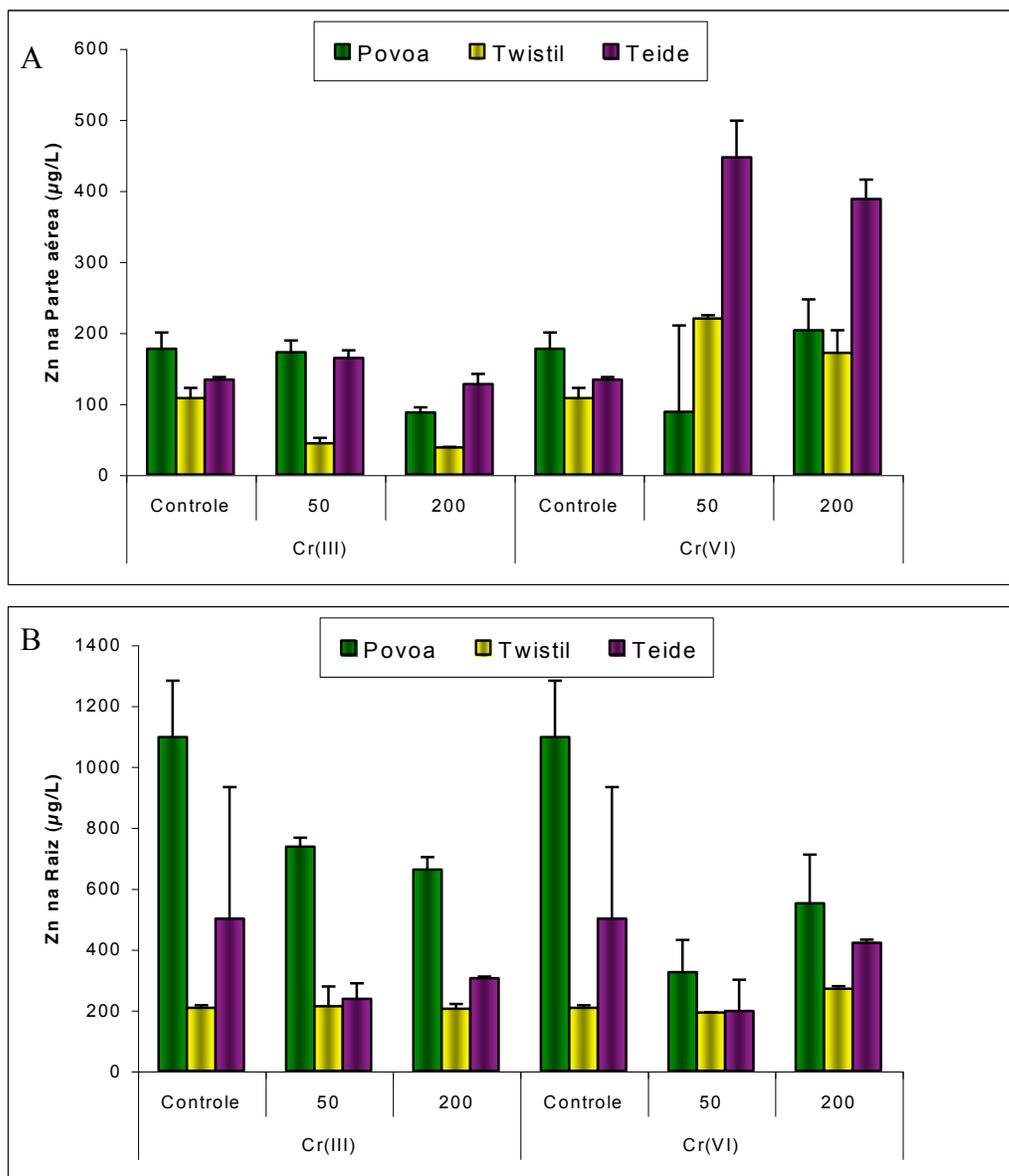


Figura 3.12: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) nas concentrações de Zn em três variedades de *Lactuca sativa* L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raiz).

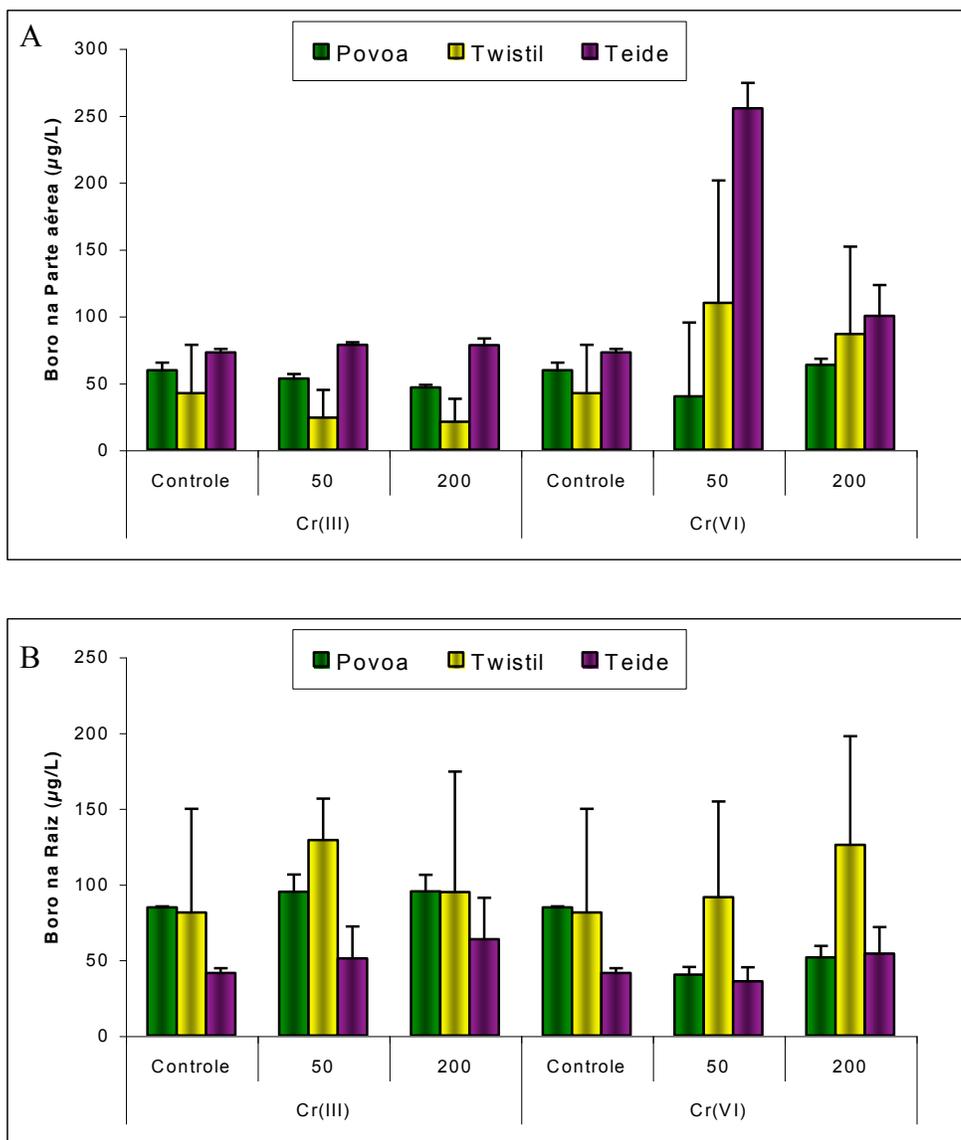


Figura 3.13: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) nas concentrações de B em três variedades de *Lactuca sativa* L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).

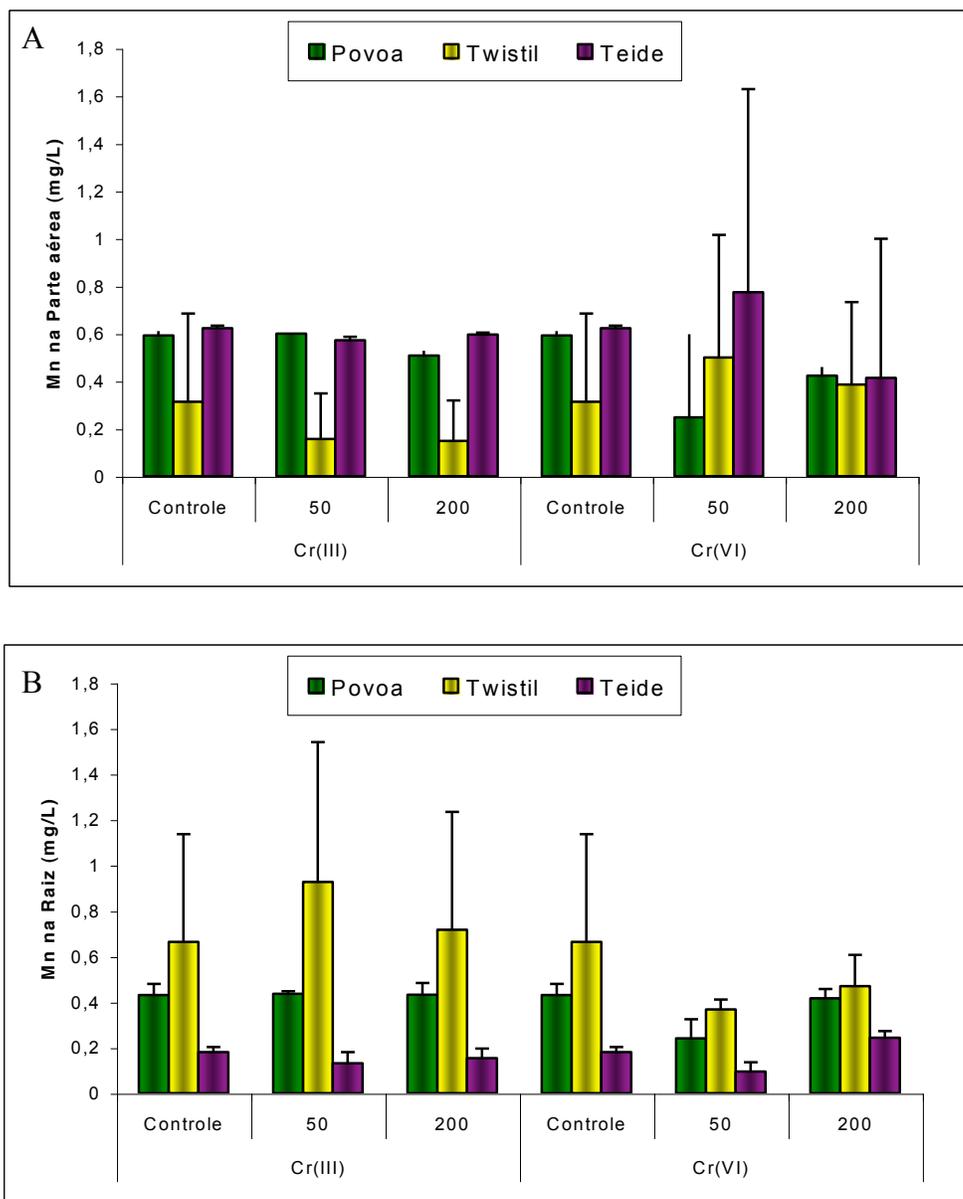


Figura 3.14: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) nas concentrações de Mn em três variedades de *Lactuca sativa* L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raiz).

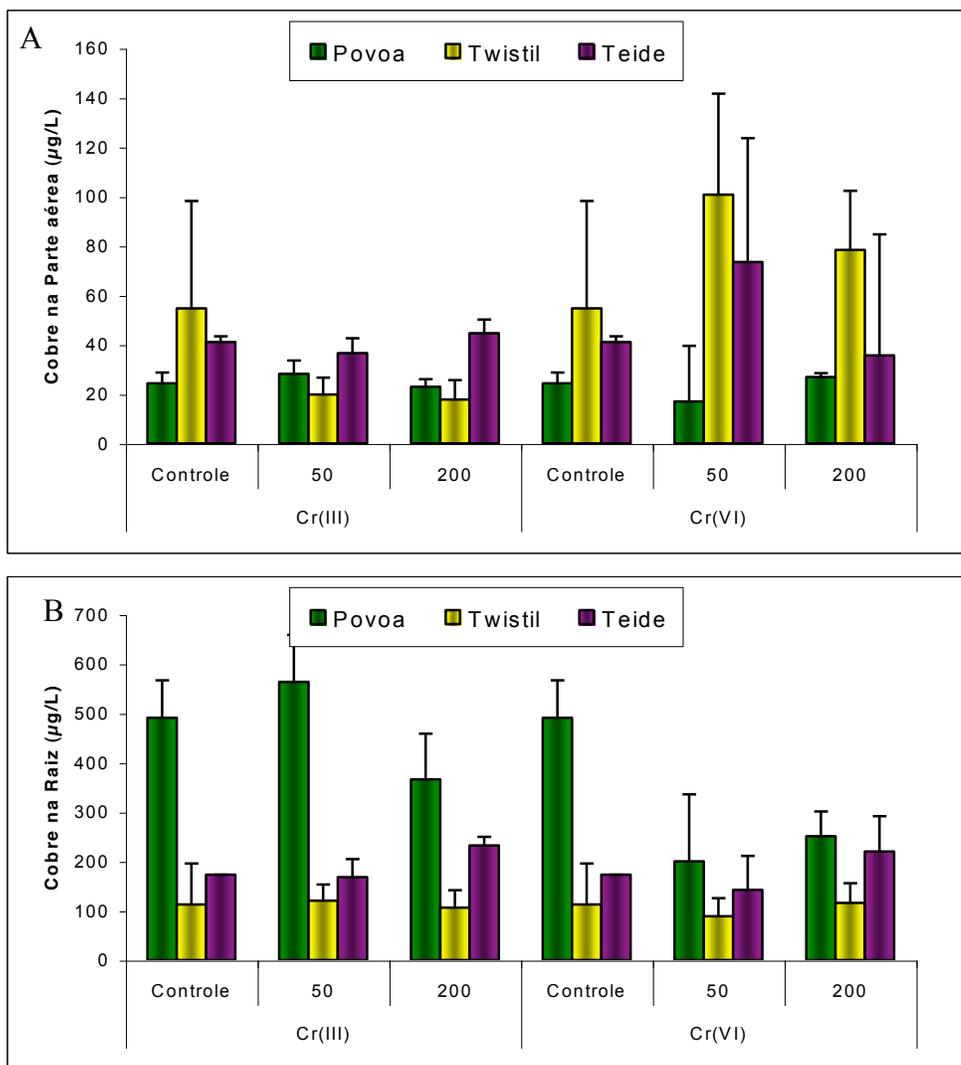


Figura 3.15: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) nas concentrações de Cu em três variedades de *Lactuca sativa* L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raíz).

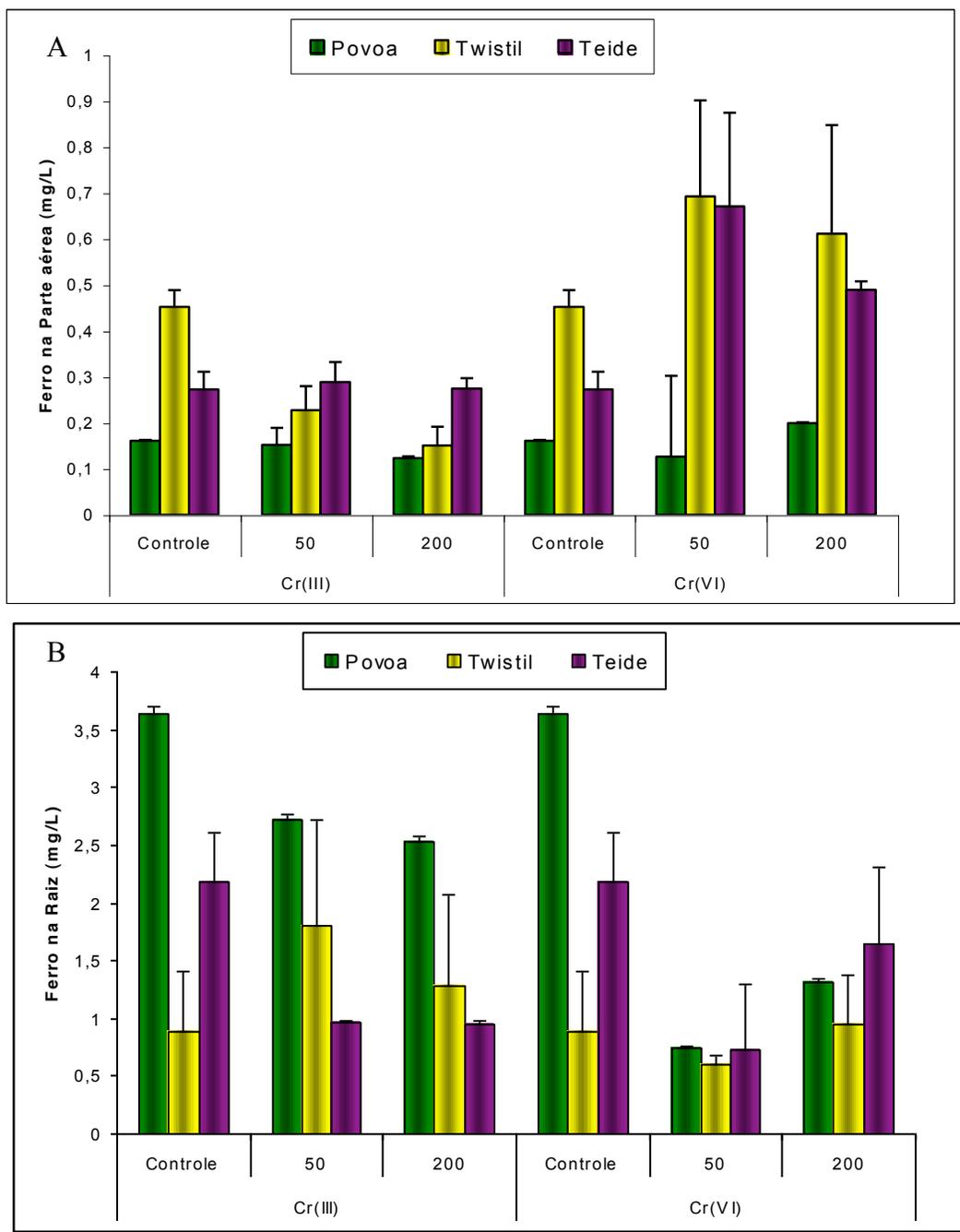


Figura 3.16: Efeito da exposição a Cr(III) e Cr(VI) (50 e 200 mg L<sup>-1</sup> Cr) nas concentrações de Fe em três variedades de *Lactuca sativa* L. ao fim de 30 dias. (A- Parte aérea, B- Raiz).

### 3.6 Detecção por EPR de formas paramagnéticas de Cr

Neste ensaio preliminar e comparativo usaram-se raízes da variedade Pova expostas a Cr(III) e Cr(VI). Os resultados de EPR mostram a intensidade de sinais das formas paramagnéticas activas de Cr existentes nas raízes nos diferentes tratamentos. Assim, os picos relativos à forma paramagnética activa de Cr (designados *b*) aumentaram em função do aumento de exposição de Cr (VI) (face ao pico maior, de menor valor *g*, presente em todos os espectros - e designado *a*).

Os resultados obtidos até ao momento mostram que as plantas expostas a Cr (III) não apresentaram o segundo pico (pico *b*).

As figuras 3.17 mostra o espectro do controlo, onde é visível o sinal paramagnético *a*, mas onde é evidente a ausencia de sinal correspondente a formas de Cr paramagnéticas. As figuras 3.18 A-C e 3.19 A-C, mostram os espectros do controlo, da exposição a Cr(VI) e Cr(III), respectivamente, sendo possível observar o pico da forma paramagnética de Cr indicado pela seta (pico *b*).

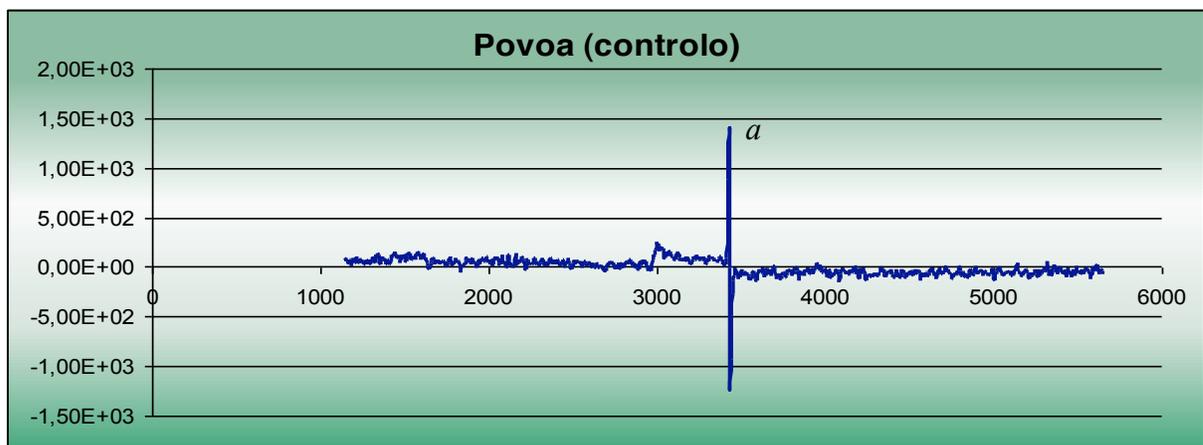


Fig 3.17: Espectro de análise por ressonância electrónica paramagnética (EPR), para raízes da variedade Pova de *Lactuca sativa*.

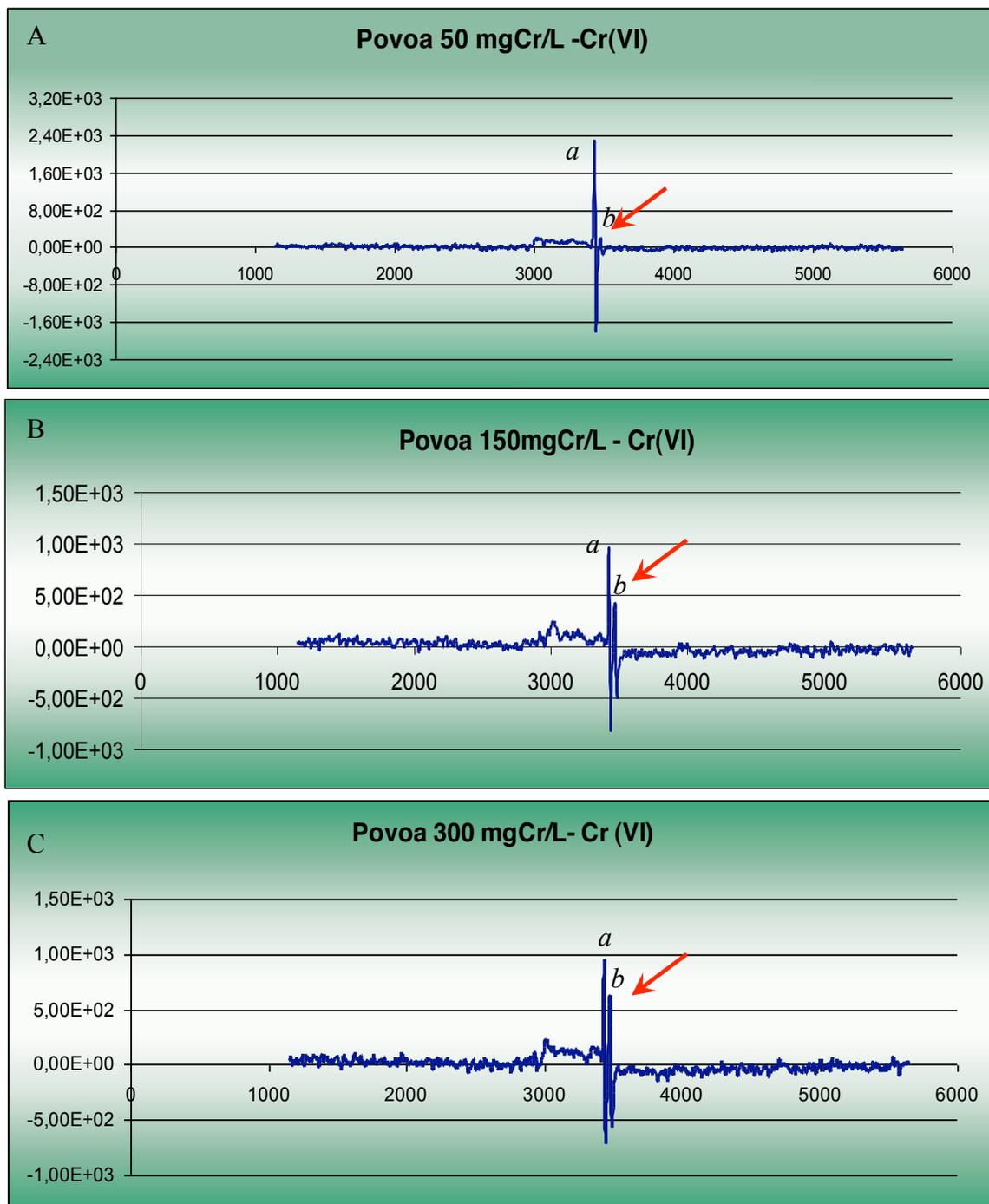


Fig 3.18: Espectro de análise por ressonância electrónica paramagnética (EPR), para raízes da variedade Povaia de *Lactuca sativa* expostas a Cr (VI) nas concentrações 50 (A), 150 (B) e 300 (C) mg L<sup>-1</sup> (a letra b e a seta evidenciam o pico referente à forma paramagnética de Crómio).

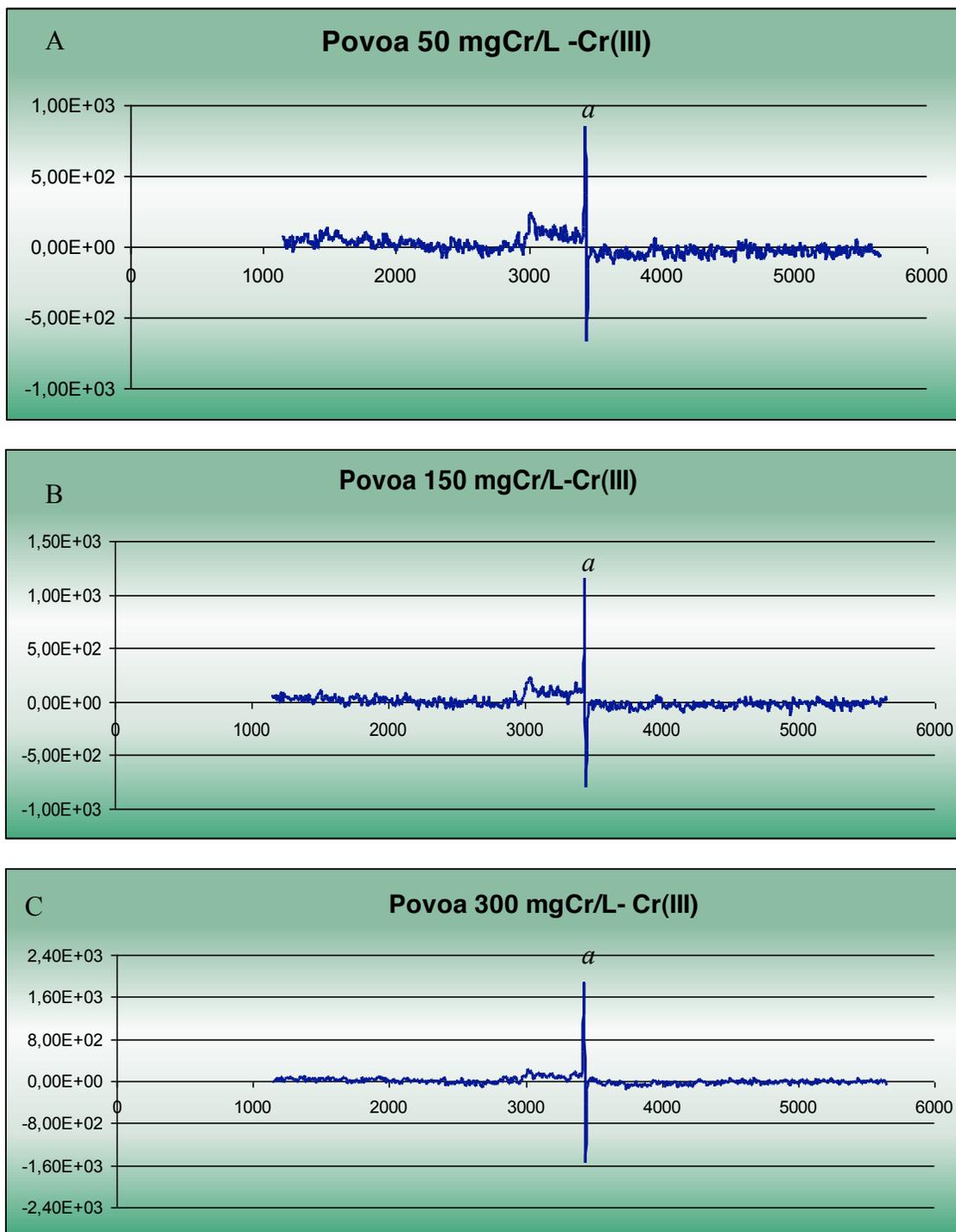


Fig 3.19: Espectro de análise por ressonância electrónica paramagnética (EPR), para raízes da variedade Pova de *Lactuca sativa* expostas a Cr (III) nas concentrações 50 (A), 150 (B) e 300 (C) mgCr/L.

### 3.7 Análise do Crómio na genotoxicidade e no ciclo celular por Citometria de fluxo.

Nenhum dos tratamentos de Cr(III) ou (VI) afectou a ploidia das variedades de alface.

Relativamente ao ciclo celular, as plantas de alface expostas a Cr(VI) tiveram diferenças significativas na percentagem de núcleos em G2 (afectando assim o ciclo celular) entre o controlo e a concentração 300 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 3.1). Na Fig. 3.20 é possível observar os picos da variedade Pova (1 e 3) e de *P.sativum* (2 e 4, padrão interno), em folhas e raízes (ápices) de plantas controlo e expostas a 300 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI).

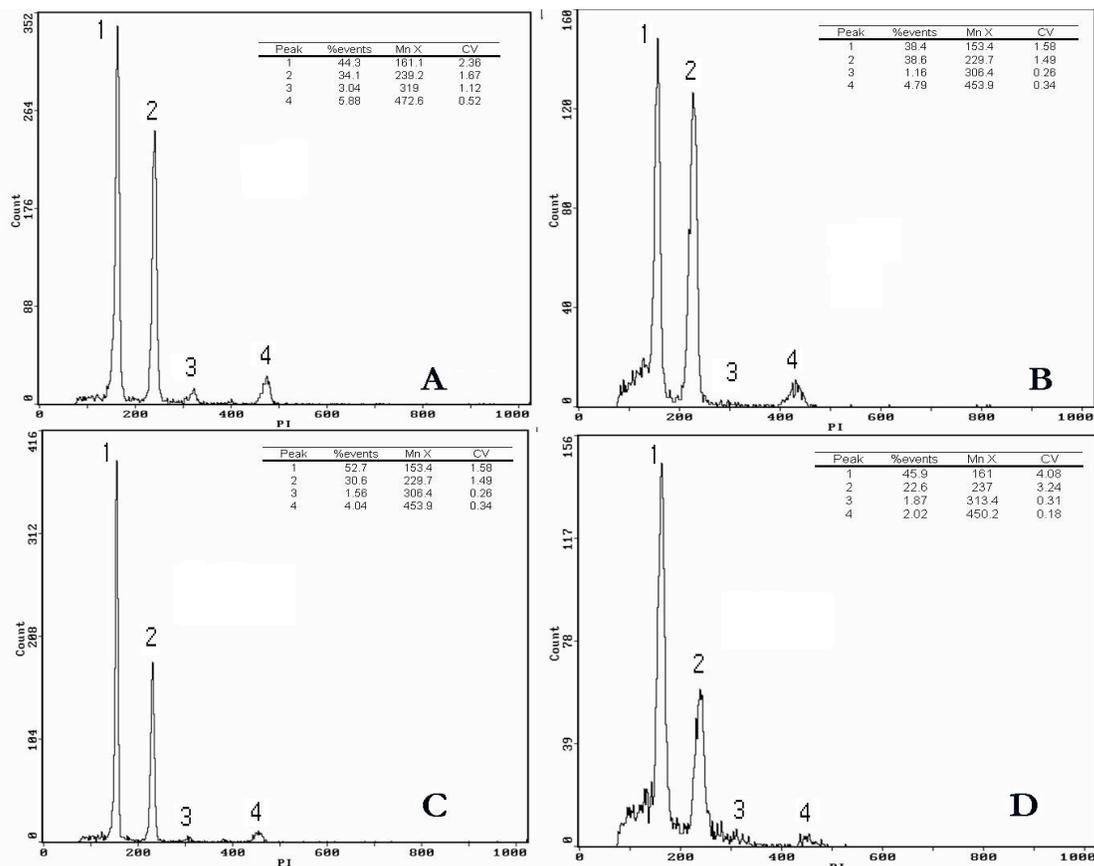


Fig 3.19: Histograma relativo a intensidade de fluorescência (FL) obtido através de simultâneas análises de núcleos isolados de *P. sativum* cv. Cirada e *L. sativa* raízes e folhas do controlo e expostas a Cr. Médias (FL) de *L.sativa* L, variedade Pova, (picos 1 and 3), e *Pisum sativum* “standard” (peak 2 and 4). A- Folha controlo, B- raiz controlo C- folha em 200 mg Cr(VI)/L D- Raiz em 200 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI) .

Tabela 3.1, Percentagem média da fase G2 em três cultivares de *Lactuca sativa* expostas a Crómio (III) e (VI).

	Povoa	Teide	Twistil
	Média G2 (%)	Média G2 (%)	Média G2 (%)
Controlo Raiz	3,71 ±0,76	3,27 ±1,37	3,60 ±0,97
Controlo Folha	6,78 ± 2,09	7,88 ± 0,53	6,37 ±0,37
Cr (III) Raiz	2,85 ±- 0,63	3,50 ±0,50	2,18 ±1,21
Cr (III) Folha	8,79 ±2,64	10,84 ±3,91	5,63 ±2,02
Cr (VI) Raiz	10,77 ±5,99	7,92 ±1,14	6,48 ±2,14
Cr (VI) Folha	3,30 ±0,98	5,31 ±0,77	3,17 ±0,86

Foi possível detectar diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) no conteúdo em DNA entre o controlo e a concentração  $300 \text{ mg mg L}^{-1}$  para as folhas da variedade Povoa. A Tabela 3.2 exhibe os conteúdos em DNA obtidos através da Citometria de Fluxo, com as médias das réplicas ( $n=3$ ) em pg.

Relativamente ao conteúdo em DNA, as plantas expostas a Cr (III) as raízes das variedades Teide e Twistil apresentaram variações significativas no conteúdo em DNA (Tabela 3.1). Porém, contrariamente a Cr(VI), nenhuma das variedades expostas ao Cr(III) apresentou diferenças significativas para % de G2.

Tabela 3.2.: Médias ( $n=3$ ) dos conteúdos em ADN (pg) de três variedades de *Lactuca sativa* expostas a Cr(III) e Cr(VI).

	Povoa	Teide	Twistil
	Conteúdo em DNA (pg)	Conteúdo em DNA (pg)	Conteúdo em DNA (pg)
Controlo Raiz	6,12 ± 0,05	6,23 ± 0,03	6,34 ± 0,02
Controlo Folha	<b>6,17</b> ±0,04	6,12 ±0,03	6,09 ±0,03
Cr (III) Raiz	6,07 ±0,10	6,02 ± 0,12	6,24 ± 0,07
Cr (III) Folha	6,11 ±0,03	6,16 ± 0,02	6,13 ±0,06
Cr (VI) Raiz	6,19 ± 0,05	6,16 ±0,19	6,24 ± 0,19
Cr (VI) Folha	<b>6,04</b> ±0,05	6,14 ± 0,08	6,14 ±0,01

## Discussão

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito de diferentes formas de Cr (Cr(III) e Cr(VI)) em várias variedades de uma espécie modelo, *Lactuca sativa*. Os estudos incidiram em análises morfológicas, qualitativas, conteúdos hídrico e nutricionais, conteúdo do Cr total e de formas paramagnéticas e hipotética ocorrência de genotoxicidade, detectada por alterações nas ploidias e/ou no conteúdo de DNA.

Com 10 dias após a primeira exposição, sobretudo a Cr(VI), as plantas já apresentavam claramente evidências da toxicidade (e.g. clorose, necrose), sintomas que foram confirmados pela análise de outros parâmetros ao longo do ensaio. Num estudo semelhante, Castilhos et al. (2001) descrevem os mesmos sintomas em plântulas de *Glycine max* L. (soja) germinadas concentrações de 10, 20 e 40 mg L<sup>-1</sup>, tendo mortalidade na população exposta à maior concentração de Cr(VI), e a partir do 19º dia de exposição. Também Sharma et al (1995) refere que a exposição de *Triticum* spp. leva a efeitos tóxicos, com mortalidade nas concentrações mais elevadas. Uma comparação entre a sensibilidade destas espécies face à alface, deve ser feita com cuidado, dado que nos ensaios de *Triticum* sp. e de *Glycine* sp., a exposição a Cr foi efectuada com plântulas, cuja sensibilidade ao metal pode ser elevado. Contrariamente, no ensaio exposto nesta dissertação, utilizaram-se plantas de alface com 3 semanas de idade, o que pode justificar a ausência de mortalidade mesmo para as concentrações mais elevadas, e daí, a impossibilidade de determinar o LD50. Por outro lado, os resultados obtidos para a alface mostram uma grande diversidade na resistência ao Cr entre as três variedades.

As referências para o efeito do Crómio no crescimento vegetal são vastas, (e.g. Barcelo et al 1987; Zayed 1995, para revisão ver Shanker et al 2005 e Zayed e Terry 2003). A maioria dos autores aborda principalmente a valência Cr(VI) que possui em geral maiores efeitos nas plantas do que o Cr(III). No estudo apresentado nesta dissertação estudo foi evidenciado pela análise do comprimento, do conteúdo hídrico e do conteúdo em matéria orgânica, que *Lactuca sativa* L é mais afetada pela valência Cr(VI) ainda que existam efeitos evidentes da interferência do Cr(III) no

desenvolvimento vegetal, ainda, a conseguimos identificar a variedade Pova como mais susceptível a efeito tóxico por Cr, e a Teide como mais resistente, provavelmente por absorver menores quantidades.

O aparente estímulo do crescimento das plantas expostas a Cr(III) nas concentrações mais baixas revela um efeito Hormesis desta valência nas plantas de alface. Este efeito morfológico Hormesis (Calabrese e Baldwin 2003) tem como principal característica é que determinado composto com potencial efeito tóxico, pode, quando em concentrações baixas provocar um efeito estimulador e em um ponto de maior concentração provocar a inibição do crescimento ou morte do objecto de estudo.

Os mecanismos envolvidos neste efeito ainda são desconhecidos, mas podem estar relacionados com a substituição de nutrientes por crómio (e.g. Panda 2005). Outras hipóteses, levantadas por Zayed e Terry (2003), propõem uma possível influência, directa ou indirecta, do Cr(III) em compostos intracelulares, nomeadamente com os níveis de hormonas (e.g. citocininas), ou na expressão de genes no DNA (e.g. Poscherenrieder et al. 1991).

As alterações no comprimento das plantas evidenciam que tanto as folhas como as raízes foram severamente afectadas pelo Cr(VI), mas não pelo Cr(III). O conteúdo hídrico relativo e conteúdo em matéria orgânica destacam as variedades Pova e a Teide como mais resistente, confirmando assim a prévia observação morfológica na resistência ao Cr entre as cultivares. Curiosamente, a osmolalidade nos tecidos sofreu pouca alteração nestas plantas, sugerindo que este parâmetro é pouco afectado pela exposição a Cr, não devendo ser utilizado como indicador de toxicidade, e/ou sugerindo que a par com potenciais variações no conteúdo hídrico a variação de solutos osmoticamente activos foi de forma a não afectar a osmolalidade dos tecidos.

A diferença da influência entre as duas valências de Cr são descritas por Shanker (2005) que propõe que os efeitos tóxicos do Cr(VI) são mais elevados devido aos vários factores que diferenciam estas valências como modo de absorção pelos

tecidos e a capacidade oxidativa e de ligação com outros elementos (ver introdução desta dissertação).

A análise dos elementos por ICP-MS mostrou que a exposição a Crómio, (independentemente da valência) levou a uma maior acumulação deste elemento nas raízes do que que nas partes aéreas o que reflecte a natureza excludora desta espécie, que, ao reter o metal tóxico nas raízes o exclui das porções aéreas, prevenindo efeitos drásticos que poderiam advir da translocação/acumulação do Cr em tecidos como o mesófilo. Por outro lado, houve também uma maior acumulação de Cr(VI) nas raízes comparativamente com a acumulação de Cr(III). Este interessante facto, sugere que: a) ocorre maior absorção de Cr(VI) nas raízes de alface, dada a maior mobilidade/solubilidade do Cr(VI) face ao Cr(III); b) o Cr(VI) penetra mais facilmente que o Cr(III) o complexo parede celular/membrana celulares. A maior absorção de Cr(VI) foi já proposta por vários autores (e.g. Zayed e Terry, 2003, Shanker, 2005). Esta hipótese, é, aparentemente confirmada pelos resultados preliminares de EPR, onde se encontrou um aumento progressivo das formas paramagnéticas activas de Cr nas raízes expostas a Cr(VI), com picos máximos a  $300 \text{ mg/L}^{-1}$ , enquanto que nas raízes expostas a Cr(III) as formas paramagnéticas não foram até ao momento, e com a metodologia utilizada, detetada. A detecção de formas paramagnéticas a baixas temperaturas em alternativa a leitura a temperatura poderá eventualmente contribuir para confirmar a presença de formas paramagnéticas nas raízes expostas a Cr(III). Deste ensaio preliminar, e embora se suponha tratar-se de uma acumulação de Cr(III), a presença Cr (V), uma valência mais instável, não deve ser excluída, e estudos neste sentido estão em curso. Em resumo, face aos resultados obtidos, algumas hipóteses podem ser colocadas: O Cr(VI), entrando mais facilmente do que o Cr(III) nos tecidos da raiz, tem oxidação para Cr(III) que permanece nas células como valência estável. Em contrapartida, quando expostas a Cr(III), as plantas têm acumulação deste não no exterior da raiz, que por lavagem da raiz para remoção de formas adsorvidas, entra em quantidade ínfimas, e daí ser detectado não só em menor quantidade por ICP-MS, mas também por EPR.

Relativamente aos conteúdos de crómio total nas partes aéreas, os níveis detectados foram cerca de 10% dos valores obtidos pelas raízes tanto para plantas expostas a Cr(VI) como para Cr(III), reforçando a hipótese de oxidação da valência Cr(VI) para Cr(III) tendo assim deslocamento semelhante da raiz para a parte aérea, e confirmando a natureza excludora desta espécie.

Relativamente aos níveis de macronutrientes acumulados nas plantas de alface, verifica-se em primeiro lugar alguma heterogeneidade entre os valores das plantas controlo das três variedades. Por outro lado, face ao efeito da exposição das plantas de alface a Cr(III) e (VI) na acumulação de macronutrientes, verifica-se, que a exposição por 30 dias, mesmo em concentrações elevadas, teve poucos efeitos na acumulação de nutrientes (Mg, K, Ca, P) e, a ocorrerem, estes efeitos verificaram-se sobretudo na raiz, o que pode indicar sobretudo efeitos de competição na absorção destes elementos. Esta conclusão é interessante pois implica um estudo sobre o efeito de toxicidade nos tecidos condutores da raiz afectando a translocação, proposto recentemente por Shanker 2005, pois parece não ter ocorrido ou ter ocorrido em quantidade suficiente que afectasse a translocação de nutrientes para a porção aérea. De facto, na sua revisão sobre o efeito do Crómio em plantas, Shanker (2005) propôs que, ao acumular-se nas raízes o cromo pode levar a um colapso celular, por exemplo de tecidos condutores, que afectarão a fisiologia não só da raiz como da porção aérea, afectando a translocação. Este modelo, embora carecendo de confirmação pode justificar a maior toxicidade do Cr(VI) face ao Cr(III) nas plantas de alface, dado que foi absorvido maior quantidade de Cr(VI), mas não justifica a não ocorrência de deficiências nutritivas observadas na porção aérea das três variedades de alface. Por outro lado, o Cr(VI) foi o que teve maior efeito na redução de níveis de certos nutrientes, como o K nas raízes das 3 variedades, aspectos que podem estar relacionados com a capacidade de osmorregulação das plantas (de notar que algumas destas raízes expostas a Cr(VI) também sofreram perda de conteúdo hídrico, o que pode justificar conjuntamente com a redução dos níveis de K, a não variação de osmolaridade). Esta hipótese requer contudo mais estudos para confirmação. A

redução dos níveis de K pode ainda afectar outros aspectos em que o potássio esteja envolvido (e.g. cofactor essencial em algumas reacções enzimáticas na respiração e fotossíntese) mas estes efeitos deverão ainda ser investigados.

O Cr (VI) levou ainda a reduções de P na raiz e na porção aérea da cultivar, que aparentemente teve um comportamento de maior resistência, sugerindo que esta redução não foi suficiente para o P atingir níveis críticos de deficiência para a planta. Finalmente o facto de o Cr(III) e Cr(VI) não terem reduzido os conteúdos dos dois cátions bivalentes Mg e Ca, sugere que as funções desempenhadas por estes elementos não são afectadas directamente (ver tabela na introdução). Este dado sugere que o efeito do Cr na clorose observada não se deve a uma redução de níveis de Mg, mas a outros efeitos. Por exemplo, o crómio possui a capacidade de degradar o ácido aminolevulínico (ALA), um precursor da clorofila (Vajpayee et al. 2000). Para outras espécies foi descrito que a forma hexavalente pode substituir íons de Mg de vários locais activos de muitas enzimas e conduzir ainda a um decréscimo dos níveis de clorofila (Vajpayee et al. 2000), mas esta via pode não ocorrer nas alfaces dado que os níveis de Mg não foram afectados em nenhuma das variedades nem em nenhuma das formas de Crómio usadas. Por outro lado, pode-se colocar a hipótese da variedade Taide (de coloração arroxeadada face às outras variedades de cor verde clara) poder apresentar maior nível de pigmentos (e.g. antocianinas, carotenoides) que lhe pode ter contribuído, pelo menos em parte, para a maior resistência desta variedade ao crómio. Noutras espécies, alguns dados apontam para a exposição a crómio ter levado à degradação de carotenoides (Baszynski et al. 1981, Rai et al. 1992). Por outro lado o incremento de níveis de carotenoides foi proposto noutras espécies como uma estratégia de aumentar um antioxidante (para combater incrementos de ROS entretanto gerados em resultado da toxicidade do crómio) (Ralph e Burchett 1998, Tripathi and Smith 2000, Vajpayee et al. 2001).

Finalmente, face aos micronutrientes, apenas o Cr(VI) decresceu os níveis de Zn na variedade mais sensível, devendo os potenciais efeitos deste decréscimo ser

estudados (e.g. o Zn actua como cofactor, tendo ainda um papel na fotofosforilação, na actividade de enzimas antioxidantes como a dismutase do superóxido, entre outras.

O efeito da maior citotoxicidade do Cr(VI) face ao Cr(III) ficou patente nestes ensaios com alface. Quanto ao efeito genotóxico, os nossos dados mostram que a exposição a Cr(III) ou (VI) não afectaram os níveis de ploidia em nenhuma das variedades de alface, mostrando que, a este nível, o Cr não tem efeito genotóxico. Contudo ficou patente que o Cr (Cr(III)) afectou o conteúdo de DNA na variedade mais sensível (Povoa) exposta à concentração mais elevada, face ao controlo. Este efeito pode ser devido a alterações na estrutura de comossomas, ou perda de e.g. pelo menos um cromossoma, embora estas hipóteses sejam muito pouco prováveis. Mais plausível, será que com a exposição ao Cr(III), ocorreu um aumento de produção de compostos citosólicos, nomeadamente secundários (alguns com efeitos antioxidantes) que, está provado podem interferir com a interacção IP/DNA, alterando assim os valores detectados para o DNA (e.g. Loureiro, 2007).

Relativamente ao ciclo celular, as plantas de alface expostas a Cr(VI) tiveram diferenças significativas na percentagem de núcleos em G2. Este resultado mostra, pela primeira vez, um claro efeito do Cr no ciclo celular das plantas expostas. Curiosamente, este efeito parece ser específico da exposição a Cr(VI) dado que nas plantas expostas a Cr(III) não sofreram este tipo de efeito. O potencial efeito mitogénico do Cr(VI) pode ser uma das explicações para a maior toxicidades, mas requer ainda estudos, que apoiem estes dados preliminares.

Concluindo, o trabalho desenvolvido nesta dissertação confirma: a) o maior efeito toxico do Cr(VI) face ao Cr(III); b) uma resposta heterogénea de resistencia ao crómio entre as variedades de alface; c) um efeito, embora pequeno, nos conteúdos nutricionais, sobretudo, exercido pelo Cr(VI) nas raízes afectando, K, Pe Zn; d) uma maior acumulação de Cr na raíz face à porção aérea, o que confirma a natureza excludora desta espécie; e) uma aparente maior acumulação de formas de Cr paramagnético nas raízes em função do aumento de concentração de Cr(VI) face a raízes expostas a Cr(III); f) a não genotoxicidade (ploidia) do Cr nestas plantas; g) o

efeito na quantidade de DNA (que pode estar associado a aumento de compostos secundários, com potencial efeito antioxidante) e efeito no ciclo celular.

Estes resultados abrem perspectivas a desenvolver muitos outros estudos, sobretudo ao nível do EPR, ao nível dos efeitos de ciclo celular, fotossíntese e stress oxidativo.

## **5 .Bibliografia.**

Adriano, D. C. (1986). Trace Elements in the Terrestrial Environment. New York Springer Verlag, p. 105– 23.

Alcantara, E.; Romera, F. J.; Canete, M.; De la Guardia, M. D. (1994) Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fedeficient cucumber (*Cucumis sativus* L) plants. *J Exp Bot*; 45:1983– 98.

Anderson, A. J.; Meyer, D. R.; Mayer, F. K. (1972). Heavy metal toxicities: levels of nickel, cobalt and chromium in the soil and plants associated with visual symptoms and variation in growth of an oat crop. *Aust J Agric Res*; 24: 557– 71.

Athalye, V. V.; Ramachandran, V.; D'Souza, T. J. (1995). Influence of chelating agents on plant uptake of  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{210}\text{Pb}$  and  $^{210}\text{Po}$ . *Environ Pollut*; 89:47– 53.

Banerjee, M.; Mishra, S.; Chatterjee, J. (2004). Scavenging of nickel and chromium toxicity in *Aulosira fertilissima* by immobilization: Effect on nitrogen assimilating enzymes. *Electron. J. Biotechnol.*, vol.7, no.3, p.13-14.

Barcelo, J.; Poschenriender, C.; Ruano, A.; Gunse, B. (1985). Leaf water potential in Cr(VI) treated bean plants (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Physiol Suppl*;77:163– 4.

Barcelo, J.; Poschenrieder, C.; Gunse, B. (1986). Water relations of chromium VI treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L cv Contender) under both normal and water stress conditions. *J Exp Bot*;37:178– 87.

Barcelo, J.; Poschenrieder, C.; Vazquez, M. D.; Gunse, B.; Vernet, J. P. (1993). Beneficial and toxic effects of chromium in plants: solution culture, pot and field

studies. Studies in Environmental Science No. 55, Paper Presented at the 5th International Conference on Environmental Contamination, Morges, Switzerland.

Barnhart, J. (1997). Occurrences, uses, and properties of chromium. *Regul Toxicol Pharm.* 26:S3–7.

Barton, L. L.; Johnson, G. V.; O’Nan, A. G.; Wagener, B. M. (2000). Inhibition of ferric chelate reductase in alfalfa roots by cobalt, nickel, chromium, and copper. *J Plant Nutr*; 23:1833– 45.

Bera, A. K.; Kanta-Bokaria, A. K.; Bokaria, K. (1999). Effect of tannery effluent on seed germination, seedling growth and chloroplast pigment content in mungbean (*Vigna radiata* L Wilczek). *Environ Ecol*; 17(4):958– 61.

Biddappa, C. C.; Bopaiah, M. G. (1989). Effect of heavy metals on the distribution of P, K, Ca, Mg and micronutrients in the cellular constituents of coconut leaf. *J Plantation Crops*; 17:1– 9.

Bishnoi, N. R.; Chugh, L. K.; Sawhney, S. K. (1993a). Effect of chromium on photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in pea (*Pisum sativum* L) seedlings. *J Plant Physiol*; 142:25–30.

Bishnoi, N. R.; Dua, A.; Gupta, V. K.; Sawhney, S. K. (1993b). Effect of chromium on seed germination, seedling growth and yield of peas. *Agric Ecosyst Environ*; 47:47– 57.

Bonet, A.; Poschenrieder, C.; Barcelo, J. (1991). Chromium III–iron interaction in Fe-deficient and Fe-sufficient bean plants: I. Growth and nutrient content. *J Plant Nutr*; 14:403– 14.

Brauer, S. L.; Wetterhahn, K. E. (1991). Chromium (VI) forms thiolate complex with glutathione. *J Am Chem Soc*; 113:3001–7.

Brauer, S. L.; Hneihen, A. S.; McBride, J. S.; Wetterhahn, K. E. (1996). Chromium (VI) forms thiolate complexes with glutamylcysteine, N-acetylcysteine, and methyl ester of N-acetylcysteine. *Inorg Chem*; 35:373–81.

Breckle, S. W. (1991). Growth under stress: heavy metals. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, editors. *Plant Root: The Hidden Half*. NY, USA7 Marcel Dekker; p. 351–73.

Cary, E. E.; Allaway, W. H.; Olsen, O. E. (1977a). Control of chromium concentrations in food plants: 2 Chemistry of chromium in soils and its availability to plants. *J Agric Food Chem*; 25:305–9.

Castilhos D.D.; COSTA, C.N.; PASSIANOTO, C.C.; LIMA, A.C.R.; LIMA.C.L.R.; MULLER, V.(2001) Efeitos da adição de Cromo hexavalente no crescimento, nodulação e absorção de nutrientes em soja. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.6,

Cary, E. E.; Allaway, W. H.; Olsen, O. E. (1977b). Control of chromium concentration in food plants: I Absorption and translocation of chromium by plants. *J Agric Food Chem*; 25:300–4.

Calabrese E. J.; Balwin, L. A (1998). Hormesis as a biological hypothesis. *Environ Health Perspectives*, v.1069 (suppl 1), p.357-362, Feb.

CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). (1999). Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers for the Environment, Winnipeg.

Cervantes, C.; Garcia, J. C.; Devars, S.; Corona, F. G.; Tavera, H. L.; Torres-Guzman J Carlos. (2001). Interactions of chromium with micro-organisms and plants. *FEMS Microbiol Rev*; 25:335– 47.

Chandra, P.; Sinha, S.; Rai, U. N. (1997) Bioremediation of Cr from water and soil by vascular aquatic plants. In: Kruger EL, Anderson TA, Coats JR, editors. *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. ACS Symposium Series, vol. 664. Washington, DC7 American Chemical Society;. p. 274– 82.

Chaney, R. L.; Malik, M.; Li, Y. M.; Brown, S. L.; Angle, J. S.; Baker, A. J. M. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Curr Opin Biotechnol*; 8:279 – 84.

Chatterjee, J.; Chatterjee, C. (2000). Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environ Pollut*; 109:69– 74.

Chen, Y. X.; Zhu, Z. X.; He, Z. Y. (1994). Pollution behaviour of organic Cr(III) complexes in soil–plant system. *Chin J Appl Ecol*; 5:187–91.

Chen, N. C.; Kanazawa, S.; Horiguchi, T.; Chen, N. C. (2001). Effect of chromium on some enzyme activities in the wheat rhizosphere. *Soil Microorg*; 55:3– 10.

Clijsters, H.; Van Assche, F. (1985). Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth Res*; 7:31– 40.

Corradi, M. G.; Bianchi, A.; Albasini, A. (1993). Chromium toxicity in *Salvia sclarea*: I Effects of hexavalent chromium on seed germination and seedling development. *Environ Exp Bot*; 33:405–13.

Davies, F. T.; Puryear J. D.; Newton, R. J.; Egilla, J. N.; Grossi, J. A. S. (2001). Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *J Plant Physiol*; 158:777– 86.

Davies, F. T.; Puryear, J. D.; Newton, R. J.; Egilla, J. N.; Grossi, J. A. S. (2002). Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *J Plant Nutr*; 25:2389– 407.

Desmet, G. A.; de Ruyter, G. A.; Rigoet, A. (1975). Absorption and metabolism of Cr(VI) by isolated chloroplasts. *Phytochemistry*; 14:2585–8.

Dietz, K. J.; Tavakoli, N.; Kluge, C.; Mimura, T.; Sharma, S. S.; Harris, G. C. (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J Exp Bot*; 52:1969– 80.

Dixit, V.; Pandey, V.; Shyam, R. (2002). Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L.cv. Azad) root mitochondria. *Plant Cell Environ*; 25:687– 90.

Foy, C. D.; Chaney, R. L.; White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Ann Rev Plant Physiol*; 29:511 –66.

Goldbold, D. L.; Kettner, C. (1991). Use of root elongation studies to determine aluminium and lead toxicity in *Picea abies* seedlings. *J Plant Physiol*; 138:231– 5.

Golovatyj, S. E.; Bogatyreva, E. N. (1999). Effect of levels of chromium content in a soil on its distribution in organs of corn plants. *Soil Res Fert*;197– 204.

Grubinger, V. P.; Gutenmann, W. H.; Doss, G. J.; Rutzke, M.; Lisk, D. J. (1994). Chromium in Swiss chard grown on soil amended with tannery meal fertilizer. *Chemosphere*; 28:717– 20.

Gupta, K.; Mehta, R.; Kumar, N.; Dahiya, D. S. (2000). Effect of chromium (VI) on phosphorus fractions in developing sunflower seeds (*Helianthus annuus* L). *Crop Res*; 20:46–51.

Gwozdz, E. A.; Przymusinski, R.; Rucinska, R.; Deckert, J. (1997). Plant cell responses to heavy metals: molecular and physiological aspects. *Acta Physiol Plant*; 19:459–65.

Hanus, J.; Tomas, J. (1993). An investigation of chromium content and its uptake from soil in white mustard. *Acta Fytotech*; 48:39– 47.

Hara, T.; Sonoda, Y. (1979). Comparison of the toxicity of heavy metals to cabbage growth. *Plant Soil*; 51:127– 33.

Hopkins, L.; Malcolm, J.; Hawkesford, J. (2000). S-supply, free sulphur and free amino acid pools in potato (*Solanum tuberosum* l. Cv Desiree). In: Brunold C, editor. *Sulphur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*; p. 259–61.

Huffman, E. W. D.; Allaway, W. H. (1973). Chromium in plants: distribution in tissues, organelles and extracts, and availability of bean leaf Cr to animals. *J. Agric. Food Chem.* 21:982–986.

Hunter J G and Vergnano O. (1953) Trace-element toxicities in oat plants. *In* The Annals of Applied Biology. Eds. R W Marsh and I Thomas. pp. 761–776. University Press, Cambridge.

Huffman, E. W. D.; Allaway, W. H. (1973). Growth of plants in solution culture containing low levels of chromium. *Plant Physiol*; 52:72– 5.

Iqbal, M. Z.; Saeeda, S.; Shafiq, Muhammad. (2001). Effects of chromium on an important arid tree (*Caesalpinia pulcherrima*) of Karachi city, Pakistan. *Ekol Bratislava*; 20:414– 22.

Jain, R.; Srivastava, S.; Madan, V. K.; (2000). Influence of chromium on growth and cell division of sugarcane. *Indian J Plant Physiol*;5:228–31.

James, B. R. (1996). The challenge of remediating chromium-contaminated soils. *Environ Sci Technol*;30:248A– 51A.

Jetly, V.; Srivastava, A. K. (1995). Monitoring of chromium phytotoxicity in some crops: effect on seed germination and seedling growth. *Soc Adv Bot*; 23:273– 9.

Jin-Hong, Q.; Zayed, Q. A.; YongLiang Zhu; Mei Yu; Terry, N.; Qian, J. H., *et al.* (1999). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *J Environ Qual*; 28:1448– 55.

Jordão, C.; Silva, A.; Pereira, J.; Brune, W. (1999). Contaminação por crómio de águas de rios proveniente de curtumes em Minas Gerais. *Universidade Federal de Viçosa -Viçosa Quimica nova*, 22(1).

Joseph, G.W; Merrilee, R. A.; Raymond, E. (1995). Comparative toxicities of six heavy metals using root elongation and shoot growth in three plant species. The symposium on environmental toxicology and risk assessment, Atlanta, GA, USA;. p. 26– 9.

KABATA – PENDIAS, A.& PENDIAS, H., 1992. Trace elements in soil and plants. *Boca Raton* Flórida. CRC, 315 p

Katz S A and Salem H (1994) The Biological and Environmental Chemistry of Chromium. VCH Publishers, Inc., New York.

Karagiannidis, N.; Hadjisavva Zinoviadi, S. (1998). The mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* enhances growth, yield and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils. *Nutr Cycl Agroecosyst*; 52:1– 7.

Karunyal, S.; Renuga, G.; Paliwal, K. (1994). Effects of tannery effluent on seed germination, leaf area, biomass and mineral content of some plants. *Bioresour Technol*; 47:215–8.

Kocik, K.; Ilavsky, J. (1994). Effect of Sr and Cr on the quantity and quality of the biomass of field crops. Production and utilization of agricultural and forest biomass for energy: Proceedings of a seminar held at Zvolen, Slovakia, p. 168– 78.

Kotas, J.; Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*, vol. 107, no. 3, p. 263-283

Kotas, J.; Stasicka, Z. (2000). Commentary: chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ Pollut*; 107:263– 83.

Krupa, Z.; Baszynski, T. (1995). Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus—direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiol Plant*;17:177– 90.

McAuley, A.; Olatunji, M. A. (1977a). Metal ion oxidations in solution. Part XVIII. Characterization rates, and mechanisms of formation of the intermediates in the oxidation of thiols by chromium (VI). *Can J Chem*; 55:3328 – 34.

Moral R, Navarro Pedreno J, (1995) Gomez I, Mataix J. Effects of chromium on the nutrient element content and morphology of tomato. *J Plant Nutr*;18:815– 22.

Moral R, Gomez I, Pedreno JN, Mataix J. (1996) Absorption of Cr and effects on micronutrient content in tomato plant (*Lycopersicum esculentum* M). *Agrochimica*;40:132–8.

O'Brien, T. Ceryak S, Patierno S. Complexities of Chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms – Review. *Mutation Research*. 2003. 533:3-36.

Ottabong E. (1989a) Chemistry of Cr in some Swedish soil III. Assessment of Cr toxicity and Cr\_P interactions in rye grass (*Lolium perenne*). *Acta Agric Scand*;39:139– 47.

Ottabong E. (1989b) Chemistry of Cr in some Swedish soil: II. Fate and impact of added Cr on pH and status of soluble Mn in four soils. *Acta Agric Scand*;39:131–8.

Parr P D. (1961), Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee.

Panda SK, Patra HK. Nitrate and ammonium ions effect on the chromium toxicity in developing wheat seedlings. P Natl Acad Sci India B 2000;70:75– 80.

Parr P D and Taylor F G Jr 1980 Incorporation of Cr in vegetation through root uptake and foliar absorption pathways. Environ. Exp. Bot. 20, 157–160.

Pedreno NJI, Gomez R, Moral G, Palacios J, Mataix J (1997). Heavy metals and plant nutrition and development. Recent Res Dev Phytochem;1: 173– 9.

Pratt P F 1966 Chromium. *In* Diagnostic Criteria for Plants and Soils. Ed. H D Chapman. Ch. 9, pp. 136–141. University of California, Riverside.

Prasad MNV, Greger M, Landberg T. (2001) *Acacia nilotica* L bark removes toxic elements from solution: corroboration from toxicity bioassay using *Salix viminalis* L in hydroponic system. Int J Phytoremed;3:289– 300

Peralta JR, Gardea Torresdey JL, Tiemann KJ, Gomez E, Arteaga S, Rascon E, (2001) Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*) L. B Environ Contam Toxicol;66(6):727– 34.

Rout GR, Sanghamitra S, Das P.(2000) Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non-tolerant populations of *Echinochloa colona* (L). Chemosphere;40:855–9.

Shanker A,K, Cervantes C, Loza tavernia H, Avudainayagam S, (2005). Chromium toxicity in plants. Environment International 31 (2005) 739– 753

Shanker AK, Sudhagar R, Pathmanabhan G. Growth, (2003) Phytochelatin SH and antioxidative response of Sunflower as affected by chromium speciation. 2nd International Congress of Plant Physiology on sustainable plant productivity under changing environment, New Delhi, India,

Schwartz K and Mertz W (1959). Chromium(III) and the glucos olerant factor. Arch. Biochem. Biophys. 85, 292–295.

Sharma DC, Pant RC. (1994) Chromium uptake and its effects on certain plant nutrients in maize (*Zea mays* L. cv. Ganga 5). J Environ Sci Health A;29:941–8

Sharma DC, Sharma CP. (1993) Chromium uptake and its effects on growth and biological yield of wheat. Cereal Res Commun;21:317– 21.

Sharma DC, Sharma CP. (1996) Chromium uptake and toxicity effects on growth and metabolic activities in wheat, *Triticum aestivum* L. cv.. Indian J Exp Biol;34:689– 91.

Saleh F, Parkerton T F, Lewis R V, Huang J H and Dickson K L (1989) Kinetics of chromium transformations in the environment. Sci. Total Environ. 86, 25–41

Singh AK. Effect of trivalent and hexavalent chromium on spinach (*Spinacea oleracea* L). Environ Ecol 2001;19:807–10.

Suseela MR, Sinha S, Singh S, Saxena R. (2002) Accumulation of chromium and scanning electron microscopic studies in scirpus lacustris I treated with metal and tannery effluent. Bull Environ Contam Toxicol;68: 540– 8.

Terry N (1981) An analysis of the growth responses of *Beta vulgaris* L. to phtotoxic trace elements. II. Chromium. Final report to the Kearney Foundation of Soil Science.

Tokunaga, TK, Wan, J, Hazen, TC, Schwartz, E, Firestone, MK, Sutton, SR, Newville, M, Olson, KR, Lanzirotti, A, Rao, W (2003) Distribution of chromium contamination and microbial activity in soil aggregates. *J. Environ. Qual.* 32: 541-549

Turner MA, Rust RH. (1971); Effects of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans. *Soil Sci Soc Am Proc*, 35:755– 8.

Vajpayee P, Rai UN, Ali MB, Tripathi RD, Yadav V, Sinha S, et al (2001). Chromium induced physiological changes in *Vallisneria spiralis* L and its role in phytoremediation of tannery effluent. *Bull Environ Contam Toxicol*;67(2):246– 56.

Wallace A, Soufi SM, Cha JW, Romney EM. (1976) Some effects of chromium toxicity on bush bean plants grown in soil. *Plant Soil*;44: 471– 3.

Zaccheo P, Cocucci M, Cocucci S (1985). Effects of Cr on proton extrusion, potassium uptake and transmembrane electric potential in maize root segments. *Plant Cell Environ*;8:721– 6.

Zayed A, Terry N.(2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant Soil*;249:139–56.

Zeid IM (2001). Responses of *Phaseolus vulgaris* to chromium and cobalt treatments. *Biol Plant*;44:111 – 5.

Zurayk R, Sukkariyah B, Baalbaki R. (2001). Common hydrophytes as bioindicators of nickel, chromium and cadmium pollution. *Water Air Soil Pollut*;127:373–88.