



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD
FACET- FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL



Dissertação de Mestrado

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS HPA NO DESENVOLVIMENTO DE HORTALIÇAS

POLIANE DA SILVA PAIXÃO GUERINO

Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero

Dourados –MS

2019

POLIANE DA SILVA PAIXÃO GUERINO

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS HPAS NO DESENVOLVIMENTO DE HORTALIÇAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero

Dourados - MS

2019

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, pois sem ELE não teria a oportunidade de realizar essa conquista;
- ✓ A minha família, por sempre incentivar e acreditar que seria capaz, principalmente, minha mãe, Marcia Paixão, meu esposo, Flávio Guerino e aos meu filhos Lucas e Bernardo, por todo incentivo, companheirismo e compreensão;
- ✓ Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) por proporcionar a possibilidade de realização desse trabalho;
- ✓ Ao meu orientador Dr. Eriton Rodrigo Botero pela orientação e, especialmente, por proporcionar o meu desenvolvimento acadêmico e profissional em mais um ciclo de vida profissional;
- ✓ Aos amigos Dr. William Falco, Mestre Eliene Santos e Josiane Carvalho pela companhia, ensinamentos, apoio e ajuda nas horas de experimentos;
- ✓ Aos colegas do Grupo de Óptica Aplicada - GOA pelo incentivo e amizade nas horas difíceis;
- ✓ Enfim, agradeço a todos que, direto ou indiretamente, contribuíram para a realização dessa dissertação!

RESUMO

A contaminação de alimentos por substâncias tóxicas tem sido interesse de intensas pesquisas nas últimas décadas. Diversas classes de compostos químicos de diferentes origens vêm sendo detectadas em alimentos e bebidas, dentre elas e o que mais vale destaque são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). O objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações fisiológicas em hortaliças submetidas à água contaminada com HPAs, com o propósito de avaliar o impacto que esses poluentes podem provocar nas plantas e em seu desenvolvimento. A Alface (*Lactuca sativa*, L) dentre as diversas hortaliças foi a escolhida para o desenvolvimento deste trabalho, pois a mesma é a mais consumida no Brasil e normalmente são consumidas de forma *in natura* e, sem muitas vezes, lavagem adequada, o que aumenta o risco de contaminação durante a ingestão. O parâmetro utilizado para o monitoramento foi a biometria da planta, que afere o tamanho da parte aérea e de suas. A técnica avalia o crescimento normal e irregular bem como a relação dessas alterações/anomalias relacionadas com o estresse. Aliado a esse parâmetro, utilizou-se a fluorescência da clorofila a para indicar, direta ou indiretamente os reflexos dos impactos de fatores ambientais e mudanças no estado fisiológico das plantas sob diferentes condições de estresse. Os resultados experimentais mostraram que o HPA benzo[a]pireno é capaz de induzir alterações significativas no comportamento fisiológico da alface. Resultados com a morfologia radicular forneceram informações suficientes para concluir que a morfologia externa das plântulas foram drasticamente comprometidas em função da presença do benzo[a]pireno em sua irrigação.

Palavras chave: Alface (*Lactuca Sativa*), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, Espectroscopia de fluorescência, benzo[a]pireno.

ABSTRACT

Contamination of food by toxic substances has been subject of intense research in recent decades. Several classes of chemical compounds from different origins, as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), have been detected in food and beverages. The objective of this work was to characterize the physiological changes in vegetables submitted to irrigation with PAHs contaminated water in order to evaluate the impact of these pollutants on plants. Lettuce (*Lactuca sativa*, L) was chosen for the development of this work, since it is the most consumed in Brazil and are normally consumed *in natura* and, without adequate washing, which increases the risk of contamination by ingestion. The parameter used for monitoring was the biometry of the plant, which affects the size of the shoot and roots in plants. The technique evaluates the normal and irregular growth and the relationship of these changes/abnormalities to the stress. In addition to this parameter, the fluorescence of chlorophyll was also used to indicate, directly or indirectly, the impacts of environmental factors and changes in the physiological state of the plants under different stress conditions. The experimental results showed that HPA benzo[a]pyrene was able of inducing significant changes in the physiological behavior of lettuce. Results of root morphology provide sufficient information to conclude that the external morphology of the seedlings can be drastically compromised due to the presence of benzo[a]pyrene.

Keyword: Lettuce (*Lactuca Sativa*), polycyclic aromatic hydrocarbons, Fluorescence spectroscopy, benzo [a] pyrene.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B(a)P	benzo(a)pireno
BOD	Estufa incubadora
CCD	Charge-Coupled Device
Chl	Clorofila
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
FACET	Faculdade de Ciência e Tecnologia
F _m	Fluorescencia máxima
F _m '	Fluorescencia máxima fase clara
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
GOA	Grupo de Pesquisa Óptica Aplicada
H ₂ O	Fórmula química da água
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
NFT	Nutriente Film Technique
NPQ	Non-Photochemical Quenching
OMS	Organização Mundial da Saúde
PP	Poluentes Prioritários
PVC	Policloreto de Vinila
STPs	Substâncias Tóxicas Persistentes
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
USEPA	Agência Ambiental Americana
UV-Vis	Luz Ultravioleta e Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de águas na Terra [3].....	12
Figura 2: Estrutura molecular dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos determinados como poluentes prioritários em estudos pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) [16]	15
Figura 3: Distribuição de Hidrocarbonetos no meio aquático [26]	17
Figura 4: Diagrama parcial de níveis de uma molécula fotoluminescente [37]	20
Figura 5: Cinética característica da emissão de fluorescência. F0: fluorescência mínima da planta adaptada ao escuro. PS: pulso saturante. Fm: fluorescência máxima da planta adaptada ao escuro. FP: pico de fluorescência no início da iluminação. F': fluorescência da planta adaptada à luz. Fm': fluorescência máxima da planta adaptada à luz. F0': fluorescência mínima no término da cinética [41]	22
Figura 6: Caixas GERBOX com as sementes no inicio do teste de germinação e após o período de 8 dias, já crescidas e prontas para serem transferidas	27
Figura 7: Perfil hidropônico com mudas já inseridas nas bandejas de germinação	29
Figura 8: Régua com medida da raiz das plântulas de Lactuca sativa. Foto: Poliane Guerino	30
Figura 9: Equipamento utilizado no estudo fluorescência cinética das plantas, no Laboratório de Biofotônica da UFGD. Foto: Poliane Guerino	31
Figura 10: Teste de germinação das sementes de Lactuca sativa no início do teste e após 8 dias mantidas em estufa de germinação BOD. Foto: Poliane Guerino	33
Figura 11: Raiz de Plantas de Lactuca sativa com diferentes concentrações de benzo(a)pireno, da esquerda para a direita, planta controle, concentração de 5,09 ng/mL e concentração 50,9 ng/mL. Foto: Poliane Guerino	33

Figura 12: Valores médios de comprimento, em função do tempo, para duas concentrações de benzo(a)pireno, comparadas com as medias do comprimento da controle (solução nutritiva)	34
Figura 13: Imagens de QY_Max durante período de análises, obtidas por meio da cinética de fluorescência da clorofila	35
Figura 14: QY_Max, média de 5 plantas de Lactuca sativa, em função do tempo, para as diferentes concentrações	36
Figura 15: Imagens de FV/Fm_Lss durante período de análise, obtidas por meio da cinética de fluorescência da clorofila	37
Figura 16: FV/Fm_Lss, média de 5 plantas de Lactuca sativa, em função do tempo, para as diferentes concentrações de benzo(a)pireno	38
Figura 17: Imagens de NPQ_Lss durante período de análise, obtidas por meio de imagem de fluorescência da clorofila	39
Figura 18: NPQ_Lss, média de 5 plantas de Lactuca sativa, em função do tempo, para as diferentes concentrações de benzo(a)pireno	40
Figura 22: Espectros de emissão do HPA benzo(a)pireno na raiz da Lactuca sativa	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura molecular e característica do HPA Benzo(a)pireno	16
---	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Água.....	12
1.2. Os Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos (HPAs).....	14
1.2.1. Benzo(a)pireno.....	16
1.3. Contaminação da água com HPAs.....	17
1.4. Toxicidade do HPA em sistemas aquáticos.....	18
1.5. Técnicas para estudo e detecção de estresse de plantas.....	19
1.5.1. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	19
1.5.2. Biometria da raiz.....	24
1.6. Plantas de alface.....	24
CAPÍTULO II.....	26
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
CAPÍTULO III.....	27
3. METODOLOGIA.....	27
3.1. Amostra para estudo.....	27
3.2. Preparo das soluções com HPA benzo(a)pireno.....	28
3.3. Sistema Hidropônico.....	28
3.4. Tamanho da raiz.....	30
3.5. Fluorescência cinética da clorofila <i>a</i> por imagem.....	30
CAPÍTULO IV.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSÃO.....	32
4.1. Efeito do Tempo e temperatura na degradação do benzo(a)pireno.....	32
4.2. Índice de germinação.....	33
4.3. Tamanho da raiz.....	34
4.4. Fluorescência da clorofila.....	35
4.5. Análises Químicas.....	41
4.5.1. Determinação do teor da Clorofila.....	42
4.5. Análise da Raíz da <i>Lactuca sativa</i>	44
CAPÍTULO V.....	46
5. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS e NOTAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Água

A água recobre aproximadamente 80% da superfície do planeta Terra, sendo que destes, 97% estão nos oceanos, ou seja, somente 3% é água doce que está disponível para o consumo humano ou animal de forma imediata, como representado no gráfico da figura 1. Esses 3% ainda tem risco de poluição, que pode causa a degradação dos escassos recursos em decorrência da ausência de políticas públicas de preservação desses recursos hídricos [1].

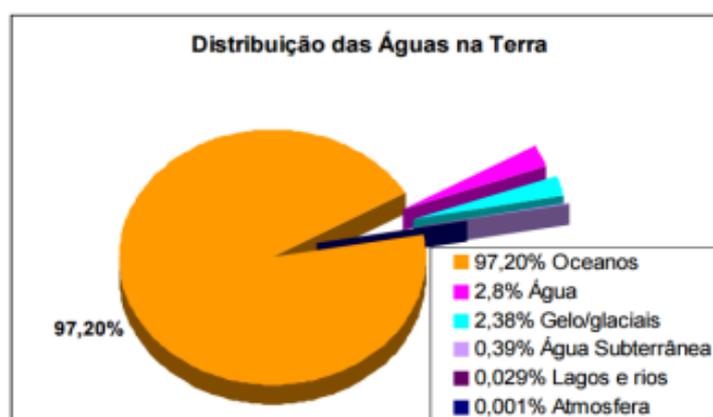


Figura 1. Distribuição de águas na Terra. Fonte: UNEP (2015) [3].

O elemento água se constitui um recurso natural essencial para a sobrevivência de todas as espécies que habitam a Terra, sendo o recurso mais importante para a vida humana. No organismo humano ela atua, entre outras funções, como veículo para a troca de substâncias e para a manutenção da temperatura do corpo, representando cerca de 70% de sua massa corporal. Além disso, é considerada solvente universal e é uma das poucas substâncias que encontramos nos três estados físicos: gasoso, líquido e sólido [2, 3].

O maior volume de água doce do mundo está presente no Brasil, contendo mais de 12% do volume total mundial. Os recursos hídricos superficiais e subterrâneos abastecem diferentes Estados e Municípios, tal que influenciam diretamente na ecologia, na economia e na vida social de cada habitante [4]. No entanto, mesmo sendo considerado um dos países com maior disponibilidade de água do mundo, as metrópoles e cidades médias

brasileiras enfrentam sérios problemas de abastecimento em função da crescente demanda e da distribuição irregular pelo território [5].

A preocupação com a qualidade da água consumida pela população é uma realidade no século XXI, sobretudo devido ao impacto que pode ocasionar na saúde e bem-estar a curto e em longo prazo [6]. Ela se constitui um recurso estratégico para a humanidade, pois além de manter a vida no Planeta é objeto que impulsiona o desenvolvimento econômico, sociocultural e ecológico e tem implicações em aspectos que vão desde a mortalidade infantil à saúde materna, passando também pelo combate às doenças infecciosas, pela redução de custos sanitários e pela qualidade do meio ambiente. No entanto, o acesso à água potável é finito, o que nos leva a ter que planejar de forma criteriosa o seu uso, já que a sua má distribuição no globo terrestre pode gerar alertas a respeito de uma crise ambiental global, na qual está inserida a crise hídrica [7]. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), cerca de 4,5 bilhões de pessoas em todo o mundo não possuem acesso a água potável [8] e esse número só tende a aumentar.

Abordagens sobre novas tecnologias sustentáveis para o tratamento e monitoramento da qualidade da água devem ser realizados [9]. A ausência de aplicação de políticas de manejo e o correto destino de resíduos gera a dispersão de diversas substâncias, tóxicas e persistentes, nos diversos meios ambientais, inclusive na água, comprometendo assim a sua qualidade [10, 11].

Devido suas propriedades de solvente e à sua capacidade de transportar partículas, a água incorpora a si diversas impurezas, as quais podem ser de grande efeito toxicológico (possíveis efeitos carcinogênicos, mutagênicos e genotóxicos) aos seres humanos. Dentre as inúmeras partículas se destacam os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs [10,12]. A presença de HPAs na água representa um risco iminente à saúde humana. Diversos estudos evidenciaram a presença de HPAs na água, dentre eles, o antraceno, fluoreno, pireno e naftaleno [10, 11]. Em águas superficiais, as principais fontes de HPAs são os efluentes industriais e domésticos, seguido pela deposição atmosférica, sobretudo em áreas urbanas com altos níveis de poluição. Em sistemas de distribuição de água, a tubulação de ferro fundido pode representar uma fonte constante de HPAs. Em relação aos mananciais subterrâneos as fontes pontuais de contaminação podem ocasionar a presença destes compostos. Métodos tradicionais de tratamento da água não são eficazes na remoção

destes compostos, e a adição de substâncias desinfetantes como o cloro pode proporcionar a formação de outros compostos com toxicidades variáveis e/ou desconhecidas [6].

1.2. Os Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos (HPAs)

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são uma importante classe de compostos orgânicos tóxicos amplamente encontrados no ar, água e solo [13] e são considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais [14]. São compostos orgânicos que contêm dois ou mais anéis aromáticos fundidos, constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio em suas moléculas, organizados sob forma linear, angular ou agrupada (Figura 2) [15]. A formação desses contaminantes tem sua origem na combustão incompleta de matéria orgânica, influenciada principalmente por fatores como temperatura e pressão [16]. Possuem características como hidrofobicidade, baixa reatividade no meio ambiente (ambientalmente estáveis), elevada resistência à degradação (persistência) e são possíveis de se acumular, inclusive em organismos vivos (tecidos e gorduras) [17].

Estas substâncias podem ter origem petrogênica, pois estão presentes na composição do petróleo; pirolítica, pela queima de biomassa e combustíveis fósseis; ou biogênica (bactérias, plantas e algas) e chegam aos sistemas através de contribuições naturais ou antrópicas como por exemplo, vazamento de petróleo, transporte terrestre ou marinho de petróleo, solventes ou combustíveis, pelo sistema de esgotamento sanitário, despejos industriais, frenagens pluviais urbanas, incêndios florestais naturais, queima de culturas agrícolas e carvão, erupção vulcânicas ou ainda pela produção de plantas, fungos e algas [17].

Quanto às propriedades físicas e químicas (pressão de vapor, peso molecular, solubilidade e coeficiente de partição), os fatores que caracterizam os HPAs estão diretamente relacionados ao tipo de ligação apresentada nestes compostos (duplas conjugadas). Em temperatura ambiente os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são sólidos e possuem ponto de fusão e ebulição elevados. No entanto apresentam baixa solubilidade em água que varia entre os altamente insolúveis a pouco solúveis em água [18].

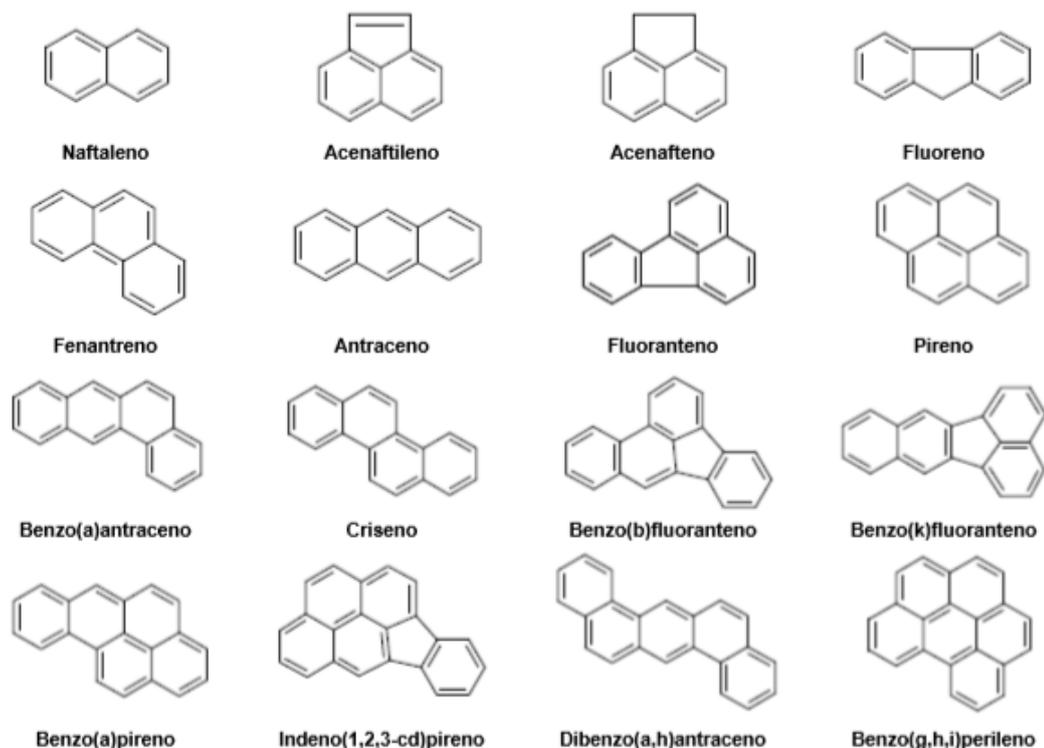


Figura 2: Estrutura molecular dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos determinados como poluentes prioritários em estudos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). Fonte: Meire *et al.*, (2007) [16]

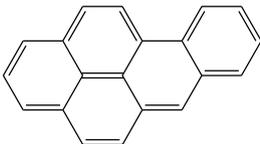
Este grupo de poluentes ambientais é considerado como um dos mais importantes, sendo pertencentes à classe das substâncias Tóxicas Persistentes (STPs). Existem cerca de 100 tipos diferentes de HPAs distribuídas no ambiente, e de acordo com a agência ambiental americana, United States Environmental Protection Agency (USEPA), estes dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são considerados poluentes prioritários (PP) [7]. Tais compostos, mesmo em concentrações baixas, podem causar perigo à saúde humana. Estudos realizados com pessoas mostram que ao serem expostos aos HPAs por longos períodos também podem desenvolver câncer. Sendo assim, são poluentes orgânicos de importância ambiental e de interesse toxicológico, pois muitos apresentam propriedades pré-carcinogênicas para homens e animais [7, 18]. A exposição humana aos HPAs ocorre através do ar, da água, do solo e fontes de alimentos. As vias de exposição incluem a ingestão, a inalação e o contato com a pele [19].

1.2.1. Benzo(a)pireno

O benzo(a)pireno é o mais estudado entre os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, por apresentar, segundo alguns autores, uma toxicidade elevada e estar muito presente no meio ambiente. Ele tem sido durante muitos anos utilizado como um composto modelo em uma variedade de bioensaios de diferentes carcinogenicidades. Este poluente é considerado um potencial causador de tumores pulmonares, por exemplo [18]. Quando se trata da interação humana, foram detectadas em algumas pesquisas a presença de benzo[a]pireno e seus metabólicos em urina de mulheres grávidas e em crianças. O benzo[a]pireno tem sido detectado também no sangue da placenta, do cordão umbilical, sangue materno, e leite materno humano [20, 21, 22], mostrando seu alto poder de contaminação.

O benzo[a]pireno (B(a)P) possui massa molecular de 252 g.mol^{-1} , baixa solubilidade em água $3,8.10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$, assim, é praticamente insolúvel. Sua fórmula química é $\text{C}_{20}\text{H}_{12}$. É considerado, também, pouco volátil pelas mesmas características. No meio ambiente este composto é persistente e, quando inserido na água, adsorve densamente nos fragmentos ou na matéria orgânica, sendo, portanto, um dos compostos mais analisados e conhecidos [23]. Suas principais características estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Estrutura molecular e característica do HPA Benzo(a)pireno

Fórmula estrutural	
Abreviatura	B(a)P
Fórmula molecular	$(\text{C}_{20}\text{H}_{12})$
λ_{max} - 366 nm ^(b)	Ref. [5]
Classe química	Hidrocarbonetos Policíclico Aromáticos
Número de anéis aromáticos conjugados	(5)

(b) Comprimento de onda onde ocorre o máximo de emissão deste HPA em um $\Delta\lambda=40 \text{ nm}$

1.3. Contaminação da água com HPAs

A poluição dos ecossistemas aquáticos, dentre as diversas fontes de poluição existentes, pode-se dar pela contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Esses elementos podem atingir os ecossistemas aquáticos de diversas formas, como por exemplo, deposição atmosférica, carreamentos superficiais por escoamento de água de chuva, descargas de esgotos domésticos, efluentes industriais e derramamentos de petróleo [24].

A maioria dos HPAs que entram nos ambientes aquáticos permanece relativamente próxima às suas fontes, decrescendo quase que logaritmicamente com a distância da origem. Desta forma, a maior parte dos HPAs encontrados nos ambientes aquáticos está localizada em rios, estuários e águas costeiras [25], como representado na figura 3.

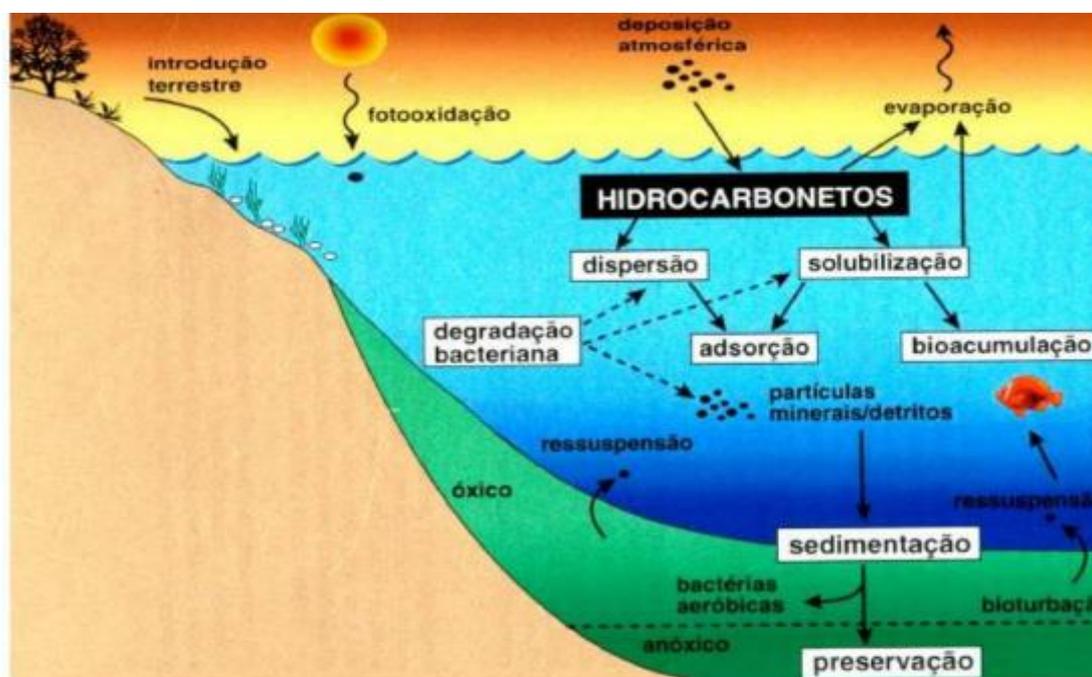


Figura 3: Distribuição de hidrocarbonetos no meio aquático. Fonte: Resende, 2012 [26]

Os HPAs podem adsorver-se nos organismos por bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação. A bioconcentração é a absorção de HPAs somente da água, através da respiração e ou pele, resultando em uma concentração de HPAs maior no organismo do que na água. A biocumulação é a absorção de HPAs por organismos aquáticos através de várias rotas de exposição, como alimentação, respiração e absorção dérmica. E a biomagnificação é o aumento da concentração de contaminantes nos organismos através da alimentação ao longo da cadeia trófica [27].

Em águas subterrâneas rasas os HPAs são comumente encontrados, o que representa um risco potencial grave para a saúde dos que dependem da água [28]. Na presença de peixes esses compostos causam uma redução na taxa metabólica e a velocidade de natação, que foi associado ainda a anomalias cardíacas, que devem contribuir para a redução do transporte de oxigênio, particularmente durante o esforço intensivo [29].

1.4. Toxicidade do HPA em sistemas aquáticos

O grande interesse em estudos de HPAs é em virtude de sua ampla distribuição em todos os compartimentos ambientais, ou seja, água, sedimento, solo e ar, e por estarem associados ao aumento de incidência de diversos tipos de cânceres no homem [30]. Os HPAs apresentam efeitos adversos aos seres humanos, toxicidade elevada, são potentes agentes cancerígenos e mutagênicos [31] e a exposição humana a esses compostos devem ser controladas.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, para serem mutagênicos, necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para se tornarem capazes de reagir com o DNA e outras macromoléculas. Segundo estudos, quatro mecanismos têm sido propostos para explicar a ativação: 1) oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diol-epóxidos; 2) formação de ésteres benzílicos, eletrofílicos através de uma série de reações de substituição; 3) produção de radicais catiônicos através da oxidação enzimática com envolvimento de u, elétron e 4) dihidrogenação enzimática dos metabólitos di-hidrodióis produzindo quinoas capazes de reagirem diretamente com o DNA, ou capazes de reagirem com O₂ gerando espécies oxigenadas reativas, como radicais hidroxilas ou ânions superóxidos que atacam o DNA. Esses mecanismos podem ocorrer simultaneamente nos organismos, sendo que a ativação por diol-epóxidos é o mecanismo mais aceito na literatura [32].

A capacidade carcinogênica e mutagênica tem mais significado nos HPAs que possuem mais de 4 anéis aromáticos e substitutos dos hidrogênios podem afetar drasticamente a atividade dos HPAs, dependendo da posição da substituição e do grupo substituinte [30].

Para determinação da qualidade da água e dos fatores de poluição é necessário também a obtenção de alguns parâmetros químicos, físicos e biológicos, como: temperatura da água, pH, análises bacteriológicas, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes, bem como quantidade de material em suspensão e as clorofilas- α . Os teores de nutrientes estão frequentemente relacionados ao grau de poluição doméstica e agropecuária de um ecossistema aquático, e os altos valores de nutrientes são, muitas vezes, interpretados como indicadores de poluição [32, 33]. O carbono é o elemento químico que faz parte da constituição dos seres vivos e de todos os compostos orgânicos. Nos ambientes aquáticos, o carbono dissolvido é uma das principais frações da matéria orgânica, a qual se constitui em fonte de energia e pode também influenciar nos mais diversos processos biogeoquímicos que neles se desenvolvem. A matéria orgânica é um parâmetro relevante para a determinação da poluição orgânica das águas naturais, o estudo das características e propriedades da matéria orgânica dissolvida se faz importante, pois a mesma pode afetar a atividade biológica do ambiente, auxiliar no transporte de elementos traço e hidrocarbonetos derivados de petróleo e até mesmo influenciar nas propriedades físicas da água [34, 35].

1.5. Técnicas para estudo e detecção de estresse de plantas.

1.5.1. Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência é um fenômeno óptico que ocorre em uma molécula após a incidência de energia luminosa (fótons). Quando uma molécula absorve um fóton, para buscar a estabilidade, esta dissipa essa energia e, tal dissipação pode ocorrer por decaimento radiativo ou por decaimento não radiativo. Os processos de decaimento radioativo envolvem a emissão de fótons, sendo que essa emissão pode ocorrer por fluorescência ou fosforescência, enquanto que os processos de decaimento não radiativos podem ocorrer por relaxação vibracional, conversão interna ou cruzamento inter sistema, como apresentado na figura 4, que ilustra o diagrama de Jablonski [36].

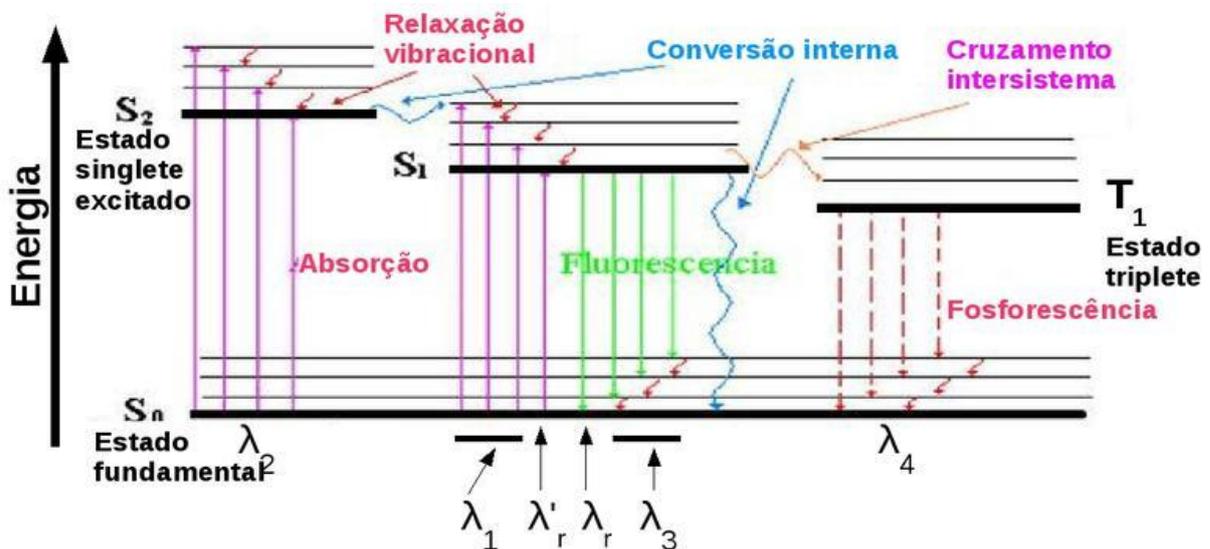


Figura 4. Diagrama parcial representativo de níveis de energia de uma molécula fotoluminescente [37].

A clorofila das plantas possui fluorescência da clorofila que por ser altamente sensível aos mais diversos estímulos permite a obtenção de informações qualitativas e quantitativas sobre a condição fisiológica do aparato fotossintético da planta, indicando direta, ou indiretamente, os reflexos dos impactos de fatores ambientais e mudanças no estado fisiológico das plantas, por exemplo [37]. Sabe-se que a eficiência fotossintética de muitas plantas diminui quando são submetidas à condições de estresse [38, 39]. Portanto, a fluorescência da clorofila tem sido usada como um método eficaz para investigar classes de plantas e para detectar estresses causados pela deficiência de nutrientes ou agentes externos [40].

A luz ultravioleta e visível (UV-Vis) absorvida pelas folhas verdes, com clorofila, pode induzir duas regiões distintas de fluorescência:

- 1- Emissões na faixa de comprimentos de onda entre 400 e 600 nm, que está associada a vários fluoróforos, tais como ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis, isoflavonas, flavanonas e ácidos fenólicos;
- 2- Emissões entre 600 e 800 nm que, in vivo, é produzida apenas pela clorofila *a*. Nesta região, entre 600 e 800 nm, a maioria da fluorescência, com máximos em

685 e 735 nm, é emitida pela clorofila *a* presente no fotossistema II (PSII) em temperatura ambiente. No entanto, uma pequena contribuição de fluorescência do fotossistema I (PSI) na faixa entre 710 e 720 nm tem sido relatada [41].

Uma vez que a fluorescência emitida ao meio ambiente pela clorofila *a* da folha depende da concentração de clorofila na amostra e da captura de fótons pelos fotossistemas, pode-se dizer que estudar a fluorescência da clorofila implica explorar, indiretamente, os estados dos aparatos fotossintéticos da planta, e dessa forma é possível identificar a influência das condições ambientais sobre o seu rendimento bioquímico, por exemplo [39].

Uma técnica que se mostra bastante eficiente para o estudo da atividade fotossintética é a técnica de fluorescência cinética por imagem, que é baseada na captura da emissão da luz na região de 680 nm por meio de uma câmera CCD (do inglês: Charge-Coupled Device), essa coleta de imagem é realizada em tempo real. A coleta da emissão de imagens é realizada em função do tempo, gerando uma característica apresentada na Figura 5. Durante a ocorrência dessa cinética, a emissão de fluorescência é medida várias vezes, tendo início na fase em que a planta ainda está adaptada ao escuro, sendo monitorada no tempo, após a incidência de pulsos saturantes e também na fase em que planta é exposta à luz. A medida dessas intensidades de emissão de fluorescência durante a cinética torna possível a determinação de parâmetros importantes no estudo do funcionamento do aparato fotossintético das plantas. Os parâmetros podem ser medidos em cada pulso saturante, entretanto, para atingir o estado estacionário de adaptação à luz, é importante fazê-lo em tempos maiores [40, 41].

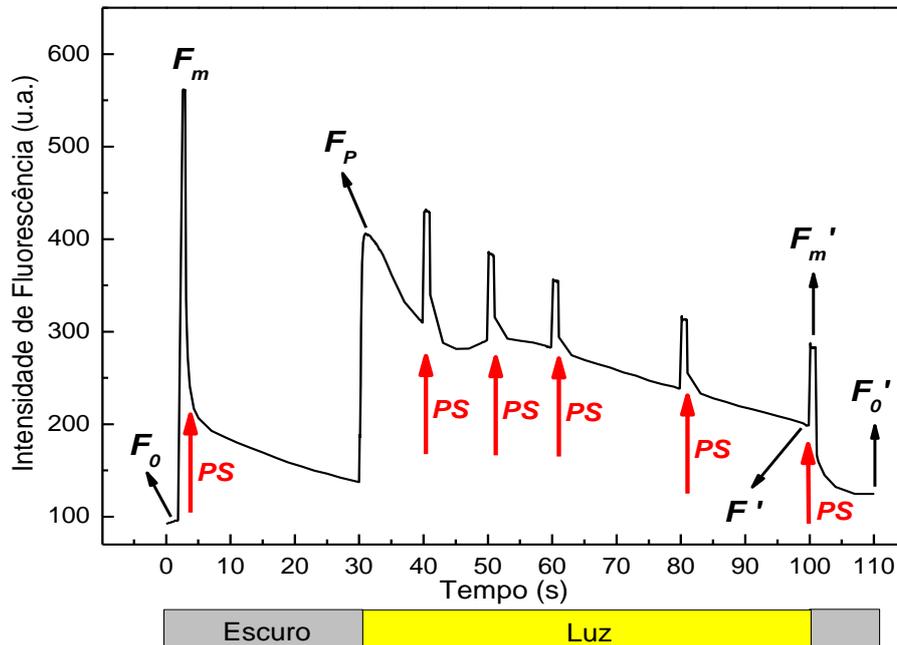


Figura 5: Cinética característica da emissão de fluorescência. F_0 : fluorescência mínima da planta adaptada ao escuro. PS : pulso saturante. F_m : fluorescência máxima da planta adaptada ao escuro. F_P : pico de fluorescência no início da iluminação. F' : fluorescência da planta adaptada à luz. F_m' : fluorescência máxima da planta adaptada à luz. F_0' : fluorescência mínima no término da cinética [41]

A fluorescência da clorofila a é definida como qualquer luz na região do vermelho e infravermelho, produzida nos tecidos vegetais fotossintetizantes, após excitação das moléculas de clorofila com luz natural ou artificial na faixa visível do espectro eletromagnético. Sua medida está relacionada com a capacidade fotossintética das plantas sob diferentes condições experimentais para sua manutenção e sobrevivência. A fluorescência é emitida, primariamente, pela clorofila a presente no **Fotossistema II (FSII)**, e se constitui em um modo de dissipação do excesso de energia nestes sistemas biológicos [42].

A energia luminosa absorvida pelos fotossistemas vegetais pode ser empregada de três maneiras distintas: a) *via fotoquímica*: que é basicamente o uso da energia luminosa na produção bioquímica da planta durante a fotossíntese; b) *via não fotoquímica*: que é parcela de energia dissipada de várias formas, principalmente, por calor em forma de radiação infravermelha (IV); c) *via fluorescência*: onde a energia é convertida na emissão de luz ao ambiente.

A adaptação da planta ao escuro faz com que a parcela de energia fotoquímica seja nula. Dessa forma, para eliminar a parcela de energia fotoquímica é necessário a aplicação

de um pulso saturante na planta, após sua adaptação no escuro. Além disso, o pulso saturante, por conter energia em excesso, promove um máximo rendimento da emissão de fluorescência (F_m). Dessa maneira, ao trabalhar com essas três vias concorrentes de consumo de energia que a planta utiliza, é possível estudar o “*status*” do aparato fotossintético por meio da análise comparativa das intensidades de emissão do **Fotossistema II** medidas durante a cinética [37, 43].

O parâmetro mais importante e o mais citado, no estudo do estresse em plantas por meio da fluorescência cinética, é o F_v/F_m . O parâmetro F_v é a diferença entre a fluorescência máxima durante o primeiro pulso saturante (F_m) e a fluorescência mínima (F_0) medida antes do pulso saturante. O parâmetro F_v/F_m (equação 1) quantifica a eficiência máxima do FSII medida na fase em que a planta está adaptada ao escuro, indicando a capacidade fotossintética da planta de maneira muito sensível. Plantas saudáveis geram valores de F_v/F_m em torno de 0,83. Quando em condições de estresse, esse valor pode sofrer drásticas reduções decorrentes, na maioria dos casos, de danos que provocam a desativação do FSII, indicando diminuição do processo de fotossíntese [44, 45].

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad \text{(Equação 1)}$$

Na fase da cinética em que a luz branca (visível) é incidida sobre a planta, há um rápido aumento da dissipação da energia na forma de calor, que é medido utilizando um parâmetro denominado “*quenching* (dissipação) não fotoquímica (NPQ) (equação 2). É importante notar que a intensidade da fluorescência máxima da planta na fase exposta à luz (F_m') é menor que a fluorescência máxima na fase adaptada ao escuro (F_m). Isso porque na fase clara, parte da energia está sendo consumida pelo NPQ, o que não acontece no primeiro pulso saturante, pelo fato da planta estar totalmente adaptada ao escuro. Assim o NPQ é um parâmetro importante no estudo do aparato fotossintético das plantas, fornecendo informações sobre a dissipação de energia na forma não-fotoquímica [43, 46]

$$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'} \quad \text{(Equação 2)}$$

Entretanto, para um estudo mais eficiente sobre os efeitos dos HPAs sobre as plantas, além da fluorescência da clorofila, outras técnicas também são necessárias para

uma melhor análise dos efeitos desses poluentes. Esse conjunto de técnicas experimentais pode proporcionar o entendimento dos mecanismos, interações, comportamento e estresse das plantas expostas aos HPAs.

1.5.2. Biometria da raiz

A biometria da raiz é uma técnica que afere o tamanho da parte aérea e de raízes em plantas, como mostra os estudos de referência [47]. Essa técnica avalia o crescimento normal e irregular e a relação dessas alterações/anomalias relacionadas com o estresse da planta. Esse conjunto de técnicas experimentais pode proporcionar o entendimento dos diferentes mecanismos, interações da luz com aparato fotossintético e agentes causadores de estresse ao organismo\parte do organismo em estudo [42]. As análises do comportamento e estresse de plantas expostas aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) é parte desses estudos com uso dessas técnicas não invasivas [47, 48].

1.6. Plantas de alface

A alface (*Lactuca sativa*) é uma planta anual, pertencente á família *Asteracea*. É originária da Europa e Ásia Ocidental, tendo como características morfológicas caule pequeno, no qual são fixas as folhas, podendo ser lisas ou crespas, sistema radicular superficial, que abrange cerca de 30 cm de profundidade no solo, sendo uma planta anual, que floresce sob altas temperaturas e vegeta em temperaturas amenas e agradáveis [49]. É uma planta típica de inverno, capaz de resistir a baixas temperaturas e a geadas leves, sendo as temperaturas amenas, essenciais durante toda a fase vegetativa de seu ciclo, especialmente durante o desenvolvimento da cabeça. Temperaturas elevadas (20-30°C) aceleram o ciclo cultural resultando em plantas menores e também induzem a presença de um indesejável sabor amargo [50].

É a hortaliça folhosa mais consumida em todo mundo. O custo de sua produção é relativamente muito baixo quando comparado a outros vegetais, sendo por isso, muito cultivada pelos pequenos produtores, bem como se adapta facilmente às variações climáticas, com possibilidade de cultivos sucessivos ao longo de todo o ano, conferindo assim, grande importância econômica [51, 52].

No Brasil, apesar do clima e de solos favoráveis ao cultivo natural de alimentos, a hidroponia é altamente viável, pois não necessita de rotação de cultura, uso quase que nenhum de defensivos agrícolas e tempo reduzido do plantio até a colheita. A alface hidropônica contém os mesmos nutrientes que os cultivados da forma tradicional, pois a planta é cultivada em uma solução nutritiva onde são dissolvidos todos os nutrientes de que a planta necessita e que normalmente retira da terra, como o nitrogênio, manganês, fósforo, potássio e outros [53, 54, 55]. No Brasil, tem crescido nos últimos anos o interesse pelo cultivo hidropônico, predominando o sistema NFT (Nutriente Film Technique). Neste sistema, segundo a referência [55], as plantas crescem em canais de cultivo por onde a solução nutritiva circula, intermitentemente, em intervalos definidos e controlados por um temporizador. Através de perfis hidropônicos próprios para este sistema de cultivo, também podem ser utilizados tubos de PVC inteiros ou cortados ao meio, longitudinalmente. O manejo adequado e o conhecimento dos aspectos nutritivos das plantas são os requisitos de sucesso para o cultivo hidropônico [54].

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar as alterações fisiológicas e fotossintéticas em hortaliças submetidas à irrigação com água contaminada com Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos HPAs, com o propósito de avaliar o impacto que esses poluentes podem provocar nas plantas.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar possíveis alterações fisiológicas em plantas de alfaces submetidas a irrigação com água contaminada por B[a]P;
- Identificar possíveis alterações fotossintéticas em plantas de alfaces submetidas a irrigação com água contaminada por B[a]P.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGIA

3.1. Preparação das mudas de alface

A pesquisa foi conduzida na Universidade Federal da Grande Dourados, durante os meses de Fevereiro de 2018 a Março de 2019. Neste estudo, foram utilizadas sementes de um mesmo lote da hortaliça alface (*Lactuca sativa L.*) crespas, marca Horticeres, adquirida em estabelecimentos especializados.

Inicialmente as sementes de alface foram colocadas para germinar, distribuídas em caixas Gerbox forradas com papel filtro e embebidos em água, como representado na figura 6. A caixa foi fechada, envolvida com filme plástico e mantida em estufa incubadora BOD por 8 dias. As sementes foram mantidas em temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12/12h claro/escuro e umidade de 65%/70% com intensidade actínica de aproximadamente 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

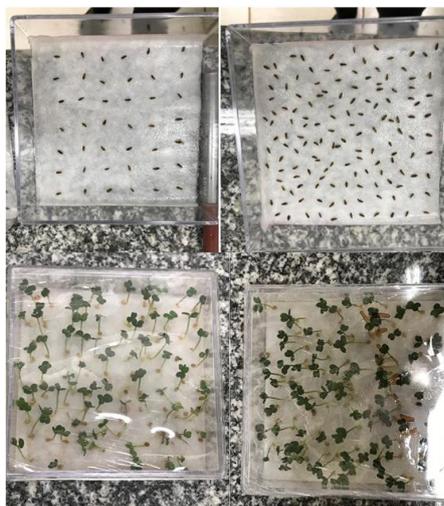


Figura 6: Caixas GERBOX com as sementes no início do teste de germinação e após o período de 8 dias, já crescidas e prontas para serem transferidas

3.2. Preparo das soluções contaminadas com benzo(a)pireno

Para o preparo da solução estoque contaminada com o HPA benzo(a)pireno utilizou-se 0,1 g de um padrão de benzo(a)pireno (Sigma-Aldrich; PM: 252,31g/mol; 96%) e dissolveu-se em 50 mL de acetona PA (Proquimios). Em seguida transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e ajustou o volume com álcool metílico PA (VETEC). No final desse processo a solução possuía uma concentração de $3,84 \times 10^{-3}$ mol/L de B(a)P.

Para o preparo da solução padrão de b(a)p fez-se uma diluição a partir da solução estoque, onde 2 mL dessa solução ($C = 3,84 \times 10^{-3}$ mol/L) foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e ajustado o volume até o menisco com metanol, obtendo-se assim, uma solução padrão com concentração igual a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L ou $1,89 \times 10^{-5}$ g/mL de HPA.

3.3. Cultivo no Sistema Hidropônico

Após a germinação das sementes, as mudas de alface foram transferidas para as bandejas de crescimento, sendo colocadas em espuma fenólica, deixando sua raiz para baixo para estar em contato com a solução nutritiva que serão adicionadas nas vasilhas com perfis hidropônicos. Foram utilizadas 4 bandejas de polipropileno (100 mm), contendo nove plantas em cada.

A solução nutritiva foi adquirida em lojas de produtos agropecuários na cidade de Dourados/MS, e contém: ferro, nitrato de cálcio e Hidrogood Fert (composto pelos macronutrientes: Nitrogenio 10%, Fósforo 9%, Potássio 28%, Magnésio 3,3%, Enxofre 4,3% e micronutrientes: Boro 0,06%, Cobre 0,01%, Molibdênio 0,07%, Manganês 0,05% e Zinco 0,02%). A metodologia de utilização para a hidroponia foi de 660g/1000litros de Hidrogood Fert, 400g/1000litros de Nitrato de Cálcio e 30g/1000litros de Ferro.

Preparou-se três soluções nutritivas diferentes, sendo uma padrão (adotada como controle contendo apenas a solução nutritiva). Uma solução contendo 0,269 mL da solução padrão de b(a)p para cada 1 litro de solução nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de benzo(a)pireno igual a 5,09 ng/mL (igual ao encontrado na referência [7]) e outra solução contendo um volume de 2,693 mL de solução padrão de b(a)p para cada 1 litro da solução nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de B(a)P igual a 50,9 ng/mL, cujo valor foi extrapolado para fins experimentais. As concentrações do HPA (benzo(a)pireno) utilizadas como contaminantes na solução nutritiva de hidroponia foram baseadas nas mesmas concentrações encontradas nos córregos urbanos do município de Dourados/MS em pesquisa realizada pela referência [7].

As mudas foram mantidas em estufa incubadora BOD com controle de temperatura, umidade e fotoperíodo, fornecendo as condições ideais para a germinação e crescimento da espécie. Exemplos de desenvolvimento das plantas são mostrados na figura 7. Quando todas as plantas atingiram o tamanho desejado para o experimento (que durou em torno de 15 dias após a germinação e transplante), foi feita a escolha de cinco amostras centrais de cada bandeja e realizaram-se as caracterizações



Figura 7: Perfil hidropônico com as mudas já inseridas nas bandejas de germinação

3.4. Medidas do Tamanho da Raiz

Após o período de germinação e crescimento as plantas foram extraídas das bandejas de crescimento e o comprimento da raiz foi medido com auxílio de uma régua e algumas imagens foram feitas. A figura 8 mostra o procedimento experimental padrão adotado para essa caracterização.



Figura 8: Régua com medida da raiz das plântulas de *Lactuca sativa*. Foto: Poliane Guerino

3.5. Medidas de Fluorescência Cinética da Clorofila *a* por Imagem

Para realizar o estudo da influência do HPA sobre o aparato fotossintético das plantas “*in vivo*” foi aplicada a técnica de fluorescência cinética por imagem, utilizando o equipamento Closed FluorCam FC 800-C da marca Photon Systems Instruments, composto basicamente por painéis de LEDs usados como fonte de excitação com intensidade de luz actínica acima de $2500 \mu\text{mol (prótons)} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e uma câmera CCD que coleta a fluorescência da planta na região entre 400 a 1000 nm fornecendo imagens com resolução de 512 x 512 pixels a uma frequência máxima de 50 frames por segundo (figura 9). O sistema é fechado, propiciando a adaptação das folhas do alface ao escuro, antes de exposta à radiação. Antes das medidas, as plantas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos garantindo que todos os centros de reação estejam abertos, obtendo com isso, uma medida mais eficaz da fluorescência. Para a cinética, foi utilizada a luz branca como fonte de excitação, foi empregado um filtro para selecionar somente a emissão da clorofila *a*, na região de 680 nm e as medidas foram realizados em um dos lados da folha.

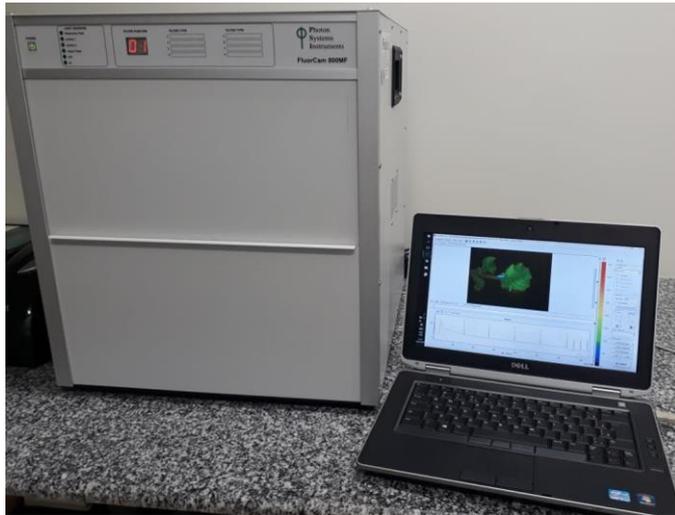


Figura 9: Equipamento utilizado no estudo da fluorescência cinética das plantas, no Laboratório de Biofotônica da UFGD. Foto: Poliane Guerino

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do Tempo e Temperatura na Degradação do benzo(a)pireno

Para o estudo de estabilidade térmica e temporal do benzo(a)pireno utilizou-se uma solução com concentração de $4,5 \times 10^{-7}$ mol/L em metanol, obtida a partir da diluição da solução estoque contaminada. A amostra foi armazenada em vidro âmbar, acondicionada tanto em temperatura ambiente quanto em na geladeira e foi monitorada durante intervalos de tempo perfazendo um período total de 100 horas.

Com os valores de intensidade de fluorescência medidos para cada intervalo de tempo, calculou-se a concentração utilizando a equação pela curva de titulação (Patra & Mishra, 2001).

$$Y=2,48442 + 9,209xC \quad \text{(Equação 3)}$$

Durante todo o intervalo de tempo estudado (aproximadamente igual ao do experimento com as plantas), e para as duas condições de temperatura observou-se que o composto b(a)p mantém sua concentração estável.

4.2. Índice de germinação

Os testes de germinação foram realizados com sementes de Alface (*Lactuca sativa*) crespa nas caixas de germinação, como descrito na sessão 3.1. As sementes foram colocadas para germinar e foram umedecidas com água com distintas concentrações de HPA (sendo as concentrações de 0 ng/mL, 5,09 ng/mL e 50,9 ng/mL de b(a)p). Cada caixa germinadora possuía em torno de 42 sementes.

Após 8 dias foi realizada a contagem das sementes germinadas e fazendo uma porcentagem simples, verificou-se que para todas as amostras com concentração de benzo(a)pireno as sementes germinaram 100% (figura 10). Assim sendo, não houve diferença na germinação das sementes em função da concentração de HPA.

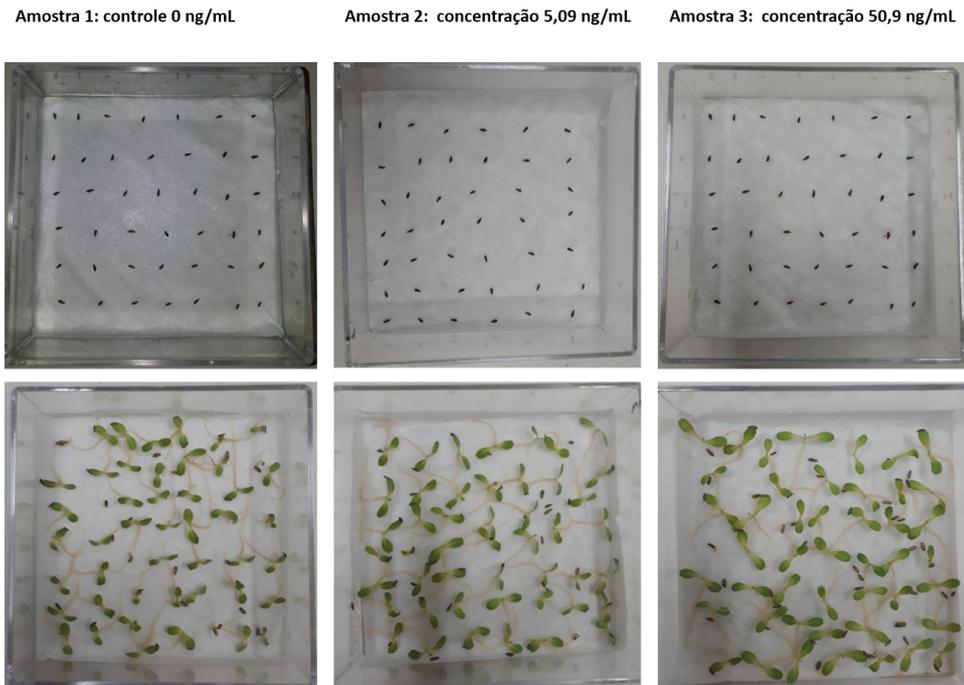


Figura 10: Teste de germinação das sementes de *Lactuca sativa* no início do teste e após 8 dias mantidas em estufa de germinação BOD. Foto: Poliane Guerino

4.3. Tamanho da raiz

A Figura 11 é uma foto representativa das plantas de *Lactuca sativa* para as três concentrações de benzo[a]pireno após 8 dias (192h) do início de seu desenvolvimento e plantio nas caixas de crescimento.



Figura 11: Raiz de plantas de *Lactuca sativa* com diferentes concentrações de benzo(a)pireno, da esquerda para a direita, planta controle, concentração 5,09ng/mL e concentração 50,9 ng/mL. Foto: Poliane Guerino

A figura 12 mostra os valores médio do comprimento da raiz de 10 amostras para cada solução nutritiva utilizada, cada uma com uma concentração distinta de HPA. Nota-se que para a menor quantidade de HPA inserido na solução nutritiva (5,09 ng/mL), porém muito acima do regulamentado pelos órgãos de fiscalização, não se nota diferença significativa no valor médio do tamanho das raízes se comparada com a amostra controle (0 ng/mL). Já para a maior concentração houve uma redução no tamanho das raízes de em torno de 60%, mostrando que apenas quando são submetidas ao estresse muito agudo de benzo(a)pireno, as plantas tendem a diminuir o tamanho da raiz [39, 55]. Nesse caso, pela imagem da figura 11 notou-se também um subdesenvolvimento foliar das plantas (parte aérea), influenciado pela má formação raticular.

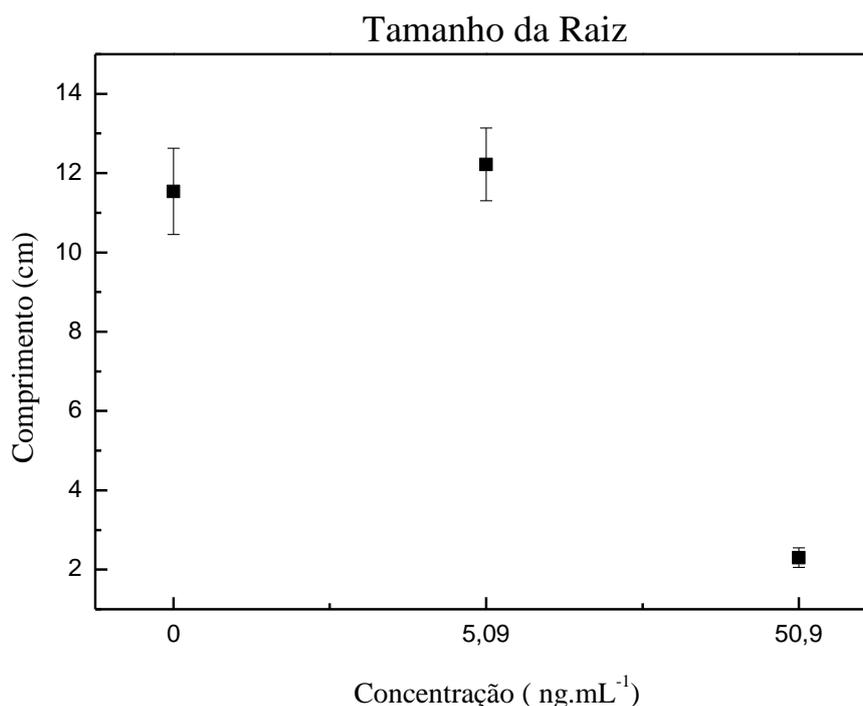


Figura 12: Valores médios de comprimento, em função do tempo, para duas concentrações de benzo(a)pireno, comparadas com as medias do comprimento da planta controle (solução nutritiva).

4.4. Fluorescência da clorofila

A figura 13 apresenta imagens de fluorescência obtidas durante a cinética, da parte superior das folhas de uma planta de *Lactuca sativa*, após 15 dias na solução nutritiva contaminada com benzo(a)pireno, para as concentrações de 0, 5,09 e 50,9 ng L⁻¹. As imagens mostram as intensidades do parâmetro QY_Max, que quantifica o rendimento máximo do fotossistema II da planta após a adaptação ao escuro. Analisando a figura é possível notar que inicialmente, em 0 horas, as plantas estão nas mesmas condições e o rendimento fotoquímico máximo é semelhante entre as folhas das plantas de todos os sistemas. No entanto essa similaridade se perde ao longo do estudo e ao final do 15º dia, o QY_Max apresenta valores maiores para a folha da amostra contaminada com benzo(a)pireno.

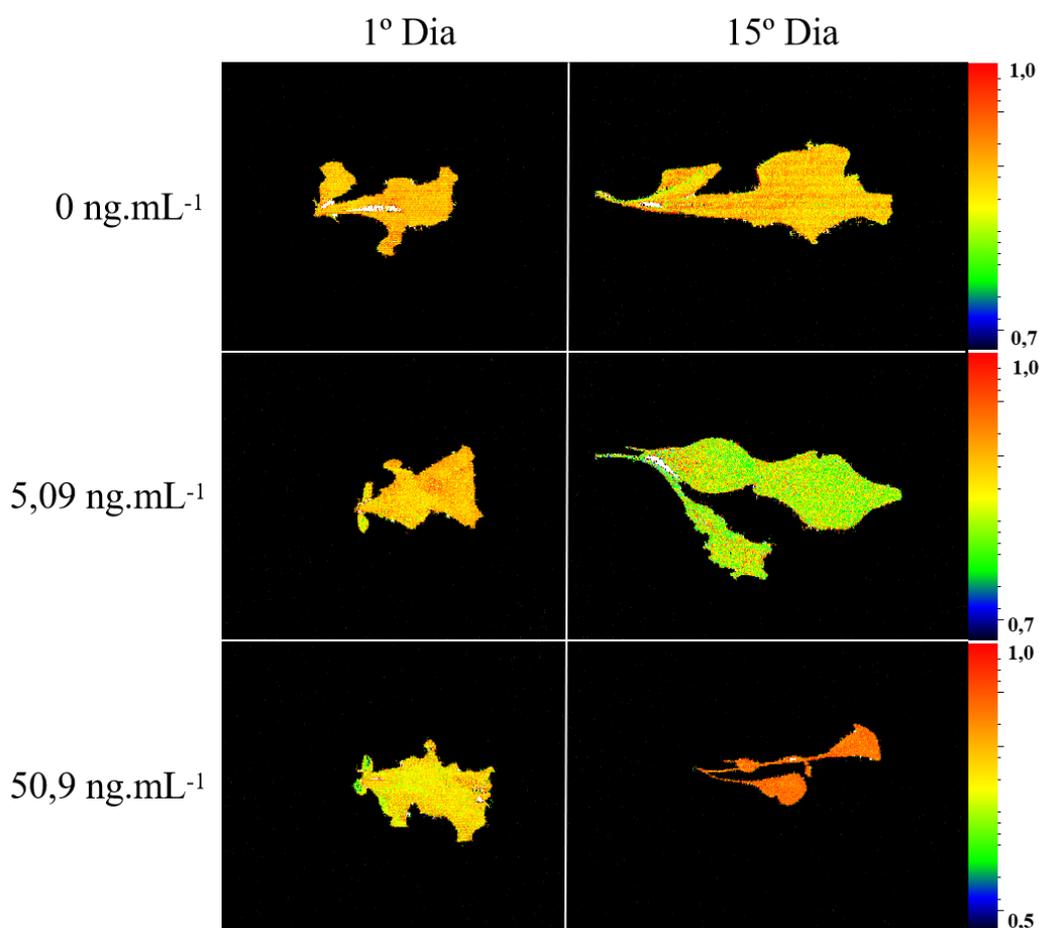


Figura 13. Imagens de QY_Max durante período de análise, obtidas por meio da cinética de fluorescência da clorofila.

A Figura 14 mostra uma análise quantitativa do comportamento médio do parâmetro QY_Max para as plantas de alface controle (sem benzo(a)pireno), para as plantas tratadas com 5,9 e também com 50,9 ng.mL⁻¹ de benzo(a)pireno. Observando a figura nota-se que no 1º dia as plantas possuem valores de QY_Max que oscilam em torno de 0,82. A literatura indica amplamente que esse é um valor coerente para plantas saudáveis, que possuem seus aparatos fotossintéticos intactos, em condições ambientais ideais [35]. Para tempos maiores, após 3º dia, esses valores de QY_Max aumentam para patamares entre 0,85 e 0,88. Esse é um fato esperado, já que as plantas continuam em crescimento e um aumento em seu vigor também é esperado. Entretanto é possível notar que as plantas tratadas com benzo(a)pireno apresentaram valores de QY_Max sempre maiores que os da plantas controle, após 3º dia.

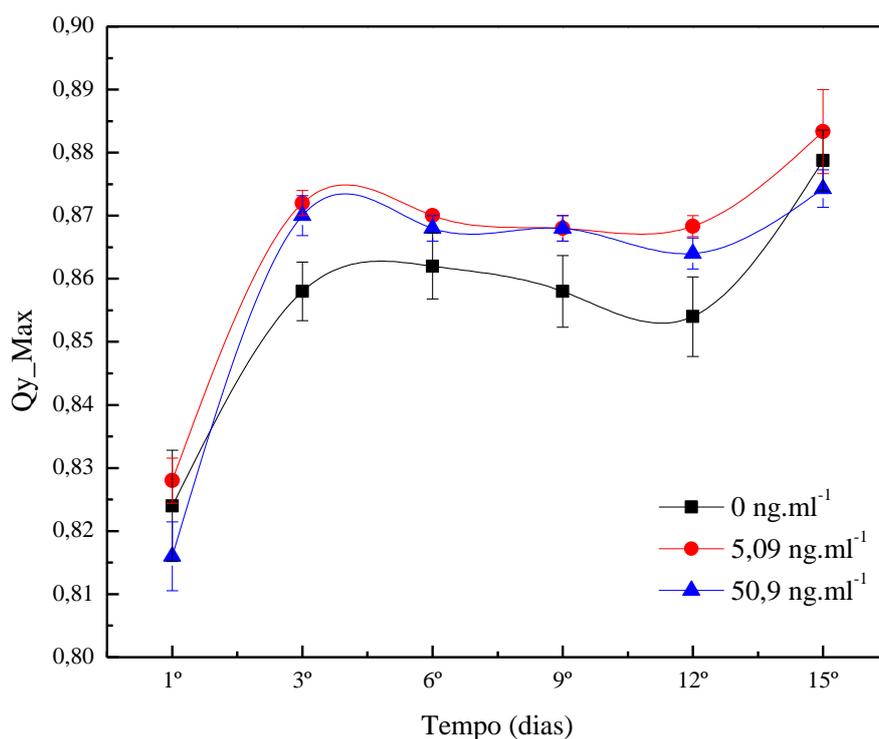


Figura 14. QY_Max, média de 5 plantas de *Lactuca sativa*, em função do tempo, para as diferentes concentrações.

Na Figura 15 são apresentadas imagens de FV/Fm_Lss, que analisa a eficiência do fotossistema II no estado estacionário de adaptação à luz. As imagens foram obtidas pela cinética de fluorescência da clorofila *a* e foram coletadas da parte superior das folhas de uma planta de *Lactuca sativa* para as concentrações de 0, 5,09 e 50,9 ng L⁻¹ do HPA benzo(a)pireno, para o 1° dia e o 15° dia de análise. Os valores de FV/Fm_Lss parecem oscilar no tempo, pois no 15° dia sua intensidade se mostra menos evidente, para ambos os tratamentos. Entretanto, novamente, os valores para a planta contendo 50,9 ng.mL⁻¹ de benzo(a)pireno são maiores que os da planta controle.

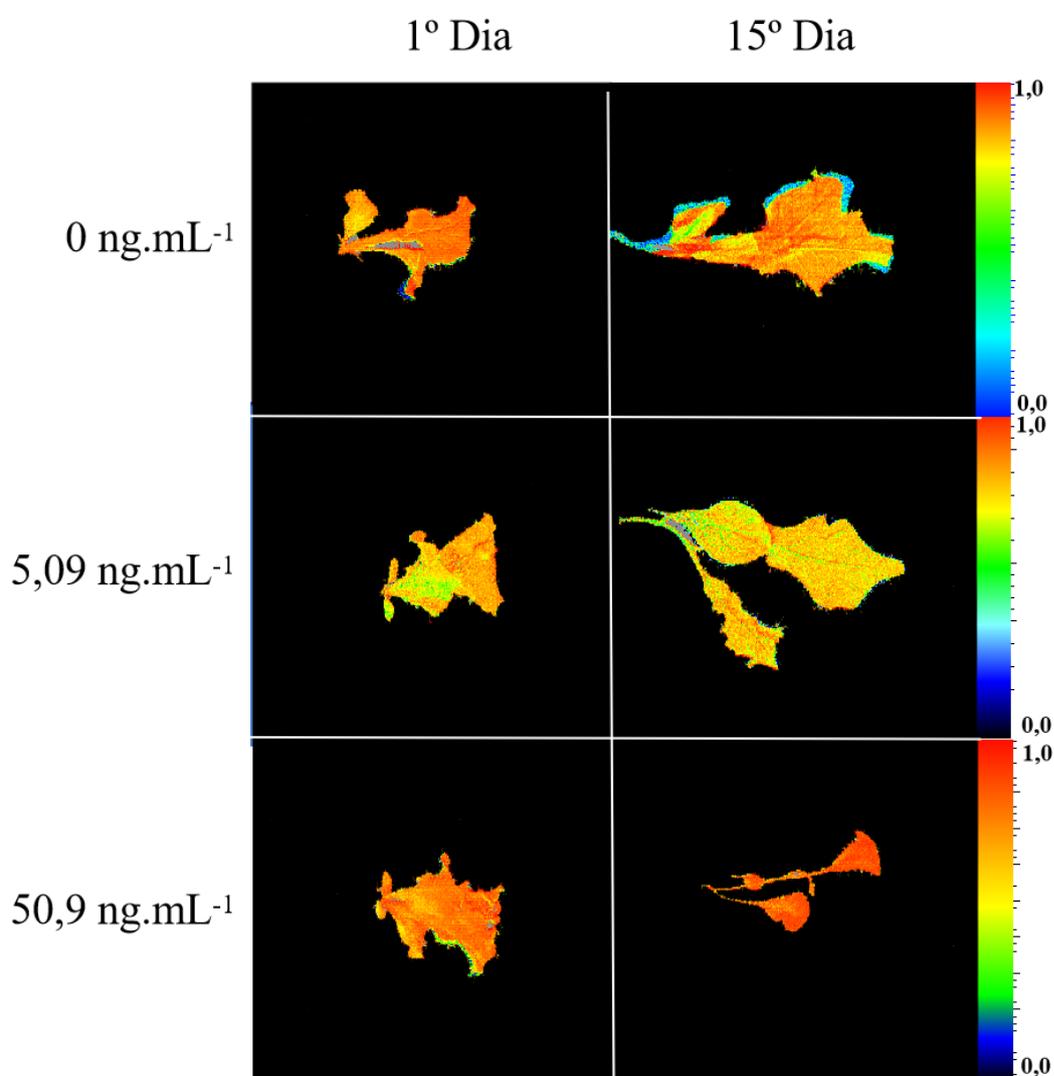


Figura 15. Imagens de FV/Fm_Lss durante período de análise, obtidas por meio da cinética de fluorescência da clorofila.

A análise do comportamento médio do parâmetro Fv/Fm_Lss, avaliado em cinco plantas estudadas em função da concentração do HPA benzo(a)pireno, são apresentados na figura 16. Pode-se notar que os valores de Fv/Fm_Lss para as duas concentrações analisadas, de 5,09 e 50,9 ng.mL⁻¹, se mantiveram estatisticamente maiores quando comparados à amostra controle até o 13º dia de estudo, assim como visto na análise do parâmetro QY_Max, apresentado anteriormente. No entanto para a concentração de 50,9 ng.mL⁻¹ observa-se que houve um aumento no parâmetro até o 9º dia e após este período houve uma redução, sendo que no 15º dia os valores apresentados do parâmetro foram menores que a amostra controle.

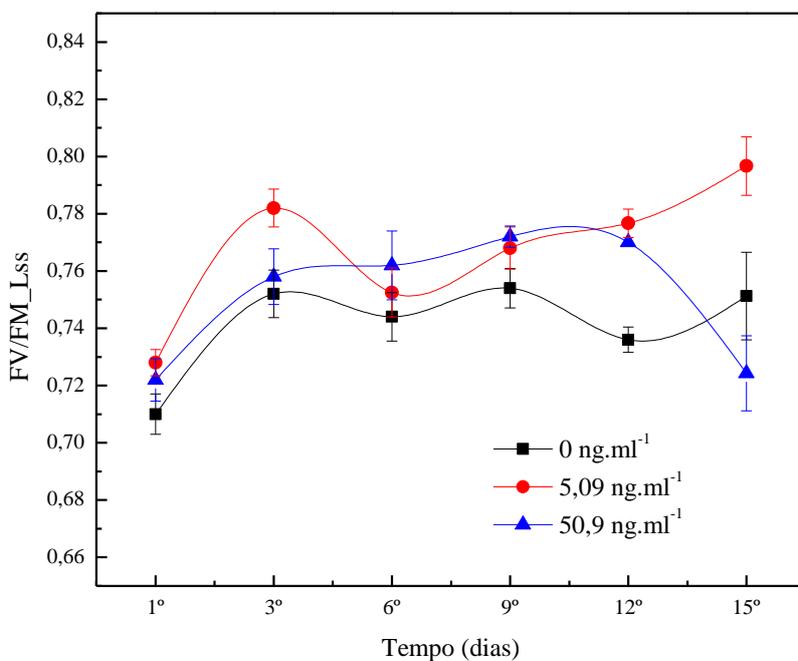


Figura 16. Fv/Fm_Lss, média de 5 plantas de *Lactuca sativa*, em função do tempo, para as diferentes concentrações de Benzo(a)pireno.

As análises do parâmetro NPQ_Lss (que é a supressão não fotoquímica, ou seja, a parcela de energia dissipada por vias não-fotoquímicas) no último pulso saturante de luz no estado estacionário de adaptação à condição de luminosidade, são apresentadas a seguir. A Figura 17 mostra as imagens contendo as intensidades de NPQ_Lss obtidas através da

cinética de fluorescência da clorofila *a*, na parte superior das folhas de uma planta de alface controle bem como nas folhas de uma planta tratada com 5,09 e 50,9 ng.mL⁻¹ de benzo(a)pireno, para o 1º dia e 15º dia de exposição ao poluente. Nas figuras, observa-se uma tendência de redução nos valores de NPQ_Lss em função da presença do benzo(a)pireno.

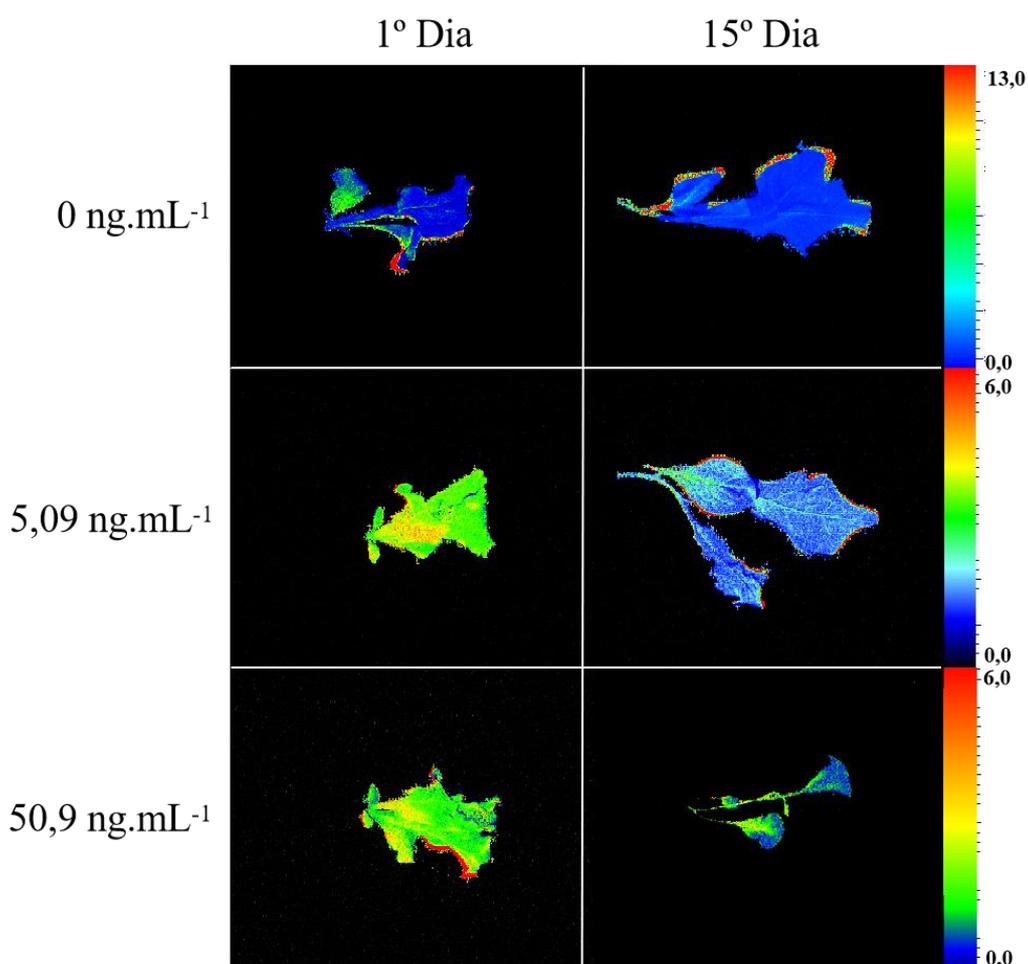


Figura 17. Imagens de NPQ_Lss durante período de análise, obtidas por meio de imagem de fluorescência da clorofila.

A Figura 18 apresenta os valores médios do parâmetro NPQ_Lss para as plantas de alface controle, para as plantas tratadas com 5,09 e também com 50,9 ng.mL⁻¹ do HPA benzo(a)pireno em função do tempo de exposição. Novamente, é possível averiguar que os valores de NPQ_Lss sofrem variação no decorrer do experimento. No entanto, para as

plantas com benzo(a)pireno, acontece uma redução nesse parâmetro no 12º dia, quando comparadas às plantas controle.

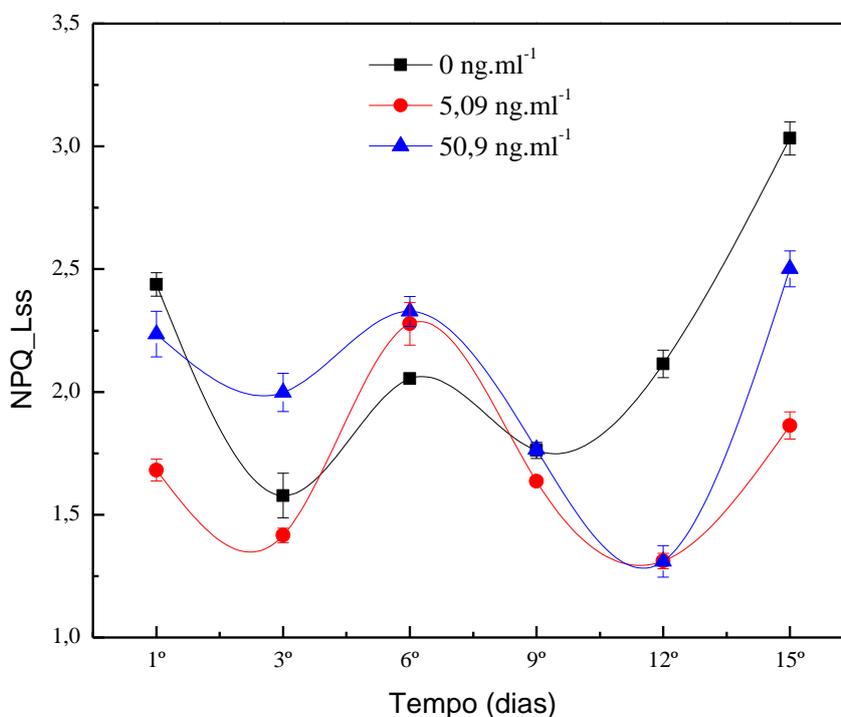


Figura 18. NPQ_Lss, média de 5 plantas de *Lactuca sativa*, em função do tempo, para as diferentes concentrações de benzo(a)pireno.

4.5 Análise da Raíz da *Lactuca sativa*

A fim de avaliar onde está presente o HPA benzo(a)pireno colocado na solução nutritiva fez uma análise complementar com as raízes das plantas de alface plantadas e utilizadas nas caracterizações dessa pesquisa. Para essas análises utilizou-se o processo de extração da raiz baseando-se na metodologia proposta por Richards & Thompson [57].

A figura 22 mostra o gráfico do espectro de emissão dos HPA benzo(a)pireno presente na solução composta pela raiz da alface, obtido por espectroscopia de fluorescência sincronizada. Pela figura observa-se o pico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda para o B(a)P em 364 nm, indicando que o

benzo(a)pireno colocado na solução nutritiva para a realização da pesquisa se encontra presente na raiz da alface.

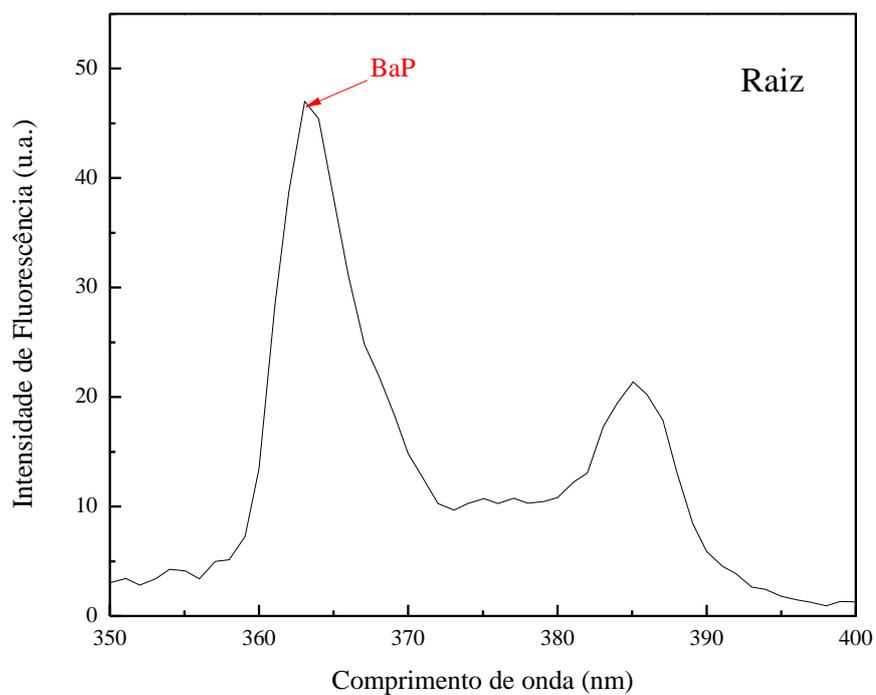


Figura 19. Espectros de emissão do HPA benzo(a)pireno na raiz da *Lactuca sativa*.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÃO

Os resultados experimentais obtidos sugerem que o HPA benzo(a)pireno é capaz de induzir alterações significativas no comportamento fisiológico bem como na morfologia das plantas de alface, contudo somente em altas concentrações. Os estudos sobre o desenvolvimento radicular, por exemplo, forneceram informações suficientes para concluir que a morfologia externa das plântulas, bem como das plantas da hortaliça em questão, pode ser drasticamente comprometida em função da presença do HPA. Os resultados indicam ainda, que a técnica de cinética da fluorescência da clorofila por imagem se mostra eficiente na detecção das alterações fisiológicas provocadas pelo HPA benzo(a)pireno em plantas de alface.

Contudo, baixas concentrações de HPA experimentais, que não significam que sejam baixas para influenciar a saúde humana, não foram detectadas diferenças significativas no desenvolvimento das plantas. Tais resultados servem de alerta, pois nota-se que o HPA possui interação com o sistema, porém em concentrações baixas não alteram o desenvolvimento das plantas de modo que seja perceptível sua influência.

REFERÊNCIAS e NOTAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] THOMAS, V.L. **Avaliação da Contaminação da água e do solo por coliformes em área adjacente a aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS) no município de Três Passos – RS**. Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico Evento: XXI Jornada de Pesquisa. Três Passos- RS. 2016.
- [2] Plano Nacional de Recursos Hídricos – Secretaria de Recursos Hídricos do Ministério do Meio Ambiente.
- [3] SILVA, A. J. C. **Currais Novos-RN e a problemática hídrica sob a ótica educacional como fator transformador dessa realidade**. Dissertação para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. CAICÓ-RN. 2017.
- [4] SOARES, I.M.N., BRARYMI, T.O.L., & PALHARES, J.M. **A distribuição de água no município de Oiapoque – AP, Brasil**. Boletim Amazônico de Geografia (ISSN: 2358-7040 - on line), Vol. 02, n. 04, p. 34-44. Belém. 2015.
- [5] RIBEIRO, L. G. G., ROLIM, N. D. **Planeta água de quem e para quem: uma análise da água doce como direito fundamental e sua valoração mercadológica**. Revista Direito Ambiental e Sociedade, Vol. 07, n. 01, p. 7-33. 2017.
- [6] ROCHA, S, M; NISHIO, F, Y. **Contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Mananciais: evidências de risco à saúde no Município de São Paulo**. InterfacEHS – saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade. Vol. 11 n° 1, Junho 2016, São Paulo.
- [7] ROSA, L. DOS S. **Determinação de HPA`s no sistema fluvial do município de Dourados**. 2017. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, 2017.
- [8] NAÇÕES UNIDAS BRASIL. Disponível em < <https://nacoesunidas.org/onu-45-bilhoes-de-pessoas-nao-dispoem-de-saneamento-seguro-no-mundo/>. > visitado em 17 de Maio de 2019 às 09:53.
- [9] SPERLING, M, V. **Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. Ed – Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, p. 15-27, 2005.
- [10] WU, B; ZHANG, Y; ZHANG, X; CHENG, S. **Health risk from exposure of organic pollutants through drinking water consumption in Nanjing, China**. Bull Environ Contam Toxicol, 84: 46-50, 2010.

- [11] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for drinking-water quality**, 2nd ed. Geneva, 1998.
- [12] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Polynuclear aromatic hydrocarbons in drinking water**. Geneva, 2003.
- [13] LI, Z; LIU, Y; YANG, X; XING, Y; TSAI, C; WANG, Z; YANG, Q; YANG, R. T. **Desorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Mesoporous Sorbents: Thermogravimetric Experiments and Kinetics Study**. Indústria & Engineering Chemistry Research, 2016.
- [14] SODRÉ, S. DO S. V. **Desenvolvimento metodológico e avaliação de contaminação por HPAs em sedimentos da Baía de Guajará – PA**. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Pará, Instituto de Geociências, Programa de Pós-Graduação em Geologia e Geoquímica, Belém, 2014.
- [15] EVANGELISTA, C. DO C. P. **Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência na investigação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em testemunhos sedimentares**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Pará, Instituto de Geociências, Programa de Pós-Graduação em Geologia e Geoquímica, Belém, 2013.
- [16] MEIRE, R. O; AZEREDO, A. T.; MACHADO, P. M. **Aspectos Eco toxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos**. Oecol. Bras. Vol. 11 [2], 188-201, 2007.
- [17] SOUSA, C. L R. **Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água e material particulado em suspensão na Baía de todos os Santos e Aratu**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal da Bahia, Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa, Bahia, 2016.
- [18] RODRIGUES, J. M. **Estudo de Viabilidade da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada para Identificação Simultânea de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Matrizes Líquidas**. Dissertação para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD. 2013.
- [19] CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 67(1):1-27, 2008.
- [20] AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**. USA, Disponível em <

<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=13&po=0> > visitado em 22 de Novembro de 2018.

[21] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) - Air Quality Guidelines**. WHO Regional Office for Europe. Copenhagen, p. 24, 2000.

[22] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Benzo(a)pyrene (B(a)P) - TEACH Chemical Summary**. U.S. EPA, 2006. Disponível em < <http://www.epa.gov/teach/>. > visitado em 02 de Dezembro de 2018.

[23] OLIVEIRA, R. A. N. **Determinação dos Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos Pireno e Bero[a]Pireno em Amostras de Água com Aplicação da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência sincronizada com Diferentes extrações**. Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD. 2015.

[24] FREIRE, M. M. **Avaliação dos Efeitos da contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Peixes (Genidens genidens) do Litoral do Estado do Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Geociências para a obtenção do grau de Doutor da Universidade Federal Fluminense. Niterói –RJ. 2015.

[25] NEFF, J.M. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment – Sources, Fates and Biological Effects**. London: Applied Science Publishers LTD, 1979.

[26] RESENDE, L, L. **Monitoramento de Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos e n-alcanos em amostras de água e tecidos de peixe da Baía de Guanabara –RJ**. LABMAM- Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais. Departamento de Química – PUC RIO, 2012.

[27] BARROSO, H.S. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em organismos marinhos da Baía do Almirantado, Península Antártica**. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto Oceanográfico da para a obtenção do grau de Doutor da Universidade São Paulo. São Paulo-SP. 2010.

[28] WU, C. **Concentrations and potential health hazards of polycyclic aromatic hydrocarbon in shallow groundwater of a metal smelting area in Southeastern China**. Science of The Total Environment. Vol 569-570, p. 1561 – 1569. 2016.]

[29] LUCAS, J. **Effects of Pyrolytic and Petrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on swimming and Metabolic Performance of Zebrafish Contaminated by Ingestion**. ScienceDirectEcotoxicology and EnvironmentalSafety, Vol. 132, p. 145-152, 2016.

- [30] NEIL, I. K.; FISHBEIN, K.; INTERN. J. **Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitratos (NHPA): uma revisão metodológica.** Revista Química Nova. Vol. 23, n. 6, 765 -773, 2000.
- [31] WANG, D. Q. et al. **Polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in fish from Taihu Lake: Their levels, sources, and biomagnification.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 82, 63-70, 2012.
- [32] MIZUKAWA, A. **Avaliação de hidrocarbonetos no litoral do Paraná, através de análises de HPAs E *n*-alcanos no sedimento e de alguns parâmetros abióticos na água.** Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR. 2012.
- [33] SILVEIRA, M. P. **Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios.** Jaguariúna:Embrapa Meio Ambiente, 2004.
- [34] THOMAS, J. D. **The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems.** *Freshwater Biology*. Vol. 50, p. 743-749, 1999.
- [35] JIANG, F.; LEE, F.; SEM-CHUN, W.; XIAORU, D. D. The application of excitation/emission Matrix spectroscopy combined with multivariate analysis for the characterization and source identification of dissolved organic matter in seawater of Bohai Sea, China. *Marine Chemistry*. V. 110, p. 109-119, 2008.
- [36] ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-química.** 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2004. v. 2.
- [37] BAKER, N. R. **Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo.** In: (Ed.). *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 89 - 113, 2008.
- [38] KOBORI, H.; TSUCHIKAWA, S. **Time-resolved principal component imaging analysis of chlorophyll fluorescence induction for monitoring leaf water stress.** *Applied Spectroscopy*, v. 67, n. 6, p. 594 - 599, 2013.
- [39] ROUSSEAU, C. et al. **High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis.** *Plant Methods*, V. 9:17, 2013.
- [40] LI, Q. et al. **Dynamic changes in photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Nicotiana tabacum* infested by *Bemisia tabaci* (Middle East-Asia Minor 1) nymphs.** *Arthropod-Plant Interactions*, v. 7, n. 4, p. 431 - 443, 2013.
- [41] FALCO, W. F. **Avaliação das Alterações Fisiológicas em Plantas de *Vicia faba* induzidas por nanopartículas de prata.** Tese (Doutorado em Biotecnologia e

Biodiversidade) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, 2017.

[42] SANTOS, E. S. **Avaliação dos efeitos de nanopartículas metálicas de prata e óxido de cobre na germinação das sementes de *Sebasnia virgata* – (FADACEAE)**. 2018. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

[43] MURCHIE, Erik H.; LAWSON, Tracy. **Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications**. Journal of experimental botany, p. ert208, 2013.

[44] CHANG, R. K. et al. **The Research of Disease Detection Method of Greenhouse Cucumber Leaf Based on Chlorophyll Fluorescence Analysis**. Universal Journal of Agricultural Research, p. 76-80, 2015.

[45] SU, Lingye et al. **A novel system for evaluating drought–cold tolerance of grapevines using chlorophyll fluorescence**. BMC plant biology, v. 15, n. 1, p. 82, 2015.

[46] KALAJI, Hazem M. et al. **Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues**. Photosynthesis research, v. 122, n. 2, p. 121-158, 2014.

[47] WANG, Lifen et al. **Effects of silver nanoparticles on seed germination and seedling growth of radish (*Raphanus Sativus L.*)**. In: 2nd International Conference on Civil, Materials and Environmental Sciences. Atlantis Press, 2015.

[48] NAIR, P. M. G.; CHUNG, I. M. **The responses of germinating seedlings of green peas to copper oxide nanoparticles**. Biologia Plantarum, Volume 59, p. 591–595, 2015.

[49] FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura – Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2º edição revista e ampliada. Viçosa: UFV, 412 p. 2003.

[50] FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de Olericultura: Cultura e comercialização de hortaliças**. 2 ed. São Paulo: E. Ceres, v.2. p. 357, 1982.

[51] RICARTE, F. da S., ROCHA, A. B. F., SOUSA, J. B. G., ROSA, S. P. de S., FILHO, A. A. de O. **Análise parasitológica das amostras de alface (*lactuca sativa*) comercializadas em um município do nordeste brasileiro**. Anais CONACIS - I CONGRESSO NACIONAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – 2014 – Cajazeira, PB.

[52] BARROS, T. M. P; MOREIRA, W. M. Q; CAMELO, A. D. **Estudo da literatura sobre as metodologias de produção e cultivo da alface**. Revista Fafibe on-line, Bebedouro SP, p. 26-34, 2014.

[53] FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. **Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes**. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, junho 2002.

[54] FERNANDES, P.C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; MARQUES, M.O.M. **Cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido**. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 22, n. 2, p. 260-264, abril-junho 2004.

[55] LAKOWICZ, J, R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. Ed. Springer, 2006.

[56] CARVALHO, J. C. **Uso da Técnica de espectroscopia para a análise da influência de HPA'S no desenvolvimento de hortaliças**. Defesa de qualificação de mestrado da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, 2019.

[57] FALCO, W. F. **Aplicação da fluorescência da clorofila a induzida por luz laser no processo de caracterização da interação nanopartícula-planta**. 2017. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados. 2012.