



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA CELULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

PATRÍCIA GOMES LIMA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE GIRASSOL (*Helianthus annuus*) NA
REMEDIAÇÃO DE EFLUENTES CONTAMINADOS POR CORANTES TÊXTEIS**

FORTALEZA

2017

PATRÍCIA GOMES LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE GIRASSOL (*Helianthus annuus*) NA REMEDIAÇÃO
DE EFLUENTES CONTAMINADOS POR CORANTES TÊXTEIS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr.^a Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa

Coorientador: Me. João Xavier da Silva Neto

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L71a Lima, Patrícia Gomes.

Avaliação do potencial de girassol (*Helianthus annuus*) na remediação de efluentes contaminados por corantes têxteis / Patrícia Gomes Lima. – 2017.

65 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.

Coorientação: Prof. Me. João Xavier da Silva Neto.

1. Fitorremediação. 2. Girassol. 3. Corantes têxteis. I. Título.

CDD 661

PATRÍCIA GOMES LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE GIRASSOL (*Helianthus annuus*) NA REMEDIAÇÃO
DE EFLUENTES CONTAMINADOS POR CORANTES TÊXTEIS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa

Coorientador: Me. João Xavier da Silva Neto

Aprovada em: 29 /11 /2017

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Me. Tiago Deiveson Pereira Lopes
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Fabiano de Moura Teixeira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Izabel e Dorival, e a toda a minha família pelo apoio e incentivo durante toda essa jornada.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa por ter me acompanhado durante todos esses anos, desde a minha primeira experiência de iniciação científica, por todo o aprendizado a mim proporcionado e pela paciência e alegria de sempre.

Ao meu coorientador, Me. João Xavier da Silva Neto, por toda a ajuda, conselhos e ensinamentos.

Ao Me. Tiago Deiveson Pereira Lopes e Dr. Fabiano de Moura Teixeira, por sua disponibilidade em compor a banca examinadora.

Ao meu amigo, Bruno, parceiro de laboratório, por compartilhar essa jornada até a graduação.

A todos os meus colegas de laboratório, por toda a ajuda, pelos esclarecimentos, pela convivência e companheirismo.

Aos meus amigos, por sempre torcerem por mim e me apoiarem.

A todos que de alguma forma contribuíram com a minha formação acadêmica e execução deste trabalho.

“A ciência, meu rapaz, é feita de erros,
mas de erros que é bom cometer, já que
conduzem pouco a pouco à verdade.”

(Júlio Verne, Viagem ao Centro da Terra)

RESUMO

O crescente aumento da preocupação com o meio ambiente acarretou o desenvolvimento de alternativas *environmental friendly* para o tratamento e recuperação de áreas contaminadas. Pode-se citar como um desses tratamentos, a fitorremediação, técnica que se baseia na utilização de plantas com capacidade de acumular, degradar ou transformar diversos poluentes. O girassol (*Helianthus annuus*) aparece como um potencial agente fitorremediador, devido ao seu já conhecido potencial de remediar áreas contaminadas, principalmente com metais, e a sua importância econômica na produção de biodiesel. Foi testada a capacidade da planta *H. annuus* de descolorir soluções dos seguintes corantes: Remazol Azul RGB, Levafix Laranja E3-GA, Astrazon Vermelho, Mordente Laranja 1, Remazol Marinho e Telon Turquesa. Houve 87% de descoloração da solução do corante Astrazon Vermelho, no período de 48 horas, sendo a taxa de 100% de descoloração atingida com 7 dias. Análises de cortes histológicos dos tecidos da raiz e caule mostraram que a planta é capaz de acumular esse corante nesses tecidos. Também foram analisadas as variações nas atividades das enzimas peroxidase, lacase, catalase e superóxido dismutase, nos tecidos vegetais da raiz e folha das plantas cultivadas em contato com os corantes. A maioria dessas enzimas apresentou sua atividade induzida pela presença do corante, indicando que os corantes são responsáveis por causar estresse na planta, devido a sua toxicidade. Essa toxicidade também foi testada, em náuplios de *Artemia salina*, sendo ela diminuída nos corantes Remazol azul, Levafix laranja e Mordente laranja, após o tratamento com plantas de *H. annuus*. Entretanto, ainda são necessários mais testes para avaliar o potencial biorremediador do girassol.

Palavras-chave: Fitorremediação. Girassol. Corantes têxteis.

ABSTRACT

The growing increase of concern for the environment issues has led to the development of environmentally friendly alternatives for the treatment and recovery of contaminated sites. One can cite as a treatment, the phytoremediation technique that is based on the use of plants capable of accumulating, degrading or transforming various pollutants. Sunflower (*Helianthus annuus*) appears as a potential phytoremediation agent, due to its already known potential to treat contaminated areas, mainly with metals, and its economic importance in the production of biodiesel. The ability of the plant *H. annuus* to discolor solutions was evaluated, testing the following dyes: Remazol Blue RGB, Levafix Orange E3-GA, Astrazon Red, Mordant Orange 1, Remazol Marine and Telon Turquoise were tested. There was 87% discoloration of the solution of the dye Astrazon Red, in the period of 48 hours, reaching 100% of discoloration with 7 days. Histological analysis of the root and stem tissues shows that the plant is able to accumulate this dye in these tissues. The activities of the enzymes peroxidase, laccase, catalase and superoxide dismutase enzymes were evaluated in the root and leaf tissues of plants grown in contact with dye. Most of the enzymes showed that their activity was induced by the presence of the dye, indicating that the dyes are responsible for causing stress in the plant due to its toxicity. This toxicity was also tested in nauplii of *Artemia salina*, being decreased in the blue Remazol, Levafix orange and Mordante orange dyes after treatment with *H. annuus* plants. Further tests are still needed to assess the sunflower bioremediator potential.

Keywords: Phytoremediation. Sunflower. Textile dyes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do corante preto natural I (hematoxilina).....	15
Figura 2. Estrutura molecular do corante ácido violeta 43.....	16
Figura 3. Estrutura molecular do corante direto azul 86 (telon turquesa).....	16
Figura 4. Estrutura molecular do corante azo solvente amarelo 72.....	17
Figura 5. Estrutura molecular do corante dispersivo vermelho 1.....	17
Figura 6. Estrutura Molecular do corante de enxofre preto 1.....	18
Figura 7. Estrutura Molecular do corante levafix laranja E3-GA (reativo Laranja 64)....	18
Figura 8. Estrutura Molecular do corante remazol marinho (reativo azul 203).....	18
Figura 9. Estrutura Molecular do corante astrazon amarelo (básico amarelo 21).....	19
Figura 10. Estrutura Molecular do corante astrazon vermelho (básico vermelho 46)....	19
Figura 11. Estrutura Molecular do corante mordente laranja 1.....	19
Figura 12. Análise qualitativa da capacidade de descoloração de soluções de corantes têxteis (20 mg/L) por plantas de <i>H. annuus</i> durante o período de 15 dias.....	39
Figura 13. Perfil eletroforético dos extratos proteicos de exsudatos, raízes e folhas e de <i>H. annuus</i>	43
Figura 14. Anatomia dos tecidos da raiz de <i>H. annuus</i> após tratamento com o corante Astrazon Vermelho durante diferentes intervalos de tempo.....	47
Figura 15. Anatomia dos tecidos do caule Anatomia dos tecidos da raiz de <i>H. annuus</i> após tratamento com o corante Astrazon Vermelho durante diferentes intervalos de tempo.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Descoloração (%) de soluções de corantes têxteis (20 mg/L) por plantas de <i>H. annuus</i> durante o período de 15 dias	37
Gráfico 2. Perfil de descoloração (%) natural de soluções de corantes têxteis (20 mg/L) durante o período de 15 dias.....	38
Gráfico 3. Atividade da peroxidásica de raízes e folhas de plantas de <i>H. annuus</i> tratadas ou não com corantes têxteis (20 mg/L) após o período de 15 dias.....	43
Gráfico 4. Atividade da catalase de raízes e folhas de plantas de <i>H. annuus</i> tratadas ou não com corantes têxteis (20 mg/L) após o período de 15 dias.....	44
Gráfico 5. Atividade da lacase de raízes e folhas de plantas de <i>H. annuus</i> tratadas ou não com corantes têxteis (20 mg/L) após o período de 15 dias	45
Gráfico 6. Atividade da superóxido dismutase de raízes e folhas de plantas de <i>H. annuus</i> tratadas ou não com corantes têxteis (20 mg/L) após o período de 15 dias.....	46
Gráfico 7. Teste de toxicidade das soluções de corantes têxteis em náuplios de <i>Artemia salina</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa fresca (g) de plantas *H. annuus* após tratamento com corantes têxteis.....35

Tabela 2. Quantidade de proteínas (mg) por massa fresca de tecido (g) de plantas *H. annuus* após tratamento com corantes têxteis.....36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Indústria Têxtil	13
1.2 Corantes	14
1.2.1 Classificação dos Corantes	15
1.2.2 Impactos ambientais	19
1.3 Biorremediação	21
1.3.1 Fitorremediação	21
1.3.2 Enzimas	23
1.4 <i>Helianthus annuus</i> (Girassol)	25
1.5 Perguntas de Partida	26
1.6 Hipótese	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MATERIAL	28
3.1 Sementes de <i>H. annuus</i>	28
3.2 Reagentes químicos e outros materiais	28
3.3 Preparo da areia	28
4 MÉTODOS	29
4.1 Preparo e germinação das sementes	29
4.2 Cultivo hidropônico	29
4.3 Teste de degradação de corantes	29
4.4 Avaliação dos parâmetros fisiológicos	30
4.5 Obtenção do extrato bruto e exsudado	30
4.6 Dosagem Protéica	31
4.7 Atividades enzimáticas	31
4.7.1 Guaiacol peroxidase - GPX (EC 1.15.1.1)	31
4.7.2 Catalase - CAT (EC 1.11.1.6)	31
4.7.3 Dismutase do superóxido – SOD (EC.1.15.1.1)	32

4.7.3 Lacase (EC.1.10.3.2)	32
4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE- SDS)	33
4.9 Cortes histológicos	33
4.10 Análise de toxicidade	34
4.11 Análises estatísticas	34
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Indústria têxtil

As atividades têxteis tiveram início há muitos séculos, podendo ser considerado um dos setores mais antigos, perdendo somente para a agricultura (KUMAR e SUGANYA, 2017). A razão da produção de tecido ser uma arte tão antiga está ligada ao fato de que os tecidos são itens de necessidade básica humana. É tão importante quanto a necessidade por alimentação e abrigo. Com o passar do tempo, essa atividade foi ganhando cada vez mais importância, desempenhando papel fundamental na Revolução Industrial (HARLEY, 2012).

No contexto nacional, antes da chegada dos colonizadores portugueses, a produção artesanal de tecidos de algodão já era praticada pelos índios, com o intuito de produzir vestimentas e utensílios, como redes (COSTA et al., 2000; MATHIAS, 1988; STEIN, 1979). Como indústria, esse setor já tem quase 200 anos, com um desenvolvimento significativo por volta do final do século XIX. Tal desenvolvimento continuou no início do século XX, atingindo seu auge na década de 40, quando o Brasil chegou a ser o segundo maior produtor têxtil mundial. Tal fato se deve aos diversos avanços tecnológicos e a recessão industrial dos países desenvolvidos, devido a Segunda Guerra Mundial (FUJITA et al., 2015). Em 1945, ao final da guerra, as indústrias brasileiras chegaram a produzir mais de um bilhão de metros de tecidos (COSTA et al., 2000).

A indústria têxtil representa uma importante parcela da economia mundial, movimentando mais de US\$200 bilhões anuais. Os principais países exportadores do setor têxtil e de roupas em 2015 foram China (38,37%), Índia (5,21%), Itália (4,40%) e Alemanha (4,18%) (United Nations Commodity Trade Statistics Database, 2017). Além de importante na economia de diversos países, esse setor também desempenha um papel crucial na economia brasileira. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (Abit), em 2016, esse setor foi o segundo maior gerador de

empregos da indústria de transformação, quinto maior produtor têxtil do mundo, obtendo o valor de exportações de US\$ 1 bilhão (Abit, 2017).

1.2 Corantes

A cor do tecido é uma questão fundamental para o sucesso do produto têxtil, pois torna o tecido mais ou menos atrativo ao consumidor, gerando alto impacto na agregação de valor ao produto final, sendo às vezes até mais importante que a própria constituição do tecido (KANT, 2012). Essas substâncias com capacidade de adicionar cor são geralmente compostas por dois componentes principais: um cromóforo, responsável pela cor, e um grupo funcional, que liga o corante à fibra do tecido (VENCESLAU et al., 2008).

O primeiro registro do uso de corantes têxteis é datado de 3500 AC, nessa época os corantes de origem natural, oriundos de flores, frutas e minerais (KANT, 2012). Durante muito tempo foram utilizados somente corantes naturais, no entanto eles forneciam um espectro estreito de cores e com o aumento da demanda devido à Revolução Industrial, fez-se economicamente inviável a sua utilização (GRIFFITHS, 1990).

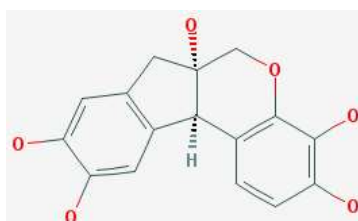
Os corantes sintéticos foram desenvolvidos em 1856 por William Henry Perkin, sendo o primeiro corante a mauveína (HUBNER, 2006). Em 1869, o primeiro pigmento natural foi duplicado sinteticamente, a alizarina, derivada da raiz da espécie *Rubia tinctorum* (BIEN et al., 2005). O desenvolvimento da indústria têxtil esteve intimamente ligado com a descoberta de novos corantes. Esta relação proporcionou durante o século XIX, a descoberta de inúmeros tipos de corantes utilizados atualmente (HUNGER, 2003).

Além da sua aplicação na indústria têxtil, os corantes também são largamente utilizados em: fármacos, alimentos, cosméticos, plásticos, tintas, insumos para fotografias e papel (GURSES et al., 2016). Com toda essa diversidade de aplicações, os corantes também possuem propriedades distintas, podendo ser classificados de diversas formas.

1.2.1 Classificação dos Corantes

Uma forma comum de classificação dos corantes é baseada na fonte de origem do material, sendo utilizadas as denominações de natural ou sintético, como já mencionado. Alguns exemplos de corantes naturais são o preto natural I (hematoxilina) (Figura 1), obtido da planta *Haematoxylum campechianum*, e amarelo natural 6 (açafraão), obtido da planta *Crocus sativus*.

Figura 1. Estrutura molecular do corante preto natural I (hematoxilina).

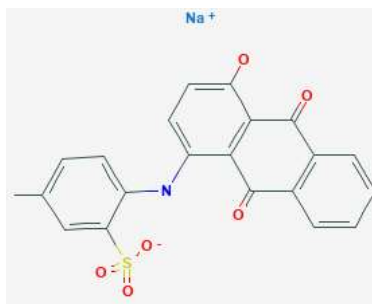


Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database; SID=125164580, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/125164580>.

Outra maneira de classificação dos corantes é segundo seu uso ou método de aplicação. As principais categorias deste grupo são: corantes ácidos, corantes diretos, corantes azóicos, corantes dispersivos, corantes de enxofre, corantes reativos e corantes básicos. Cada uma dessas classes é descrita a seguir, de acordo com o livro *Industrial Dyes – Chemistry, Properties, Applications*, de Klaus Hunger (2003).

Os corantes ácidos são caracterizados por possuírem grupos sulfônicos e serem altamente solúveis em água (Figura 2). Eles são utilizados principalmente em fibras protéicas (lã, seda) e fibras de poliamidas sintéticas. Em soluções ácidas, os grupos aminas das fibras do tecido interagem ionicamente com os grupos negativos do corante, formando uma molécula de cor insolúvel na fibra. Os corantes ácidos mais importantes comercialmente são os baseados em compostos azos, antraquinona etriarilmetano.

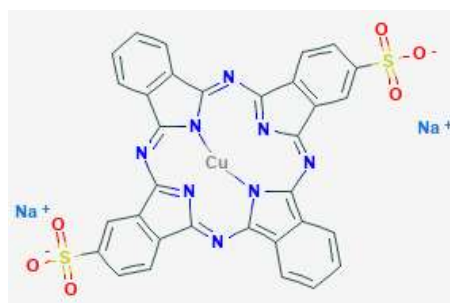
Figura 2. Estrutura molecular do corante ácido violeta 43.



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database; SID=341215284, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/341215284>.

Os corantes diretos são compostos solúveis em água, normalmente utilizados com eletrólitos (para aumentar a sua solubilidade) (Figura 3). Possuem a finalidade de tingir fibras de algodão e outras fibras celulósicas através de interações eletrostáticas. Os corantes dessa classe geralmente possuem grupos poli-azo em sua estrutura.

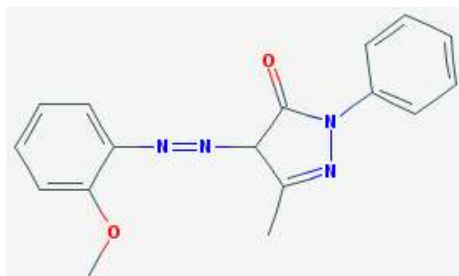
Figura 3. Estrutura molecular do corante direto azul 86 (telon turquesa).



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database; SID=254765647, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/254765647>.

Os corantes azóicos (Figura 4) são comumente formados sobre a fibra do tecido, através da combinação de um agente de acoplamento com um sal de diazônio, que resulta na formação de um corante insolúvel em água, caracterizado pela presença do grupo funcional $-N=N-$. São usados para o tingimento de celulose, principalmente de algodão. De todos os corantes, aproximadamente 60% são constituídos de compostos azo (CARLIELL et al., 1995).

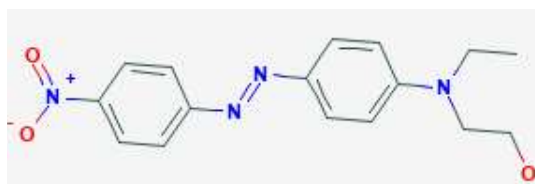
Figura 4. Estrutura molecular do corante azo solvente amarelo 72.



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database; SID=315680618, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/315680618>.

Os corantes dispersivos são soluções coloidais com baixa solubilidade em água (Figura 5). Durante o processo de tingimento no qual se usa este corante, as condições de temperatura e pressão favorecem o afrouxamento das estruturas das fibras do tecido. Com isso, o corante entra nas lacunas formadas e são absorvidas pelo tecido. Esse tipo de corante é aplicado em fibras sintéticas, como nylon, polyester e acetato.

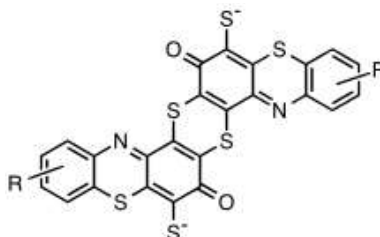
Figura 5. Estrutura molecular do corante dispersivo vermelho 1.



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database; SID=341114349, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/341114349>.

A classe dos corantes de enxofre tem como característica a formação de pontes de polissulfeto (Figura 6) após a sua aplicação no tecido, tornando-se insolúvel em água. São usados particularmente em fibras celulósicas, como algodão e rayon, conferido cores escuras (exemplo: preto e azul marinho). Esse grupo apresenta grande importância econômica, pois geram um baixo custo de produção. No entanto, ele possui poucos representantes, devido ao impacto ambiental que eles causam.

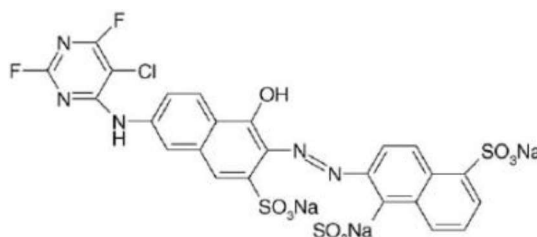
Figura 6. Estrutura Molecular do corante de enxofre preto I.



Fonte: HUNGER, 2003.

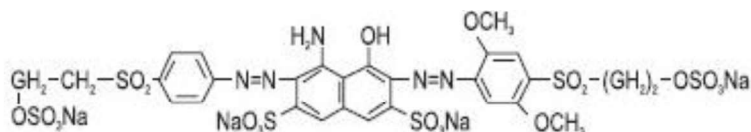
Os corantes reativos recebem esse nome, pois são capazes de formar ligações covalentes com as fibras do tecido (Figura 7 e 8). Nesse quesito eles podem ser considerados únicos, pois se tornam uma parte integral do tecido tingido, conferindo uma maior estabilidade à cor. Os principais grupos químicos presentes nessa classe são azo, trifendioxazina, ftalocianina, formazan e antraquinona.

Figura 7. Estrutura Molecular do corante levafix laranja E3-GA (reativo Laranja 64).



Fonte: KOBYA et al., 2005.

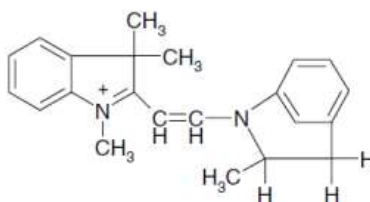
Figura 8. Estrutura Molecular do corante remazol marinho (reativo azul 203).



Fonte: ERDEN et al., 2009.

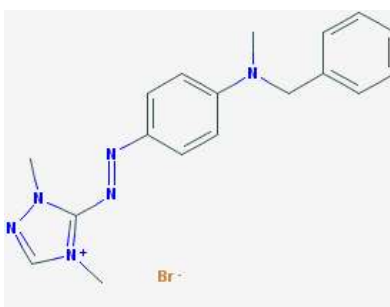
Os corantes básicos normalmente possuem um grupamento amina, responsável pela carga positiva, que caracteriza a molécula como básica (Figura 9 e 10). A interação iônica entre o corante e a fibra do tecido é a base do processo de tingimento destas moléculas. Estes corantes se ligam bem a polímeros do tipo acrílico, devido às cargas negativas deste material.

Figura 9. Estrutura Molecular do corante astrazon amarelo (básico amarelo 21).



Fonte: SULAK et al., 2006.

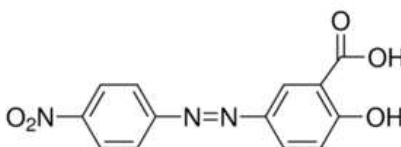
Figura 10. Estrutura Molecular do corante astrazon vermelho (básico vermelho 46).



Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChemSubstanceDatabase; SID=135116376, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/135116376>.

A classe de corantes mordente é caracterizada por conter vários locais de ligação a agentes quelantes, formando um complexo de coordenação com íons metálicos (Figura 11). Tais agentes quelantes podem ser sais de cromo, alumínio ou cobre.

Figura 11. Estrutura Molecular do corante mordente laranja 1.



Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

1.2.2 Impactos ambientais

As atividades humanas acarretam um grande impacto ao ambiente. Um dos principais causadores desse impacto é a geração de rejeitos industriais. Grande parte desses resíduos é descartada diretamente na natureza sem nenhum tratamento prévio.

Apesar de uma pequena parte destes poluentes podem ser naturalmente degradados no ambiente, muitos deles são recalcitrantes e tóxicos. Dentre estes poluentes com resistência a degradação natural, temos diversos tipos de corantes têxteis, que demoram longos períodos até sua total degradação (SOUZA et al., 2007).

A indústria têxtil é responsável por uma grande parcela na produção e descarte indevido de resíduos, sendo o processo de tingimento uma das etapas que mais contribui para a contaminação de efluentes. O processo de tingimento consiste basicamente em três etapas: montagem, fixação e tratamento final (PETERS, 1975; ALCÂNTARA et al., 1996). As duas primeiras fases são realizadas por meio de inúmeras reações químicas. Entretanto, a operação final sempre consiste de uma etapa de lavagem em banhos correntes para retirada do excesso de corante não fixado à fibra nas etapas anteriores (GUARATINI et al., 2000).

O consumo de água para o tingimento de tecidos varia de 30-50 litros/kg de tecido, dependendo do tipo de corante utilizado (KANT, 2012). Durante o processo de tingimento, 10-50% dos corantes são perdidos para o ambiente (CHEQUER, 2013). O Grupo World Bank estima que 17-20% da poluição de água são ocasionadas por resíduos industriais é proveniente do tingimento e tratamento final de tecidos (KANT, 2012).

A presença de corantes nos efluentes têxteis, mesmo em concentrações menores que 1 mg/L (em alguns casos), gera uma diminuição na capacidade de penetração da luz solar na água, devido a adição de cor na solução. Esse fato afeta diretamente o processo de fotossíntese dos organismos e o balanço aquático de oxigênio. Tais alterações resultam em impactos ecológicos e na qualidade da água para consumo (LIMA et al., 2012). Além do impacto indireto para o ser humano através da diminuição da disponibilidade de água potável, alguns corantes podem gerar impactos diretos, por meio de seus efeitos tóxicos e mutagênicos (CHEQUER, 2013). Por volta de 40% dos corantes usados mundialmente possuem um cloro orgânico ligado, sendo um composto conhecidamente carcinogênico (KANT, 2012).

Devido à grande variedade de fibras, corantes, processos auxiliares e finalizadores, se é produzido um resíduo de alta complexidade e diversidade química, que não consegue ser adequadamente tratado pelos sistemas convencionais de tratamento de esgoto (VANDEVIVERE et al., 1998). Juntamente com isso, a maioria dos corantes apresenta alta estabilidade térmica, química, a detergentes e luz (COUTO, 2009). Boa parte desta estabilidade se deve a sua origem sintética e estrutura aromática complexa dessas moléculas, tornando-as mais recalcitrantes à biodegradação (FORGACS et al., 2004; PRZYSTAS et al., 2012).

1.3 Biorremediação

A preocupação com os impactos ambientais produzido pelo homem induziu o ser humano a tentar minimizar este efeito indesejado por meio de diferentes métodos. Um deles é a diminuição na geração de compostos antropogênicos descartados na natureza. Os tratamentos físico-químicos são o principal método utilizado pelo ser humano para tratar os agentes poluentes (adsorção, precipitação, oxidação química, fotodegradação e filtração de membrana). Todos esses métodos possuem sérias restrições como alto custo, formação de subprodutos tóxicos e alto consumo de energia (STOLZ, 2001). Essas restrições levam a constante busca por processos mais eficientes e com menores custos.

Um método alternativo bem promissor é o processo de biorremediação, que se baseia na degradação biológica de compostos tóxicos, sobre condições controladas, até que se atinja um estado menos tóxico ou inócuo, geralmente com a formação de dióxido de carbono e água (BRAR et al., 2006).

A biorremediação pode ser classificada em dois tipos: *in situ* e *ex situ*. Na biorremediação *in situ* não é necessário a remoção do substrato para a realização do tratamento, normalmente realizado pela suplementação de nutrientes e oxigênio, estimulando os microrganismos locais. Já na biorremediação *ex situ* é necessário que haja uma escavação ou remoção do solo ou águas contaminadas (GOSH et al., 2005).

1.3.1 Fitorremediação

Esse método é um tipo de biorremediação, que consiste no uso de plantas que possuem a capacidade de remover, acumular ou transformar diversos poluentes presentes em ambientes como solo, água e ar (KARIGAR et al., 2011). A fitorremediação é um processo eficiente, com baixo custo econômico, não-intrusivo e com baixo efeito deletério a natureza (WILTSE et al., 1998).

Diversas plantas apresentam o potencial de recuperar diferentes ambientes contaminados, com diversos relatos, em especial, da remediação de áreas ricas em corantes têxteis (WATHARKAR et al., 2014; ZHOU et al., 2013). As plantas podem utilizar diferentes mecanismos no processo de fitorremediação de áreas contaminadas, dentre eles podem ser citados a fitoextração, fitovolatilização, fitotransformação, fitoestabilização e rizofiltração.

A fitoextração ocorre quando a planta retira compostos tóxicos do meio, através de absorção e concentração dos contaminantes na biomassa vegetal. É ideal para a aplicação em áreas em que o contaminante ocorre em baixas concentrações e próximo à superfície, ao alcance das raízes (RULKENS et al., 1998).

Os espécimes vegetais capazes de captar contaminantes do solo e liberarem eles na atmosfera na forma de gás são classificados de fitovolatilizadores. Esses vegetais possuem altos índices de transpiração, o que os ajudam a obter um resultado satisfatório na fitorremediação. Alguns exemplos de contaminantes capazes de serem volatilizados pelas plantas são os metais selênio, arsênio e mercúrio (HANSEN et al., 1998; RUGH et al., 1996).

A fitodegradação é o mecanismo pelo qual ocorre a degradação de compostos orgânicos captados pela planta, através da ação de enzimas, resultando na incorporação das moléculas produzidas por esse processo aos tecidos da planta (GHOSH et al., 2005).

Na fitoestabilização faz-se utilização das raízes e seus exsudados para evitar os processos de lixiviação, escoamento e erosão de contaminantes no solo, por meio da

limitação da mobilidade e biodisponibilidade do contaminante (BERTI e CUNNINGHAM, 2000). Isso ocorre através da sorção, precipitação, complexação ou redução da valência de metais (GHOSH et al., 2005).

O processo de rizofiltração pode ser definido pelo uso de plantas cultivadas em hidroponia, em que as raízes são utilizadas para absorver, concentrar ou precipitar compostos tóxicos de efluentes contaminados (SCHMOGER et al., 2000). As plantas mais utilizadas são as aquáticas e o processo pode ser desenvolvido *in situ* ou *ex situ* (GHOSH et al., 2005). Algumas espécies de plantas bastante utilizadas na fitorremediação são as do gênero *typha* e *azzola*, que são plantas aquáticas tolerantes a contaminantes, de rápido crescimento e com percentual de acumulação (HOODA, 2007).

A rizofiltração, no entanto, não é um processo que se restringe somente a utilização de plantas aquáticas, mas também é possível fazer a aplicação de plantas terrestres que apresentem um sistema radicular bem desenvolvido e que sejam boas acumuladoras (HOODA, 2007). Algumas das espécies terrestres que são utilizadas nesse processo são *Helianthus annuus* (DUSHENKOV e KAPULNIK, 2000) e *Phaseolus vulgaris* (PIECHALAK et al., 2002), que são exemplos de plantas eficientes no processo de acumulação de compostos inorgânicos.

1.3.2 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos que favorecem a conversão de substratos em produtos, pela diminuição da energia de ativação (KARIGAR et al., 2011). No processo de biorremediação, um dos mecanismos conversores de contaminantes em substâncias não tóxicas é intermediado por ação enzimática. As enzimas envolvidas nesse processo de transformação podem estar localizadas dentro da célula vegetal ou serem externalizadas no meio extracelular (NANNIPIERI et al., 2002). Por serem capazes de catalisar a degradação de compostos tóxicos em não tóxicos, mesmo em baixas concentrações, as enzimas possuem grande importância do ponto de vista de biorremediação (FREIRE et al, 2000).

Dos muitos tipos de enzimas existentes nas plantas, a classe das oxidoredutases merece destaque no processo de detoxificação de xenobióticos (KARIGAR et al., 2011). Dentre essas enzimas desse grupo pode-se ressaltar as peroxidases, lacases, catalases e superóxido dismutases.

As peroxidases possuem a capacidade de remover ou transformar compostos fenólicos de efluentes poluídos (HUSAIN e JAN, 2000; DURAN e ESPOSITO, 2000). Várias peroxidases originárias de diferentes espécies, possuem a capacidade de descolorir corantes têxteis comprovada, como no caso da *Ipomea palmata*, *Saccharum spontaneum* (SHAFFIQU et al., 2002), *Senna angustifolia* (ARRIETA et al., 2002) e *Momordica charantia* (AKHTAR et al., 2005). Com destaque, temos a peroxidase de *Armoracia rusticana*, que é bastante estudada e aplicada na degradação de corantes têxteis (BHUNIA et al., 2001; MOHAN et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

As lacases são enzimas que tem como substrato compostos que possuem anéis aromáticos, como fenóis e aminas aromáticas (BOURBONNAIS et al., 1997; ROBLES et al., 2000). A sua utilização em processos de descoloração de corantes têxteis é estudado, como no caso de lacases isoladas de *Phlebia tremellosa* (KIRBY et al., 2000), *Trametes hirsuta* (ABADULLA et al., 2000), *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium* (VERMA e MADAMWAR, 2002).

Por fim, a catalase e a superóxido dismutase possuem como função principal, a defesa do organismo contra modificações oxidativas no DNA, proteínas e lipídeos. A superóxido dismutase catalisa a formação de peróxido de hidrogênio a partir de espécies reativas de oxigênio, já as catalases, dismutam o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (GRIGORAS, 2017; RIBIĆ et al., 2017).

Um dos mecanismos pelo qual acredita-se que as plantas sejam capazes de recuperar áreas contaminadas, é através da produção de enzimas. A presença de contaminantes causa um estresse na planta, sendo capaz de induzir a produção de enzimas envolvidas na defesa vegetal (JOUILLI et al., 2003). Tais enzimas possuem o potencial de catalisar reações de degradação de diversos contaminantes, como de corantes têxteis.

1.4 *Helianthus annuus* (Girassol)

O *Helianthus annuus*, comumente conhecida como girassol, é uma dicotiledônea da família Asteraceae. Possui origem na América do norte, com ampla dispersão e cultivo em todos os continentes. Em relação as suas características agronômicas, é uma planta considerada bastante resistente à seca, calor e frio, o que facilita muito o seu cultivo no mundo (CASTRO et al, 1996). O *H. annuus* possui diversas utilidades, como alimentação animal, produção de biodiesel e como planta ornamental. (DICJMANN et al, 2005; SILVA et al., 2007).

Os principais países produtores de girassol são Ucrânia, Rússia e Argentina. O Brasil ainda ocupa uma posição inexpressiva na produção dessa planta, porém essa pode ser considerada uma área em expansão, já que ela representa uma boa alternativa para ser utilizada em sistemas de rotação/sucessão de cultura de grãos e devido ao aumento na demanda por biodiesel (SILVA et al, 2011).

Dentre as várias aplicações do *H. annuus*, pode-se citar sua utilidade no processo de biorremediação. Vários trabalhos já comprovaram sua capacidade de remediar áreas contaminadas com metais pesados (níquel, chumbo, zinco e cádmio) (MAKHTAR et al., 2010; NEHNEVAJOVA et al., 2006) e também por corantes têxteis (HUICHENG et al., 2012).

Com base na capacidade já comprovada de várias espécies vegetais em degradar, absolver ou detoxificar ambientes ricos em rejeitos tóxicos, como corantes têxteis, fica evidente o potencial das plantas como modelo alternativo de remediação destes ambientes. A resistência a condições adversas (calor, frio, seca) em conjunto com a capacidade de limpar áreas contaminadas com metais pesados, coloca *H. annuus* como uma espécie possivelmente capaz de ser utilizada como um biorremediador em áreas contaminadas com outros tipos de poluentes, como corantes têxteis.

1.5 Perguntas de Partida

Assim, de acordo com o que foi exposto, foram formuladas as seguintes perguntas de partida:

1. A espécie *H. annuus* apresenta a capacidade de descolorir e detoxificar corantes têxteis em ambientes aquáticos?
2. A exposição a corantes têxteis ocasionaria alteração do perfil protéico de exsudado, folhas ou raízes de *H. annuus*?
3. O tratamento de plantas de *H. annuus* com corantes têxteis seria capaz de alterar o teor de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em suas raízes e folhas?

1.6 Hipótese

Com base na reconhecida capacidade em remediar áreas contaminadas e clarificar corantes têxteis, *H. annuus* apresenta a propriedade de descolorir soluções dos corantes Remazol Azul RGB, Levafix Laranja E3-GA, Astrazon Vermelho, Mordente Laranja, Remazol Marinho e Telon Turquesa estando tal efeito relacionado com o aumento da atividade das enzimas oxidorreduções presentes na planta.

2 OBJETIVOS

Geral

1. Avaliar o potencial de fitorremediação do girassol (*Helianthus annuus*) de efluentes contaminados com corantes têxteis.

Específicos

1. Avaliar parâmetros fisiológicos;
2. Quantificar a descoloração de corantes têxteis na presença do girassol;
3. Analisar a atividade enzimática das enzimas peroxidase, catalase, lacase e superóxido dismutase nos tecidos vegetais da raiz e folha;
4. Avaliar capacidade detoxificante do tratamento sobre corantes têxteis.

3 MATERIAL

3.1 Sementes de *H. annuus*

Neste trabalho foram utilizadas sementes comerciais de *H. annuus*, obtidas em estabelecimentos especializados.

3.2 Reagentes químicos e outros materiais

Os reagentes Tris (hidroximetil) aminometano, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, Lacase, Seringaldazina, “Coomassie Brilliant Blue” R-250 e G-250 foram obtidos da Sigma Aldrich-Co (St. Louis, MO, EUA). Os marcadores de massa molecular para SDS-PAGE foram obtidos da GE HeathCare (Uppsala, Suécia). Os demais reagentes usados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3.1 Preparo da areia

Para a germinação das sementes de *H. annuus* foi utilizado areia como substrato. A areia foi peneirada e submetida a repetidas lavagens (no mínimo oito) com água, até que fossem retirados os resíduos visíveis. A areia ficou 2 a 3 dias em temperatura ambiente para completa secagem. Após este processo, o substrato foi esterilizado por meio de autoclavagem (15 minutos, 121 °C).

4 MÉTODOS

4.1 Preparo e germinação das sementes

As sementes de *H. annuus* foram inicialmente desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio 2%, por um período de 5 minutos. Em seguida, foi realizado o processo de quebra de dormência por meio de imersão em água destilada aquecida a 40 °C, por 15 minutos (Borghetti et al., 2002) . Cada semente foi colocada para germinar em recipientes individuais com areia e regadas com água destilada em dias alternados. O cultivo em substrato sólido foi realizado durante um período de quatorze dias.

4.2 Cultivo hidropônico

Após os quatorze dias do período de cultivo em areia, as plântulas foram transferidas para o cultivo hidropônico. As mudas foram retiradas do substrato sólido (minimizando os danos ao sistema radicular) e suas raízes foram lavadas com água destilada, para a retirada do excesso de areia. Após o processo de limpeza das raízes, as plantas foram então acomodadas em frasco erlenmeyer contendo solução nutritiva de Hoagland. O volume inicial de solução (250 mL) foi mantido constante por meio da adição de solução nutritiva fresca. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por sete dias para se adaptarem ao cultivo hidropônico (Huicheng et al., 2012, com modificações).

4.3 Teste de descoloração de corantes

Após o período de adaptação, as plantas foram divididas em dois grupos (n=3). O grupo controle foi acondicionado em recipientes contendo apenas solução nutritiva de Hoagland. O grupo tratado foi acondicionado em recipientes contendo solução nutritiva acrescida de corantes têxteis previamente dissolvidos (20 mg/L). Cada frasco teve o volume de meio mantido pela constante adição de solução nutritiva (na ausência e presença de corante) fresca em dias alternados. O tempo de duração do experimento foi de 15 dias.

Durante o período de execução do experimento, os frascos foram recobertos com papel alumínio para evitar fotodegradação da solução e crescimento de algas. A taxa de descoloração dos corantes foi avaliada através de mensuração da absorbância das soluções de corante. Para isso, foram retiradas alíquotas de 2 mL, em dias alternados, que após as leituras foram imediatamente devolvidas aos respectivos frascos (Huicheng et al., 2012, com modificações). Para avaliar o percentual de auto degradação dos corantes, foram utilizadas soluções de corantes diluídos em solução nutritiva, submetidos as mesmas condições ambientais que os corantes tratados .

Os corantes utilizados foram o Levafix Laranja E-3GA (490 nm), Remazol Azul RGB (580 nm), Astrazon Vermelho (515 nm), Mordente Laranja 1 (415 nm), Remazol Marinho RGB (630 nm) e Telon Turquesa (625 nm). As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro Spectrum METER SP-UV2000 (Biosystem) com auxílio de uma cubeta de plástico.

4.4 Avaliação dos parâmetros fisiológicos

Ao final dos 15 dias do teste de descoloração de corantes, as plantas foram coletadas, com pesagem da massa fresca das raízes e parte aérea. De posse desses dados, foi determinada a relação de massa de raiz/parte aérea dos dois grupos. Os tecidos vegetais foram então armazenados a -20°C até preparação dos extratos protéicos.

4.5 Obtenção do extrato bruto e exsudado

O tecido vegetal de raízes (n=3) e folhas (n=3) foi congelado com nitrogênio líquido e macerado com auxílio de pistilo e almofariz. Uma alíquota de 1 g da farinha resultante foi ressuspensa em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 na proporção 1:3 (massa/volume). As amostras foram agitadas constantemente por 2 horas a 4°C. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos, 4 °C. O sobrenadante (extrato bruto) foi coletado e armazenado a -20°C.

Os exsudados das raízes foram obtidos após 15 dias de cultivo das plantas em meio hidropônico.

4.6 Dosagem protéica

A concentração de proteínas solúveis foi determinada seguindo a metodologia descrita por BRADFORD (1976). Para isso, 100 μL de amostra foram adicionadas a 2,5 mL do reagente de Bradford e deixada em repouso por 10 minutos. Em seguida, a solução foi analisada (595 nm) em Spectrum METER SP-UV2000 (Biosystem). Para o cálculo da concentração de proteínas, foi utilizada uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). As dosagens protéicas foram realizadas em triplicata.

4.7 Atividades enzimáticas

4.7.1 Guaiacol peroxidase - GPX (EC 1.15.1.1)

O ensaio da GPX foi realizado seguindo a metodologia descrita por URBANEK e colaboradores (1991), usando guaiacol e H_2O_2 como substratos. Em um tubo de ensaio, foram homogeneizados 950 μL de tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,2), 500 μL de guaiacol (20 mM) e 500 μL de peróxido de hidrogênio (60 mM), ficando encubados por 10 minutos a 30°C. Após o período de encubação, 50 μL de extrato vegetal foram adicionados ao meio reacional, produzindo um volume final de 2 mL. Imediatamente, a absorvância do meio foi mensurada a 480 nm a cada 30 segundos durante 3 minutos. A atividade peroxidásica foi quantificada com base no coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), de acordo com o protocolo descrito por Plewa, Smithe Wagner (1991). A unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de tetraguaiacol por minuto. Os resultados foram expressos em UA por miligrama de proteína solúvel: UA/mg de proteína. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7.2 Catalase - CAT (EC 1.11.1.6)

O ensaio da CAT foi realizado seguindo a metodologia descrita por HAVIR; MCHALE (1987) e PEIXOTO et al. (1999). A enzima catalase produz a transformação do H_2O_2 em água e oxigênio. Em um tubo de ensaio foi preparado o meio reacional contendo 600 μL de tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,0), 300 μL de extrato vegetal e 100 μL de peróxido de hidrogênio (112,5 mM). O tubo de ensaio foi então

encubado a 30°C por 10 minutos. Ao fim deste período, foram realizadas leituras a 240 nm, em intervalos de 10 segundos por 60 segundos. A atividade foi calculada com base no coeficiente de extinção molar $36.000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em μM de H_2O_2 consumido por miligrama de proteína solúvel: $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ de proteína. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7.3 Dismutase do superóxido – SOD (EC.1.15.1.1)

O ensaio da SOD foi realizado seguindo a metodologia descrita ROSSUM e colaboradores (1997), com adaptações para microplaca de 96 poços para cultura de células. Em um tubo de ensaio, foram adicionados (segundo está ordem) 10 μL de tampão fosfato de potássio (1000 mM, pH 7,8), 20 μL de EDTA (1 mM), 10 μL de Triton X-100 (0,25%), 20 μL de L-Metionina (130 mM), 50 μL de extrato vegetal, 20 μL de Nitro azul de tetrazólio (NBT) (750 μM) e 20 μL de Riboflavina (100 mM). Após homogeneização do meio reacional, o mesmo foi mantido em repouso e protegido da luz por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da microplaca a 630 nm, ainda no escuro. Após essa etapa, a microplaca foi acondicionada em uma câmara com luz fluorescente (32 W), sendo realizadas leituras a 630 nm a cada 1 minuto, por um período total de 5 minutos. A unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de amostra necessária para inibir 50% da fotorredução, em relação ao controle positivo, do NBT à formazana azul. Os resultados foram expressos em UA por miligrama de proteína solúvel: UA/mg de proteína. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7.3 Lacase (EC.1.10.3.2)

A atividade lacásica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por RIDE (1980), utilizando a seringaldazina como substrato específico. Em um tubo de ensaio foram adicionados 2,2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e 500 μL da amostra ou solução da enzima lacase (25 unidades) (Sigma). Por fim, foi adicionado 300 μL seringaldazina 0,216 mM em metanol 100%. A solução foi colocada em uma cubeta de vidro (1 cm de caminho óptico) e observada em espectrofotômetro a 530 nm. As leituras ocorreram a cada 60 segundos, por um período total de 10 minutos. A unidade (1 unidade=U) de atividade enzimática foi definida como aquela

capaz ocasionar o aumento de 0,001/minuto na absorvância do meio reacional. A lacase comercial foi utilizada como controle positivo.

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS)

Todas as amostras foram submetidas à precipitação com acetona 100%. Para isso, os extratos e exsudados foram incubados com acetona 100% (na proporção 1:10 volume de amostra/volume de acetona) previamente resfriada a -20 °C. Esta solução foi mantida em repouso por 16 horas em ambiente refrigerado (-20 °C). Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x *g*, por 10 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente para completa volatilização da acetona.

Com intuito de analisar o perfil protéico das folhas, raízes e do exsudados das plantas mantidas na presença e ausência dos corantes têxteis, foi utilizada PAGE-SDS 15%, seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970). Em cada poço foi aplicada uma alíquota (10 µL) de 20 µg de proteína em tampão de amostra. A solução foi aquecida por 5 minutos (98 °C) e centrifugada a 5.000 x *g*, por 10 minutos, a 25 °C. O sobrenadante foi coletado e então aplicado no gel.

Para a corrida eletroforética foi utilizada uma condição de 200 V, 20 mA e 10 W, por um período aproximado de 50 minutos. Após a corrida, os géis foram corados com "Coomassie Brilliant Blue G-250", de acordo com a metodologia descrita por CANDIANO e colaboradores (2004).

4.9 Cortes histológicos

Foram coletadas plantas nos tempos zero, 24, 48 e 72 horas para análise dos tecidos da raiz e caule. Os cortes foram feitos à mão livre e visualizados em microscópio óptico de luz visível, com o intuito de visualizar possível presença de corantes nos tecidos.

4.10 Análise de toxicidade

O organismo modelo utilizado para o teste de toxicidade foi *Artemia salina* seguindo a metodologia estabelecida por MEYER et al. (1982), com modificações. Os ovos de *A. salina* foram incubados em água do mar artificial, preparada a partir da solução de cloreto de sódio diluída em água destilada, na proporção de 35 g/L. As larvas eclodiram após o período de incubação de 48 horas em temperatura ambiente e iluminação contínua.

Foram selecionados 10 náuplios para serem colocadas em contato com as soluções de corantes em que as raízes das plantas de *H. annuus* ficaram em contato. Foi utilizado como controle soluções de corantes que foram submetidas às mesmas condições que as soluções do teste de descoloração, mas na ausência do contato com as plantas, somente solução nutritiva utilizada como base de diluição dos corantes e solução salina de água do mar artificial.

Após um período de contato de 24 horas, foi contado o número de náuplios sobreviventes e calculada a porcentagem de mortes.

4.11 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como uma média \pm desvio padrão. As médias foram analisadas através do teste de variância (ANOVA) sempre que necessário. O teste de Tukey's foi usado para comparar médias, sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. O software GraphPadPrism 5.02 foi utilizado para a produção dos gráficos e realização das análises estatística. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1. Massa Fresca

Para avaliar a ocorrência de alterações fisiológicas no desenvolvimento das plantas, decorrente do contato com os corantes, foi analisado o peso da massa fresca. Desta forma, tanto a massa da raiz quanto da parte aérea das plantas foi observada.

Tabela 1. Massa fresca (g) de plantas *H. annuus* após tratamento com corantes têxteis

	Raiz (g)	Parte Aérea (g)	Relação Parte Aérea/Raiz
Controle	5,53 ± 1,41 ^a	13,98 ± 3,12 ^a	2,33 ± 0,62 ^a
Remazol Azul RGB	3,95 ± 0,48 ^a	8,98 ± 1,98 ^a	2,30 ± 0,62 ^a
Levafix Laranja E3-GA	2,35 ± 0,65 ^a	4,13 ± 3,30 ^a	1,60 ± 0,84 ^a
Astrazon Vermelho	5,97 ± 0,03 ^a	13,93 ± 3,94 ^a	2,33 ± 0,67 ^a
Mordente Laranja 1	4,44 ± 1,23 ^a	4,77 ± 0,67 ^a	1,10 ± 0,17 ^b
Telon Turquesa	4,52 ± 1,17 ^a	7,65 ± 1,27 ^a	1,76 ± 0,49 ^a
Remazol Marinho	7,19 ± 4,12 ^a	19,73 ± 8,85 ^a	2,87 ± 0,60 ^a

Fonte: Próprio autor

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média. Cada tratamento possuía 3 replicatas. As plantas foram pesadas após serem cultivadas por 15 dias em solução nutritiva contendo 20 mg/L de corante.

^b Representa grupos que diferiram do grupo controle (^a). ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A Tabela 1 mostra que após o contato com todos os corantes, as plantas de *H. annuus* não demonstraram alterações significativas na massa fresca das raízes e parte aérea, quando comparadas com as plantas controle.

Os resultados da relação parte aérea/raiz se mostrou constante em todos os tratamentos, não apresentando alterações estatisticamente significativas em nenhum

deles, quando comparados com o grupo controle.

5.2 Quantificação de proteínas

Outro parâmetro avaliado foi a quantidade de proteína presente nos tecidos da raiz e folha das plantas mantidas em contato com os corantes têxteis. A partir dos dados apresentados na Tabela 2 é possível analisar se a condição de estresse da presença do corante é capaz de alterar a quantidade de proteína presentes nos dois tecidos.

Tabela 2. Quantidade de proteínas (mg) por massa fresca de tecido (g) de plantas *H. annuus* após tratamento com corantes têxteis

	Raiz (mg/g)	Folha (mg/g)
Controle	0,85 ± 0,02 ^a	1,74 ± 0,03 ^a
Remazol Azul RGB	0,60 ± 0,01 ^b	1,33 ± 0,03 ^b
Levafix Laranja E3-GA	0,63 ± 0,02 ^b	0,86 ± 0,05 ^b
Astrazon Vermelho	0,90 ± 0,02 ^a	2,58 ± 0,04 ^b
Mordente Laranja 1	0,72 ± 0,02 ^b	1,43 ± 0,02 ^b
Telon Turquesa	0,43 ± 0,02 ^b	1,21 ± 0,02 ^b
Remazol Marinho	0,40 ± 0,01 ^b	1,09 ± 0,06 ^b

Fonte: Próprio autor

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média. A dosagem protéica seguiu a metodologia de Bradford (1976). Cada tratamento possuía 3 replicatas.

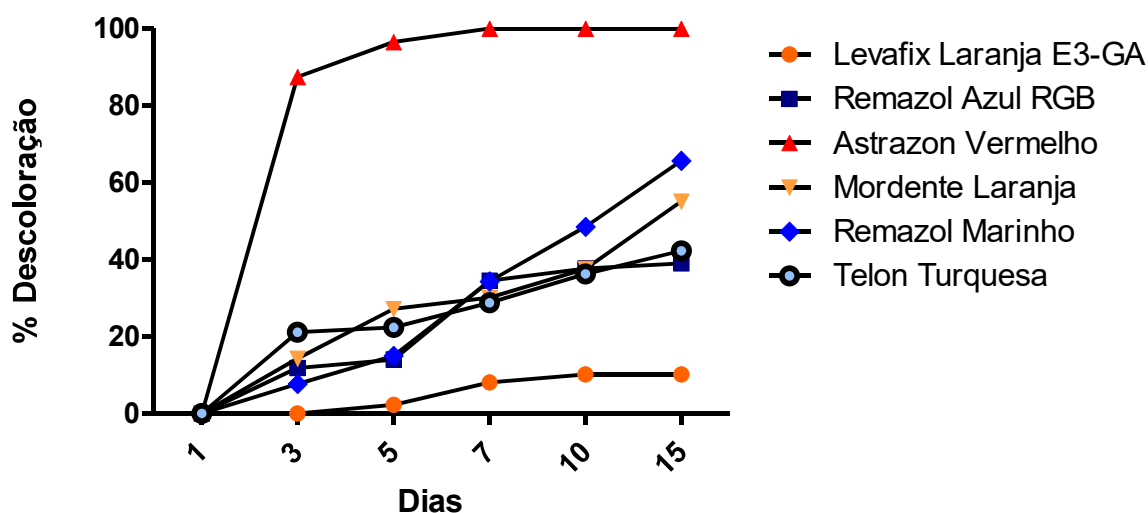
^b Representa grupos que diferiram do grupo controle (^a). ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A quantificação de proteína solúvel revelou que na raiz, o único tratamento que não alterou o nível de proteína no tecido, foi o com Astrazon Vermelho. Os demais tratamentos ocasionaram uma redução no teor de proteínas solúveis desse tecido. Na parte aérea, todas as plantas colocadas na presença dos corantes, apresentaram alteração nos níveis de proteína solúvel, sendo esses teores menores do que os observados para o controle na maioria dos tratamentos com os corantes, sendo a única exceção o tratamento com o corante Astrazon vermelho.

5.3. Testes de Descoloração

Nos testes de descoloração, foi medida em porcentagem, a proporção da diminuição da absorbância dos corantes, na solução nutritiva em que as plantas cresciam.

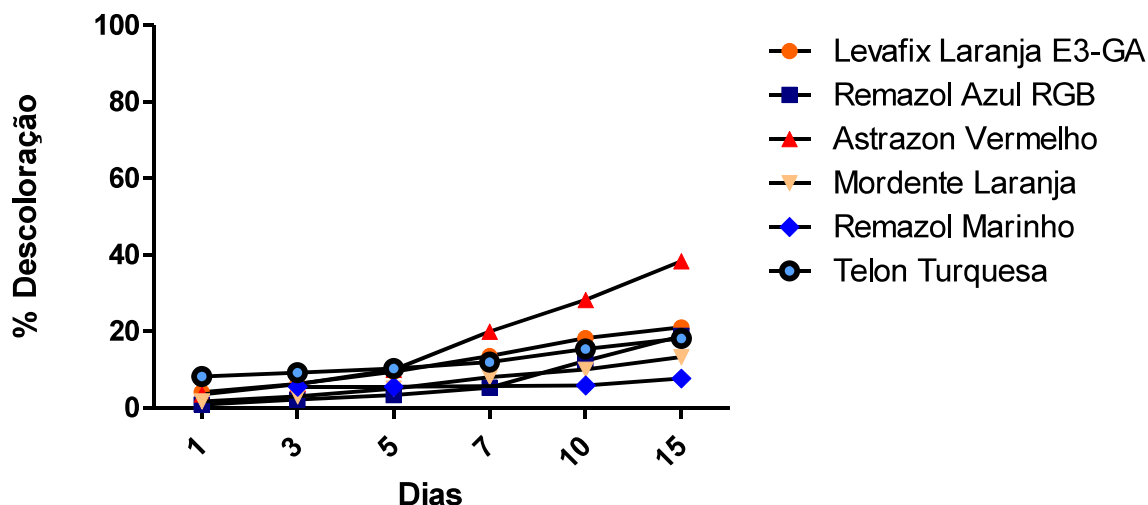
Gráfico 1. Descoloração (%) de soluções de corantes têxteis (20 mg/L) por plantas de *H. annuus* durante o período de 15 dias



Fonte: Próprio autor

Porcentagem calculada com dados de leitura em espectrofotômetros de alíquotas de cada solução de corante, no decorrer de 15 dias em contato com as raízes de *H. annuus*. Os comprimentos de onda de máxima absorção foram: Levafix Laranja E-3GA (490 nm), Remazol Azul RGB (580 nm), Astrazon Vermelho (515 nm), Mordente Laranja 1 (415 nm), Remazol Marinho RGB (630 nm) e Telon Turquesa (625 nm).

Gráfico 2. Perfil de descoloração (%) natural de soluções de corantes têxteis (20 mg/L) durante o período de 15 dias



Fonte: Próprio autor

Porcentagem calculada com dados de leitura em espectrofotômetros de alíquotas de cada solução de corante na ausência de plantas, no decorrer de 15 dias. Os comprimentos de onda de máxima absorção foram: Levafix Laranja E-3GA (490 nm), Remazol Azul RGB (580 nm), Astrazon Vermelho (515 nm), Mordente Laranja 1 (415 nm), Remazol Marinho RGB (630 nm) e Telon Turquesa (625 nm).

O Gráfico 1 apresenta os dados referentes aos perfis de descoloração dos corantes em contato com as plantas de *H. annuus*. Destes, a solução de corante Astrazon Vermelho (20 mg/mL) apresentou uma redução de 87% em 48 horas e 100% da absorbância ao final de 7 dias. As demais soluções apresentaram uma taxa de descoloração máxima ao final dos 15 dias, de 10,2% (Levafix Laranja E3-GA), 39% (Remazol Azul RGB), 42,3% (Telon Turquesa), 55,1% (Mordente Laranja) e 65,7% (Remazol Marinho).

Os dados da descoloração natural dos corantes apresentados no Gráfico 2, mostram que a taxa de descoloração das soluções de corantes, na ausência do contato com as raízes de *H. annuus*, é menor do que na presença dela.

Na Figura 1 são mostradas imagens comparativas de cada tratamento com os diferentes corantes, sendo possível perceber visualmente a alteração da coloração das soluções de corante em que as plantas foram cultivadas, após 15 dias.

Figura 12. Análise qualitativa da capacidade de descoloração de soluções de corantes têxteis (20 mg/L) por plantas de *H. annuus* durante o período de 15 dias

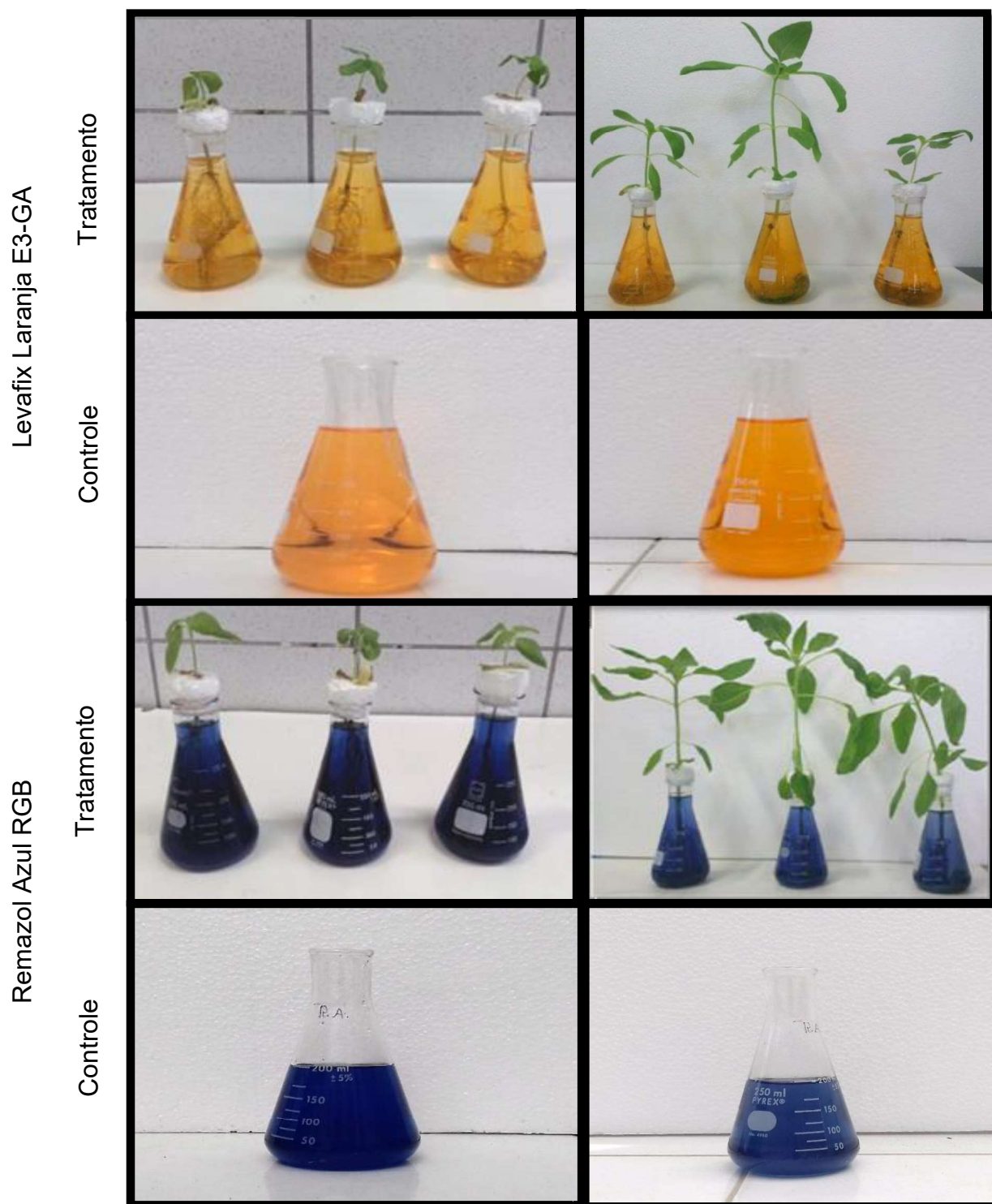


Figura 12- Continuação. Análise qualitativa da capacidade de descoloração de soluções de corantes têxteis (20 mg/L) por plantas de *H. annuus* durante o período de 15 dias

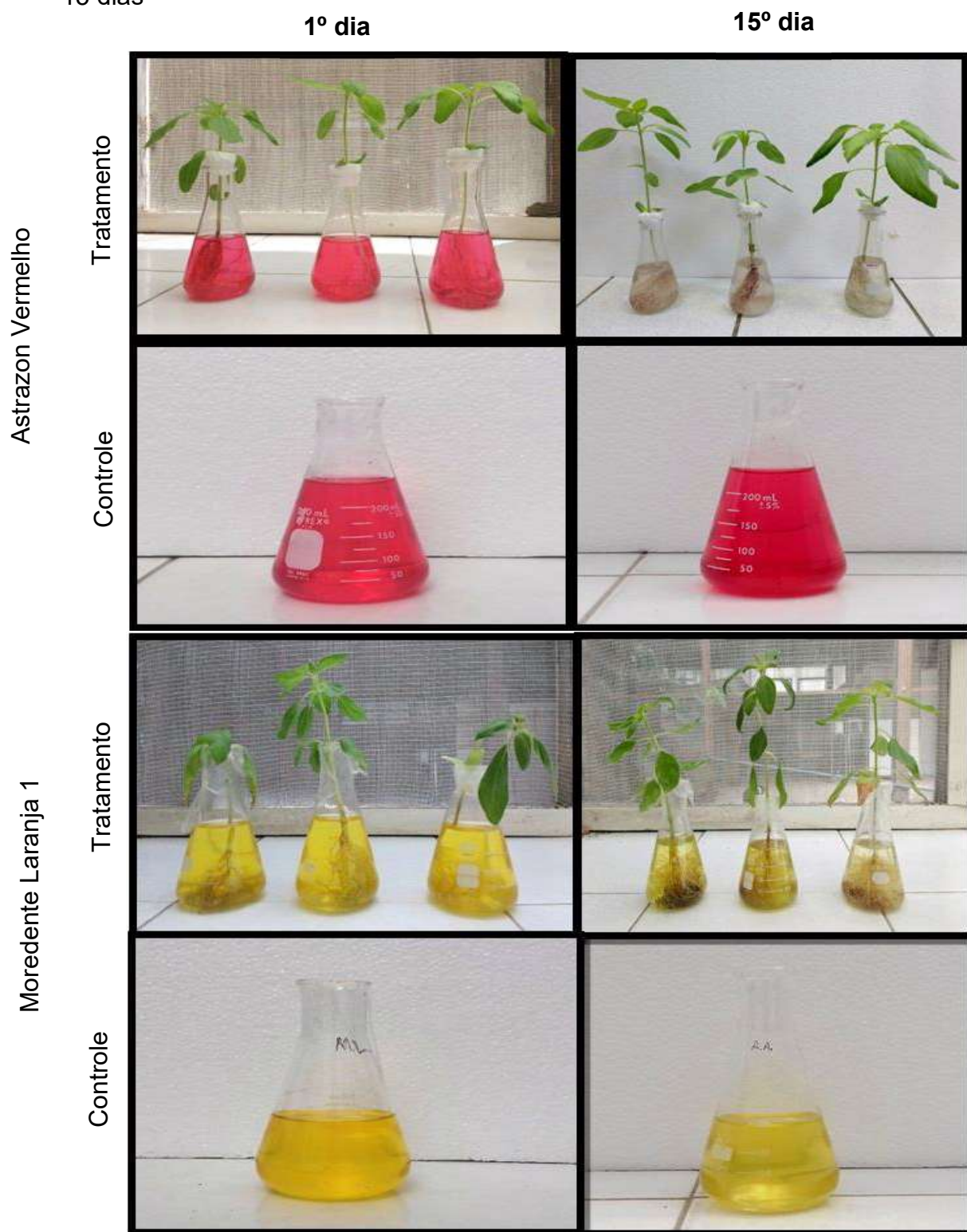
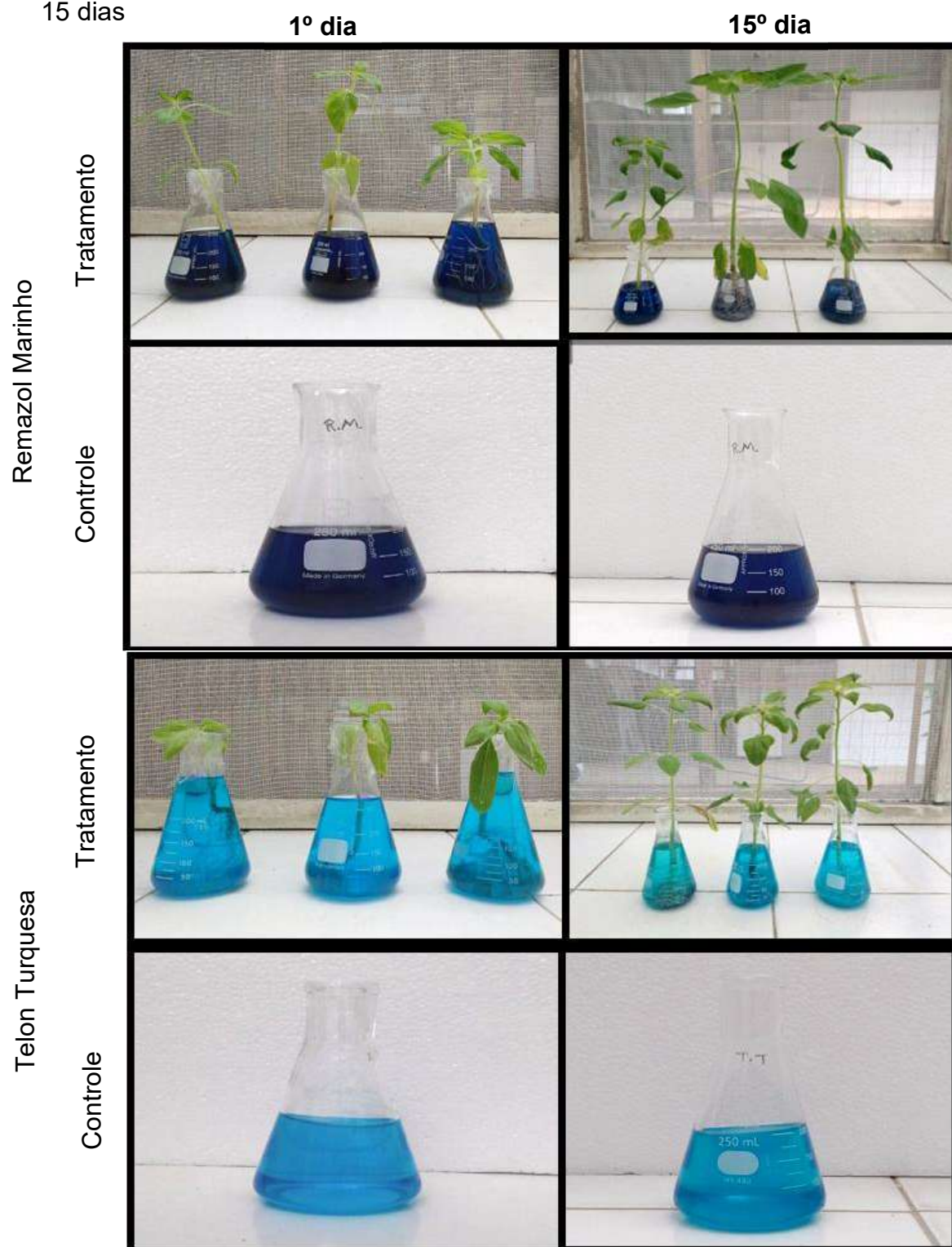


Figura 12- Continuação. Análise qualitativa da capacidade de descoloração de soluções de corantes têxteis (20 mg/L) por plantas de *H. annuus* durante o período de 15 dias



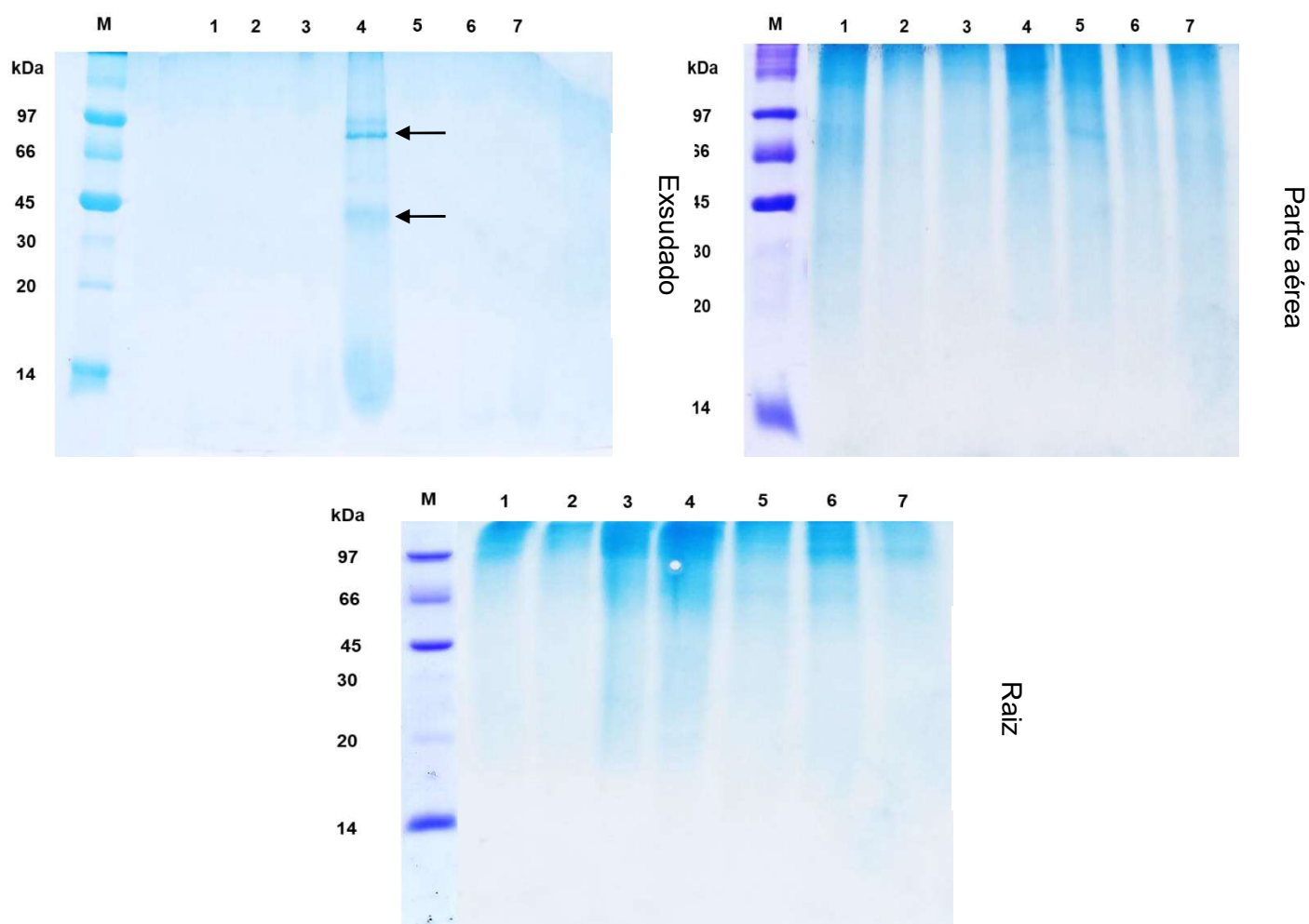
Fonte: Próprio autor

Como controle foi utilizado apenas os corantes em solução nutritiva.

5.4. Perfil proteico

De todos os exsudados das plantas de *H. annuus*, apenas no tratamento com o corante Astrazon vermelho foi possível observar um perfil eletroforético diferenciado. Neste, foi possível notar a presença de 2 bandas proteicas, uma entre 97-66 kDa e outra com massa aparente de 45 kDa. Nos perfis proteicos da parte aérea e raízes, não foi possível perceber alterações entre os grupos tratados e controle (Figura 2).

Figura 13. Perfil eletroforético dos extratos proteicos de exsudatos, raízes e folhas e de *H. annuus*



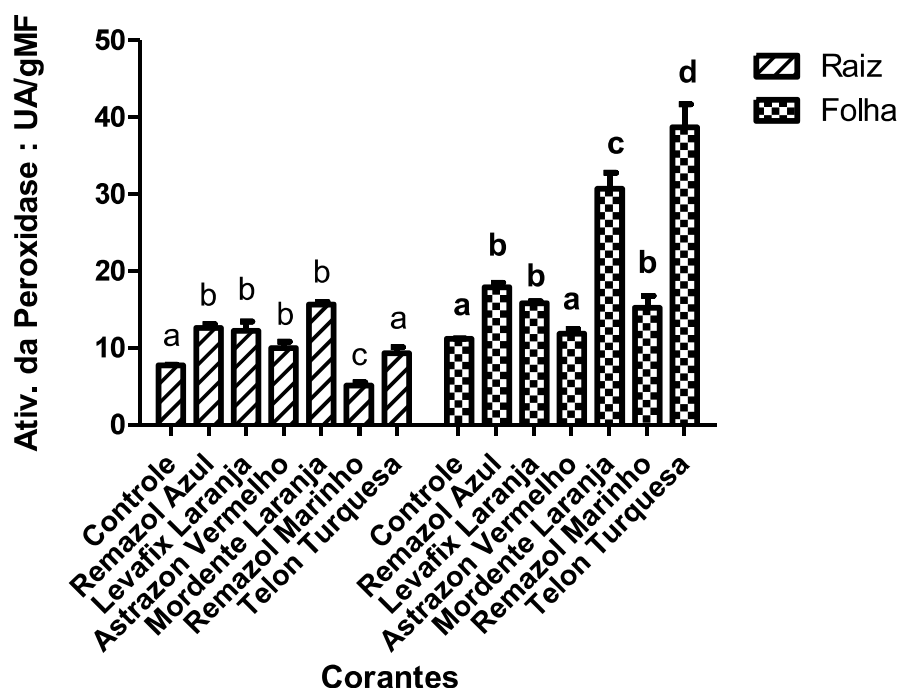
Fonte: Próprio autor

Perfil eletroforético: M – Marcadores Moleculares; 1 – Controle; 2 – Remazol azul; 3 – Levafix laranja; 4 – Astrazon vermelho; 5 – Mordente laranja; 6 – Remazol marinho; 7 – Telon turquesa. Foram aplicadas 20 µg de proteína em cada poço.

5.5. Atividades enzimáticas

Foram avaliadas as respostas de diferentes enzimas antioxidantes de *H. annuus* tratadas com os corantes têxteis, visando observar se há alterações nos níveis de atividade enzimática devido a presença dos corante.

Gráfico 3. Atividade da peroxidase de raízes e folhas de plantas de *H. annuus* tratadas ou não com corantes têxteis (20 mg/L) após o período de 15 dias



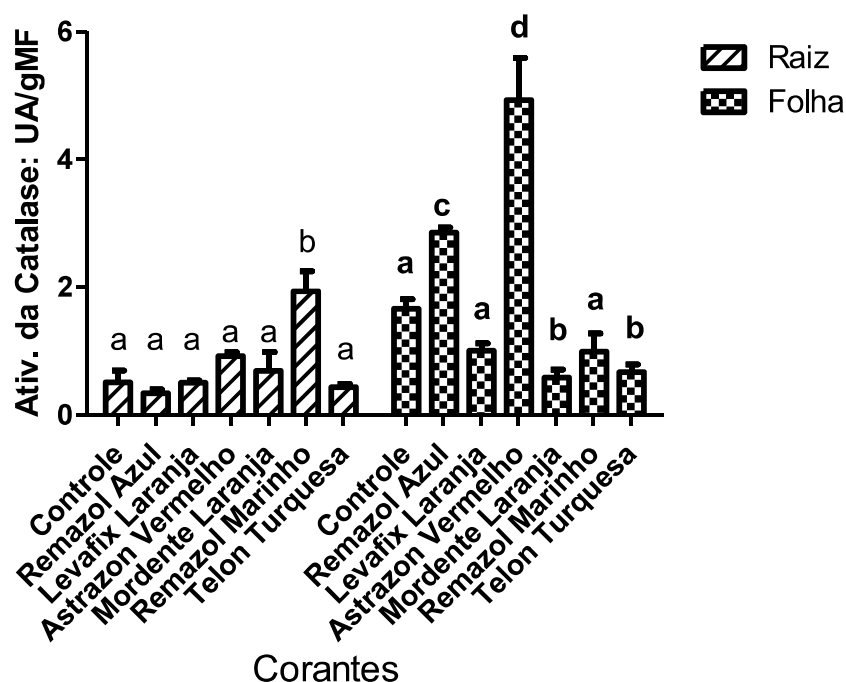
Fonte: Próprio autor

O eixo das ordenadas representa a unidade de atividade da enzima por grama de massa fresca, respectivamente da raiz e da folha. O eixo das abscissas representa os grupos tratados com solução de Hoagland (controle) e corantes remazol azul, levafix laranja, astrazon vermelho, mordente laranja, remazol marinho e telon turquesa. As colunas representam a média \pm desvio-padrão da média. Letras diferentes representam grupos que diferiram entre si. ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Em relação à atividade peroxidásica nas raízes, apenas o corante Telon turquesa ($9,32 \pm 0,7$ UA/gMF) não alterou os níveis de atividade enzimática com relação ao controle ($7,74 \pm 0,4$ UA/gMF). Dentre os demais corantes, quatro induziram o aumento da atividade (Remazol Azul – $12,6 \pm 1,2$ UA/gMF, Levafix Laranja - $12,2 \pm 1,0$ UA/gMF, Astrazon Vermelho – $9,98$, Mordente Laranja - $15,6 \pm 1,3$ UA/gMF) e um ocasionou redução da atividade enzimática (Remazol Marinho – $5,12 \pm 0,2$ UA/gMF)

com relação às plantas controle. Na parte aérea, com exceção do Astrazon vermelho ($11,9 \pm 1,2$ UA/gMF), todos os corantes (Remazol Azul – $17,9 \pm 0,9$ UA/gMF, Levafix Laranja - $15,8 \pm 1,1$ UA/gMF, Mordente Laranja – $30,7 \pm 1,3$ UA/gMF e Telon turquesa – $38,7 \pm 1,6$ UA/gMF) induziram aumento da atividade peroxidásica quando comparados às folhas de plantas controle, sendo os dois últimos os que apresentaram os maiores valores (Gráfico 3).

Gráfico 4. Atividade da catalase de raízes e folhas de plantas de *H. annuus* tratadas ou não com corantes têxteis (20 mg/L) após o período de 15 dias



Fonte: Próprio autor

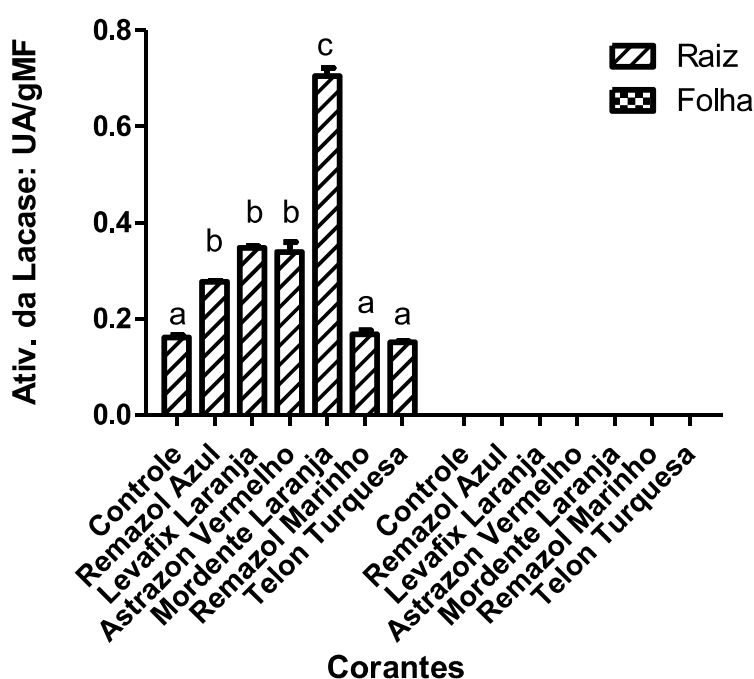
O eixo das ordenadas representa a unidade de atividade da enzima por grama de massa fresca, respectivamente da raiz e da folha. O eixo das abscissas representa os grupos tratados com solução de Hoagland (controle) e corantes remazol azul, levafix laranja, astrazon vermelho, mordente laranja, remazol marinho e telon turquesa. As colunas representam a média \pm desvio-padrão da média.

Letras diferentes representam grupos que diferiram entre si. ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os dados do Gráfico 4 mostram que, de maneira geral, as folhas apresentaram maior atividade catalásica do que as raízes. Em se tratando das raízes, o corante Remazol Marinho ($1,9 \pm 0,1$ UA/gMF) foi o único que resultou em um aumento da atividade da catalase quando comparado ao controle ($0,5 \pm 0,1$ UA/gMF). Os demais

tratamentos não diferiram em relação ao controle. Já com relação às folhas, houve um aumento da atividade da enzima nas plantas tratadas com os corantes Remazol Azul ($2,9 \pm 0,3$ UA/gMF) e Astrazon Vermelho ($4,9 \pm 0,5$ UA/gMF). Diferentemente, os corantes Mordente Laranja ($0,6 \pm 0,01$ UA/gMF) e Telon turquesa ($0,7 \pm 0,02$ UA/gMF) causaram uma redução da atividade da catalase nesse tecido.

Gráfico 5. Atividade da lacase de raízes e folhas de plantas de *H. annuus* tratadas ou não com corantes têxteis (20 mg/L) após o período de 15 dias



Fonte: Próprio autor

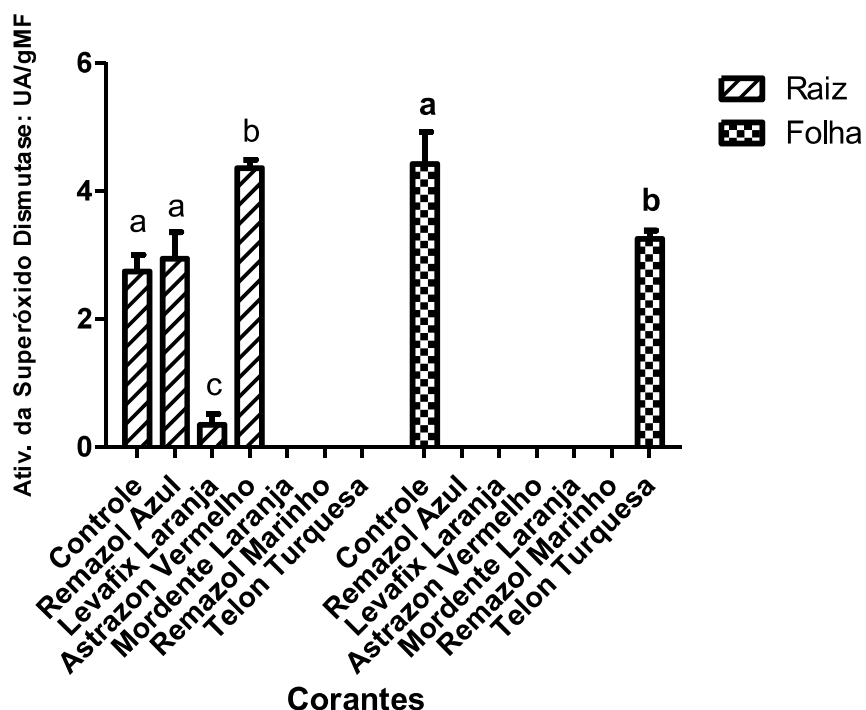
O eixo das ordenadas representa a unidade de atividade da enzima por grama de massa fresca, respectivamente da raiz e da folha. O eixo das abscissas representa os grupos tratados com solução de Hoagland (controle) e corantes remazol azul, levafix laranja, astrazon vermelho, mordente laranja, remazol marinho e telon turquesa. As colunas representam a média \pm desvio-padrão da média.

Letras diferentes representam grupos que diferiram entre si. ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A enzima lacase teve sua atividade aumentada nos tecidos das raízes após o contato com os corantes Remazol Azul ($0,16 \pm 0,00$ UA/gMF), Levafix Laranja ($0,28 \pm 0,00$ UA/gMF), Astrazon Vermelho ($0,34 \pm 0,01$ UA/gMF), e Mordente Laranja ($0,71 \pm 0,02$ UA/gMF), sendo esse último o que ocasionou a maior atividade. Não foi

observada atividade lacásica nos tecidos de folhas, tanto nas plantas tratadas com os corantes, quanto no controle (Gráfico 5).

Gráfico 6. Atividade da superóxido dismutase de raízes e folhas de plantas de *H. annuus* tratadas ou não com corantes têxteis (20 mg/L) após o período de 15 dias



Fonte: Próprio autor

O eixo das ordenadas representa a unidade de atividade da enzima por grama de massa fresca, respectivamente da raiz e da folha. O eixo das abscissas representa os grupos tratados com solução de Hoagland (controle) e corantes remazol azul, levafix laranja, astrazon vermelho, mordente laranja, remazol marinho e telon turquesa. As colunas representam a média \pm desvio-padrão da média.

Letras diferentes representam grupos que diferiram entre si. ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A atividade da enzima superóxido dismutase dos tecidos radiculares mostrou que o grupos tratados com o corante Levafix Laranja apresentou uma baixa atividade de SOD ($0,35 \pm 0,07$ UA/gMF) enquanto que as raízes de plantas tratadas com os corantes Mordente laranja, Remazol marinho e Telon turquesa não apresentaram atividade enzimática. O tratamento com o corante Remazol azul ($2,9 \pm 0,06$ UA/gMF) não diferiu em relação ao controle ($2,7 \pm 0,03$ UA/gMF), enquanto que o tratamento com Astrazon Vermelho ocasionou um aumento na atividade da SOD ($4,4 \pm 0,07$ UA/gMF) (Gráfico 6).

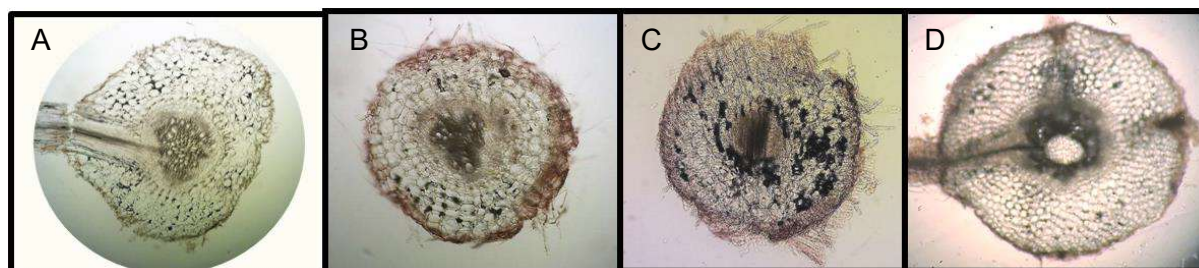
Com relação as folhas, com exceção do controle ($4,4 \pm 0,02$ UA/gMF) e do tratamento com o corante Telon turquesa, o qual apresentou uma leve redução ($3,3 \pm 0,04$ UA/gMF) em comparação com o controle, não houve detecção de atividade de superóxido dismutase para esses tecidos (Gráfico 6).

5.6. Análise histológica

Neste ensaio foram analisadas apenas as plantas tratadas com o corante Astrazon vermelho.

Nos cortes histológicos do tecido radicular, foi observado uma coloração avermelhada ao redor das células mais superficiais da raiz após 24 horas de tratamento (figura 14-B). Após 48 e 72 horas de exposição ao corante, foi detectado uma maior presença de uma coloração escura, tanto nas porções dos meristemas, quanto nas porções superficiais das raízes. Além disso, foi possível observar o surgimento de regiões escuras mais próximas aos meristemas (Figura 14-C e D).

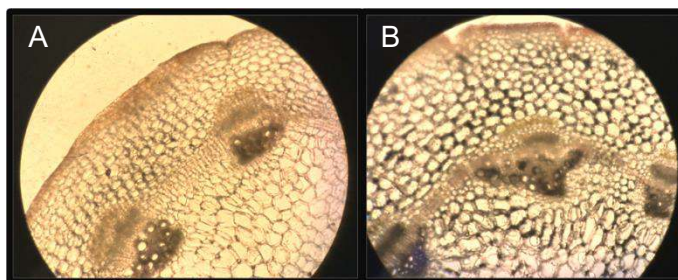
Figura 14. Anatomia dos tecidos da raiz de *H. annuus* após tratamento com o corante Astrazon Vermelho durante diferentes intervalos de tempo



Fonte: Próprio autor
Zero horas (A), após 24 (B), 48 (C) e 72 (D) horas de contato com o corante astrazon vermelho.

Os cortes histológicos do caules demonstraram que após o tratamento com o corante Astrazon vermelho, houve o surgimento de uma coloração escura na porção central do caule. Tal coloração é semelhante a observada nas células das raízes (Figura 15-A e B).

Figura 15. Anatomia dos tecidos do caule Anatomia dos tecidos da raiz de *H. annuus* após tratamento com o corante Astrazon Vermelho durante diferentes intervalos de tempo



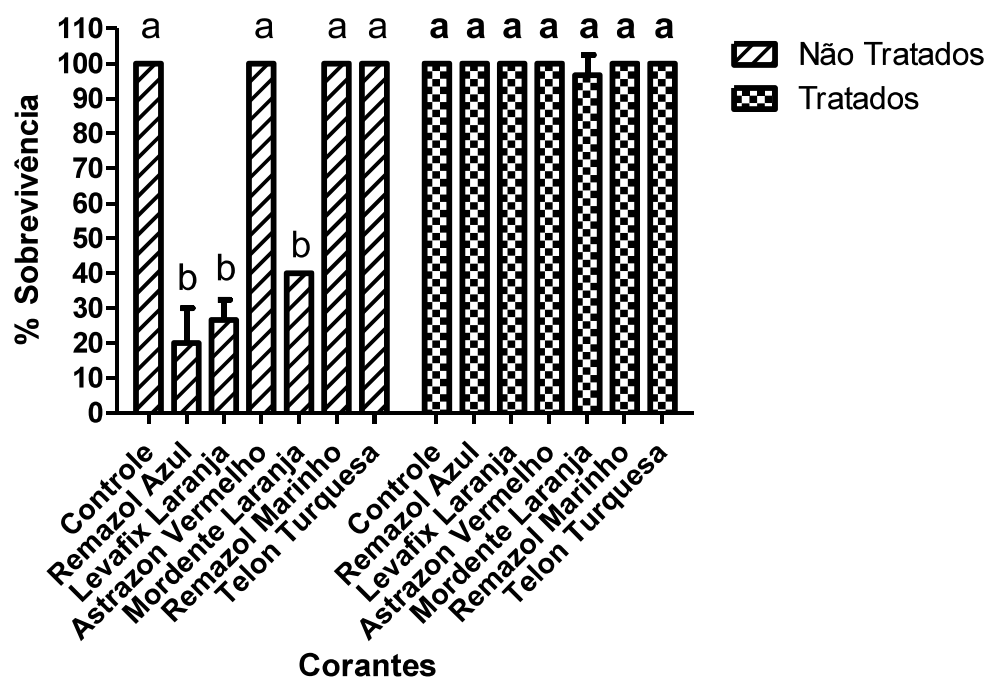
Fonte: Próprio autor

(A) zero horas e (B) após 72 horas de contato com o corante astrazon vermelho.

5.7. Análise de toxicidade

Náuplios de *Artemia salina* foram colocados em contato com as soluções de corantes expostas e não expostas a plantas de *H. annuus*. Neste ensaio foi observado que soluções dos corantes Remazol azul, Levafix laranja e Mordente laranja sem o prévio tratamento com plantas de *H. annuus* apresentaram toxicidade para náuplios já que para esses corantes apenas 20, 27 e 40%, respectivamente, sobreviveram ao tratamento. Entretanto, após o tratamento dessas soluções com *H. annuus*, as soluções não apresentaram efeito tóxico já que não foi observada mortalidade para esses indivíduos (Gráfico 7).

Gráfico 7. Teste de toxicidade das soluções de corantes têxteis em náuplios de *Artemia salina*



Fonte: Próprio autor

O eixo das ordenadas representa a porcentagem de sobrevivência dos náuplios após 24 horas de contato com as soluções de corantes. O eixo das abscissas representa os grupos tratados com solução de Hoagland (controle) e corantes remazol azul, levafix laranja, astrazon vermelho, mordente laranja, remazol marinho e telon turquesa. As colunas representam a média \pm desvio-padrão da média.

^b Representa grupos que diferiram do grupo controle (^a) pelo teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

O crescente aumento da preocupação com questões ambientais, com destaque para poluição, tornou cada vez mais necessário, as pesquisas e desenvolvimento de formas alternativas e mais eficientes para o tratamento e recuperação de áreas afetadas por contaminações antropogênicas, como corantes têxteis. A biorremediação, em especial a fitorremediação, surge como um método ecologicamente correto que gera baixos impactos para o meio ambiente. Este método faz uso de espécimes vegetais como os agentes ocasionadores do efeito de remediadores (WILTSE et al., 1998; OGOLA et al., 2015). Dentro do contexto da utilização de plantas como agente biorremediador de área contaminada, podemos ressaltar a espécie *H. annuus*.

A espécie vegetal *H. annuus* é uma planta que possui um grande potencial para ser utilizada como agente remediador de áreas poluídas, podendo também ser utilizada como uma fonte de energia comparado com a sua capacidade fitorremediadora (MARQUES et al., 2013). Diversos trabalhos já relatam a aplicação desta planta como fitorremediador de ambientes contaminados com metais pesados como níquel, chumbo, zinco, cádmio e urânio (MAKHTAR et al., 2010; NEHNEVAJOVA et al., 2006; LEE et al., 2010).

Várias outras plantas da mesma família do *H. annuus* (família Asteraceae) já demonstraram a capacidade de tratar compostos tóxicos como corantes têxteis. Dentre estes exemplares, pode-se citar *Aster amellus*, *Tagetes patula*, *Gaillardia grandiflora* e *Glandularia pulchella* (KHANDARE et al., 2011; PATIL e JADHAV, 2013; WATHARKAR e JADHAV, 2014; KABRA et al, 2011).

Para os testes de avaliação do efeito de *H. annuus* como fitorremediador, foi observado o potencial de *H. annuus* em descolorir diferentes tipos de corantes têxteis. Como observado, todos os corantes tiveram a sua absorvância diminuída após o contato com a planta. O melhor resultado foi obtido para o corante Astrazon vermelho, com redução de mais de 80% na absorvância da solução, em 3 dias de contato. A redução de 100% da absorvância foi obtida com no máximo 7 dias de tratamento. Este resultado foi melhor do que o obtido para plantas de *Nasturtium officinale* e *Hydrocotyle*

vulgaris, que conseguiram reduzir em 87% e 95%, respectivamente, a absorvência de solução do corante Astrazon vermelho (TORBATI et al., 2014; VAFAEI et al., 2013).

Todos os corantes apresentaram decaimento natural de sua absorvência, mesmo não estando em contato com as raízes de espécimes de *H. annuus*. Entretanto, vale salientar que em todos os casos, o percentual de descoloração das soluções de corantes em contato com a planta, foi maior do que o percentual de descoloração na ausência de *H. annuus*. Este fato é mais um indicativo de que a descoloração observada nas soluções de corante seria decorrente principalmente da presença da espécie vegetal em estudo.

Também foram analisados parâmetros fisiológicos das plantas submetidas à presença dos corantes têxteis. O primeiro parâmetro avaliado foi o conteúdo de massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz e a relação parte aérea/raiz das plantas cultivadas em contato com corantes têxteis. Apesar de pequenas variações, não foi observado nenhuma alteração significativa nos parâmetros de massa fresca analisados (massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz, e a relação parte aérea/raiz). Isto revela que aparentemente, não houve alteração na produção de biomassa nas tratadas com os corantes.

A partir das análises de dosagem protéica das raízes foi observado que apenas no tratamento com o corante Astrazon vermelho não foi capaz de promover alterações na quantidade de proteínas solúveis. Todos os outros corantes causaram uma redução dos níveis protéicos no tecido radicular de *H. annuus*. Nas folhas, de maneira interessante, o corante Astrazon vermelho foi o único a ocasionar aumento do conteúdo de proteínas, ao passo que os outros corantes tiveram o efeito oposto. Alterações na quantificação de proteínas solúveis pode ser um indicativo de mudanças no perfil de expressão de proteínas relacionadas a detoxificação de compostos pela planta ou mesmo, relacionadas ao estresse oxidativo decorrente do contato com esses compostos.

Ao analisar conjuntamente os dados de quantidade de proteína e massa fresca, é possível notar que apesar das alterações da quantidade de proteína nos tecidos

vegetais analisados, estas alterações, aparentemente não comprometeram o ganho de massa das plantas expostas aos corantes.

Os perfis eletroforéticos observados neste trabalho mostraram que, dos tecidos vegetais analisados, não houve diferença aparente das plantas tratadas com as soluções de corantes e as plantas não tratadas. Com relação aos exsudados, foi obtido diferença apenas nas plantas tratadas com Astrazon vermelho. Este resultado é interessante, pois este corante foi o que apresentou maior susceptibilidade aos efeitos remediativos de *H. annuus*. Uma das bandas observadas no gel desse tratamento tinha massa aparente de por volta de 45 kDa, em que os peso molecular das peroxidases varia de por volta de 30 a 55 kDa (NICOLAS et al., 2003), podendo esta banda indicar uma possível presença de uma peroxidase no exsudado.

De acordo com a literatura, espécimes de *H. annuus* quando expostas a presença de compostos tóxicos, apresentam alteração da atividade de enzimas oxidorreduzases (JOUILLI et al., 2003). Como vários dos corantes têxteis se enquadram como moléculas tóxicas, resolveu-se testar se haveria alteração na modulação das atividades das enzimas de peroxidase, catalase, lacase e superóxido dismutase.

As peroxidases são enzimas que utilizam peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons na catálise da oxidação de diversos substratos, como compostos aromáticos fenólicos e não-fenólicos, íons metálicos e corantes (OGOLA et al., 2015). Estruturas fenólicas estão presentes em vários corantes têxteis, sendo a aplicação de peroxidases na degradação de corantes têxteis bem estudadas (AKHTAR et al., 2005; SOUZA et al., 2007; GOMARE et al., 2008; ROBERTS et al., 2011). De maneira geral, houve uma maior atividade dessa enzima nas folhas das plantas tratadas com os corantes do que nas raízes. Nas raízes, o contato com os corantes, com exceção do Mordente Laranja, ocasionou um aumento no teor de peroxidase em relação às plantas controle. Esse aumento pode ser decorrente do estresse oxidativo ocasionado pelo contato com o corante. Já nas folhas, a maioria dos tratamentos ocasionou aumento na atividade peroxidásica sendo os teores de atividade superiores aos encontrados para as raízes. É possível que isso esteja relacionado à translocação dos corantes

absorvidos para a parte aérea da planta. Devido a sua versatilidade e estabilidade essa enzima apresenta grande potencial de aplicação industrial e na biocatálise ambiental (HOFRICHTER et al., 2010; DUNFORD, 2010; COLPA et al., 2014).

A catalase atua no processo de detoxificação de peróxido de hidrogênio, sendo outra enzima importante em situações de estresse oxidativo (VAFAEI et al., 2013). Nos testes para a avaliação da presença dessa enzima, foi observado que nas raízes o tratamento com o corante Remazol Marinho, um dos mais susceptíveis ao contato com as plantas de *H. annuus*, foi o único que apresentou atividade catalásica aumentada em relação ao controle e demais tratamentos. Já para folhas, o tratamento com Astrazon vermelho foi o que ocasionou o maior aumento. Curiosamente, este foi o corante mais susceptível ao contato com *H. annuus*. É possível então especular que essa enzima está relacionada ao processo de detoxificação da espécie *H. annuus* tornando-a mais apta a degradar esses corantes. As enzimas catalase também podem ser consideradas como marcadores de estresse oxidativo, sendo a indução das suas atividades uma comprovação de que corantes têxteis são responsáveis por esse efeito. Resultados semelhantes já foram relatados em estudos com *Ipomoea aquatica* e *Alternanthera philoxeroides* (RANE et al., 2016; RANE et al., 2015).

As lacases são enzimas que vêm sendo estudadas devido a sua capacidade de degradar vários compostos recalcitrantes, como clorofenóis, hidrocarbonetos poliaromáticos, estruturas relacionadas a lignina, fenóis e corantes sintéticos (ABADULLA et al., 2000; BALDRIAN, 2006). Tais enzimas são caracterizadas por catalisarem a oxidação de diversos substratos, como fenóis e aminas aromáticas, tendo como aceptor de elétrons o oxigênio molecular (BOURBONNAIS et al., 1997; ROBLES et al., 2000). Essas estruturas químicas estão presentes em diversos corantes têxteis, sendo a sua aplicação na degradação de tais corantes já comprovada por vários estudos (KIRBY et al., 2000; ABADULLA et al., 2000; VERMA e MADAMWAR, 2002; TELKE et al., 2011).

Nos testes realizados com a enzima lacase houve um aumento da atividade da enzima nos tecidos vegetais das raízes nos tratamentos com os corantes Remazol

Azul, Levafix Laranja, Astrazon Vermelho e Mordente Laranja, em relação às plantas controle. Essa enzima apresenta grande potencial de aplicação em diversos processos biotecnológicos, devido a sua capacidade de oxidação altamente não-específica, o não requerimento de cofatores e o uso de oxigênio como aceptor de elétrons (ABADULLA et al., 2000; BALDRIAN, 2006).

As enzimas superóxido dismutase fazem parte da primeira linha de defesa das plantas em caso de estresse oxidativo, sendo responsáveis por controlar a quantidade de radicais superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio (HALLIWELL, 2006). Nos testes realizados neste trabalho, o corante Astrazon vermelho induziu o aumento da atividade da enzima superóxido dismutase na raiz. Como já mencionado, esse foi o corante mais susceptível a degradação pela *H. annuus*. Na parte aérea, toda a atividade desta enzima foi reduzida nos tratamentos.

Ao analisar de forma geral os resultados das atividades enzimáticas, nota-se que há irregularidade na indução das enzimas nos tecidos vegetais das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes corantes. O fato da presença de tais enzimas nos diferentes tecidos vegetais e com diferentes intensidades de atividade pode dar um indício da localização tecidual em que cada corante foi armazenado e possivelmente degradado. Tal relação pode ser feita devido ao conhecimento de que a presença de contaminantes causa um estresse na planta, sendo capaz de induzir a produção de enzimas envolvidas na defesa vegetal (JOUILI et al., 2003).

O corante Astrazon vermelho foi o que se demonstrou maior susceptibilidade a atuação das plantas de *H. annuus*, por esse motivo, foi escolhida como modelo para as análises histológicas. Com os resultados obtidos neste ensaio, aparecem indícios sugerindo que há absorção do corante por parte das raízes e uma possível translocação do mesmo, para as partes aéreas. Resultados semelhantes já foram relatados em estudos com *Ipomoea aquatica* e *Alternanthera philoxeroides* (RANE et al., 2016; RANE et al., 2015).

Foi observado no ensaio de toxicidade com náuplios de *A. salina*, que apenas 3 corantes demonstram efeito tóxico, que foi extinguido após o contato com as plantas de

H. annuus. Este resultado é bastante interessante, pois demonstra que a exposição às plantas, não ocasiona apenas o efeito benéfico de descoloração dos corantes, mas também a detoxificação do meio ambiente.

Os resultados obtidos indicam que a planta *H. annuus* apresenta grande potencial para ser utilizada em processos de rizofiltração e detoxificação de efluentes contaminados por corantes têxteis. O fato de ela não ser uma planta aquática não representa um fator negativo, já que o sistema radicular mais fibroso e mais longo das plantas terrestres as torna mais adequadas para a aplicação em processos de rizofiltração (SHARMA e PANDEY, 2014). A estabilidade com relação ao desenvolvimento e produção de biomassa fresca, também pode ser um fator importante no uso desta planta, pois serve como indicativo de sua resistência há ambientes contaminados.

7 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a planta *Helianthus annuus* é capaz de descolorir e detoxificar soluções contendo corantes têxteis a partir do contato com as suas raízes, através do processo de rizofiltração. A planta não apresentou alterações severas nos parâmetros fisiológicos testados, sendo ela resistente a toxicidade dos corantes testados. O resultado mais promissor apresentado foi a capacidade da planta de descolorir 100% da solução do corante astrazon vermelho, em um período de 7 dias. A presença do corante na solução de cultivo de *H. annuus* também foi capaz de induzir o aumento da atividade de algumas enzimas com potencial de aplicação no tratamento de efluentes contaminados com corantes. Com relação ao modo pelo qual ocorre a fitorremediação, há indícios de que a planta absorve o corante por meio das raízes e transporta para outras partes da planta. Contudo, ainda são necessários mais estudos a respeito do mecanismo que a planta utiliza para descolorir essas soluções de corantes e a respeito de parâmetros de toxicidade dos corantes após o tratamento de biorremediação.

REFERÊNCIAS

- ABADULLA, E. et al. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3357-3362, 2000.
- AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; KIRK, T. K. Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. In: **Biotechnology in the pulp and paper industry**. Springer Berlin Heidelberg, 1997. p. 159-195.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C. Phytoremediation of organic contaminants in soils. **Bioresource Technology**, v. 79, p.273-276, 2001.
- BACKES, R. L. *et al.* Desempenho de cultivares de girassol em duas épocas de plantio de safrinha no Planalto Norte Catarinense. **Scientia Agraria**, v. 09, n. 01, p. 41-48, 2008.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases—occurrence and properties. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.
- BERTI, W.R. e CUNNINGHAM, S.D. Phytostabilization of metals: **Phytoremediation of toxic metals using plants to clean up the environment**. Wiley, p. 71-88, 2000.
- BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and bioengineering**, v. 72, n. 5, p. 562-567, 2001.
- BIEN, HS.; STAWITZ, J.; WUNDERLICH, K. Anthraquinone Dyes and Intermediates. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2000.
- BOURBONNAIS, R. et al. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4627-4632, 1997.

- CARLIELL, C. M. et al. Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. **WATER SA-PRETORIA-**, v. 21, p. 61-61, 1995.
- CASTRO. C, de; CASTIGLIONI. V.B.R.; BALLA, A.; LEITE, P.M.V.B. de C.; KAIRAM. D.; MELLO, H.C.; GUEDES. L.C.A.; FARIAS. J,R,B. A cultura do girassol. Londrina, **EMBRAPA-CNPSo**. 1996.
- CHEQUER, F. M. D. et al. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. In: **Eco-friendly textile dyeing and finishing**. InTech, 2013.
- COLPA, D. I.; FRAAIJE, M. W.; VAN BLOOIS, E. DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 1-7, 2014.
- COSTA, S., BERMAN, D., HABIB, R. L. 150 anos da indústria têxtil brasileira. **Rio de Janeiro: Senai-Cetiqt/Texto&Arte**, v. 110, p. 24-28, 2000.
- COUTO, S. R. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 3, p. 227-235, 2009.
- DUNFORD, H. Brian. **Peroxidases and catalases: biochemistry, biophysics, biotechnology and physiology**. John Wiley & Sons, 2010.
- DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied catalysis B: environmental**, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.
- DUSHENKOV, S.; KAPULNIK, Y. Phytoremediation of metals. In: **Phytoremediation of toxic metals using plants to clean up the environment**. Wiley, New York. p. 89-106, 2000.
- ERDEN, E. et al. Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of Remazole Marine Blue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 346-353, 2009.

- FORGACS, E.; CSERHATI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment international**, v. 30, n. 7, p. 953-971, 2004.
- FORGIARINI, E. et al. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 3, p. 1073-1078, 2007.
- FREIRE, R. S. et al. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química nova**, vol.23, n.4, 2000
- FUJITA, R. M. L., JORENTE, M. J. A Indústria Têxtil no Brasil: uma perspectiva histórica e cultural. **ModaPalavra e-periódico**, v. 8, n. 15, p. 153-174, 2015.
- GHOSH, M.; SINGH, S. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. **Asian J Energy Environ**, v. 6, n. 4, p. 18, 2005.
- GOMARE, S. S.; JADHAV, J. P.; GOVINDWAR, S. P. Degradation of sulfonated azo dyes by the purified lignin peroxidase from *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 2, p. 136-143, 2008.
- GRIGORAS, A. G. Catalase immobilization—A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 1-20, 2017.
- GRIFFITHS, J. Introduction: the evolution of present-day dye technology. In: **The Chemistry and Application of Dyes**. Springer US, 1990. p. 1-16.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes Têxteis. **Química Nova**, v.23, n.1, p. 71-78, 2000.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

- HARLEY, C. Knick. Was technological change in the early Industrial Revolution Schumpeterian? Evidence of cotton textile profitability. **Explorations in economic history**, v. 49, n. 4, p. 516-527, 2012.
- HOFRICHTER, M. et al. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 871-897, 2010.
- HUEBNER, Karl. History-150 Years of mauveine. **Chemie in unserer Zeit**. V.40, n. 4, p. 274–275, 2006.
- HUICHENG, X. et al. Phytoremediation of wastewater containing azo dye by sunflowers and their photosynthetic response. **Acta Ecologica Sinica**, v. 32, n. 5, p. 240-243, 2012.
- HUNGER, Klaus (Ed.). **Industrial dyes: chemistry, properties, applications**. John Wiley & Sons, 2007.
- HUSAIN, Q.; JAN, U. Detoxification of phenols and aromatic amines from polluted wastewater by using phenol oxidases. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 59, p. 286–293, 2000. Disponível em: <<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/26576>>. Acesso em: 29 out. 2017.
- JOUILI, H., FERJANI, E. Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, n. 7, p. 639-644, 2003.
- KABRA, A. N. et al. Differential fate of metabolism of a sulfonated azo dye Remazol Orange 3R by plants *Aster amellus* Linn., *Glandularia pulchella* (Sweet) Tronc. and their consortium. **Journal of hazardous materials**, v. 190, n. 1, p. 424-431, 2011.
- KANT, R. Textile dyeing industry an environmental hazard. **Natural science**, v. 4, n. 1, p. 22-26, 2012.

- KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme research**, v. 11, 2011.
- KHANDARE, R. V. et al. The role of *Aster amellus* Linn. in the degradation of a sulfonated azo dye Remazol Red: a phytoremediation strategy. **Chemosphere**, v. 82, n. 8, p. 1147-1154, 2011.
- KOBYA, M. et al. Treatment of levafix orange textile dye solution by electrocoagulation. **Journal of hazardous materials**, v. 132, n. 2, p. 183-188, 2006.
- KUMAR, P. S.; SUGANYA, S. 1 – Introduction to sustainable fibres and textiles. **Sustainable Fibres and Textiles**. US, p. 1–18, 2005.
- LEE, M., YANG, M. Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to remediate uranium contaminated groundwater. **Journal of hazardous materials**, v. 173, n. 1, p. 589-596, 2010.
- LI, X. et al. Effect of cadmium on photosynthetic pigments, lipid peroxidation, antioxidants, and artemisinin in hydroponically grown *Artemisia annua*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 8, p. 1511-1518, 2012.
- LIU, H. et al. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 176, n. 3, p. 375-382, 2009.
- MARMION, D.M. 1991. Handbook of US colorants. Foods, drugs, cosmetics and medical devices. **Toxicol**, v. 31, n. 1, p. 93, 1993.
- MARQUES, A. P. et al. Inoculating *Helianthus annuus* (sunflower) grown in zinc and cadmium contaminated soils with plant growth promoting bacteria—Effects on phytoremediation strategies. **Chemosphere**, v. 92, n. 1, p. 74-83, 2013.
- MATHIAS, H. G. Algodão no Brasil. Rio de Janeiro: **Editores Index**, 1988.

- MEYER, U. Biodegradation of Synthetic Organic Colorants. In: Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds, Leisinger, T., R. Hutte, A.M. Cook and J. Nuesch (Eds.). **Academic Press**, London, UK., 1981, p. 371-385.
- MOHAN, S. V. et al. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. **Chemosphere**, v. 58, n. 8, p. 1097-1105, 2005.
- MUKHTAR, S. et al. Potential of sunflower (*Helianthus annuus*) for phytoremediation of nickel (Ni) and lead (Pb) contaminated water. **Pak. J. Bot.**, v.42, n 6, p.4017-4026, 2010.
- NANNIPIERI, P.; KANDELER, E.; RUGGIERO, P. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. **Enzymes in the environment. Marcel Dekker, New York**, p. 1-33, 2002.
- NEHNEVAJOVA, E.; HERZIG, R.; FEDERER, G.; Karl-Hans ERISMANN, K.; SCHWITZGUÉBEL, J. Screening of sunflower cultivars for metal phytoextraction in a contaminated field prior to mutagenesis. **International Journal of Phytoremediation**, v. 7, n. 4, p. 337-349, 2005.
- NICOLAS, J.; BILLAUD, C.; PHILIPPON, J.; ROUET-MAYER, M.A. BROWNING | Enzymatic – Biochemical Aspects, In **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, Academic Press, Oxford, p. 678-686. 2003
- NYANHONGO, G. S. et al. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Research**, v. 36, n. 6, p. 1449-1456, 2002.
- OGOLA, H. J. O. et al. Explorations and Applications of Enzyme-linked Bioremediation of Synthetic Dyes. In: **Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil**. InTech, 2015.

- PATIL, A. V.; JADHAV, J. P. Evaluation of phytoremediation potential of *Tagetes patula* L. for the degradation of textile dye Reactive Blue 160 and assessment of the toxicity of degraded metabolites by cytogenotoxicity. **Chemosphere**, v. 92, n. 2, p. 225-232, 2013.
- PETERS, R. H. **Textile chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1963.
- PIECHALAK, A. et al. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. **Phytochemistry**, v. 60, n. 2, p. 153-162, 2002.
- PRZYSTAŚ, W.; ZABŁOCKA-GODLEWSKA, E.; GRABIŃSKA-SOTA, E. Biological removal of azo and triphenylmethane dyes and toxicity of process by-products. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 4, p. 1581-1592, 2012.
- RANE, N. R. et al. Ipomoea hederifolia rooted soil bed and Ipomoea aquatica rhizofiltration coupled phytoreactors for efficient treatment of textile wastewater. **Water research**, v. 96, p. 1-11, 2016.
- RANE, N. R. et al. Phytoremediation of sulfonated Remazol Red dye and textile effluents by *Alternanthera philoxeroides*: an anatomical, enzymatic and pilot scale study. **Water research**, v. 83, p. 271-281, 2015.
- RASKIN, I. et al. Bioconcentration of heavy metals by plants. **Current Opinion in biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 285-290, 1994.
- RIBIĆ, V. R.; STOJANOVIĆ, S. Đ.; ZLATOVIĆ, M. V. Anion- π interactions in active centers of superoxide dismutases. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.
- ROBERTS, J. N. et al. Characterization of dye-decolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1. **Biochemistry**, v. 50, n. 23, p. 5108-5119, 2011.
- ROBLES, A. et al. Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 484-490, 2000.

- RULKENS, W. H.; TICHY, R.; GROTENHUIS, J. T. C. Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 27-35, 1998.
- SCHMÖGER, M. E. V.; OVEN, M.; GRILL, E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiology**, v. 122, n. 3, p. 793-802, 2000.
- SHARMA, P.; PANDEY, S. Status of phytoremediation in world scenario. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 2, n. 4, p. 178-191, 2014.
- STEIN, S. J. Origens e evolução da indústria têxtil no Brasil – 1850/1950. Rio de Janeiro: **Editora Campus LTDA**, 1979.
- STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 69-80, 2001.
- SULAK, M. T.; DEMIRBAS, E.; KOBYA, M. Removal of Astrazon Yellow 7GL from aqueous solutions by adsorption onto wheat bran. **Bioresource technology**, v. 98, n. 13, p. 2590-2598, 2007.
- TELKE, A. A. et al. Biochemical characterization of laccase from hairy root culture of Brassica juncea L. and role of redox mediators to enhance its potential for the decolorization of textile dyes. **Planta**, v. 234, n. 6, p. 1137-1149, 2011.
- TORBATI, S.; KHATAEE, A. R.; MOVAFEGHI, A. Application of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) for biotreatment of a textile dye: Investigation of some physiological responses and effects of operational parameters. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 10, p. 1934-1941, 2014.
- VAF AEI, F. et al. Potential of *Hydrocotyle vulgaris* for phytoremediation of a textile dye: Inducing antioxidant response in roots and leaves. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 93, p. 128-134, 2013.
- VAF AEI, F.; MOVAFEGHI, A.; KHATAEE, A. Evaluation of antioxidant enzymes activities and identification of intermediate products during phytoremediation of

an anionic dye (CI Acid Blue 92) by pennywort (*Hydrocotyle vulgaris*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 11, p. 2214-2222, 2013.

- VANDEVIVERE, P. C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and Reuse of Wastewater from the Textile Wet-Processing Industry: Review of Emerging Technologies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 289-302, 1998.
- VENCESLAU, M.; STEPHENSON, T.; JUDD, S. J. Characterization of textile wastewaters - a review. **Environmental technology**, v. 15, n. 10, p. 917-929, 1994.
- WATHARKAR, A. D.; JADHAV, J. P. Detoxification and decolorization of a simulated textile dye mixture by phytoremediation using *Petunia grandiflora* and *Gailardia grandiflora*: a plant–plant consortial strategy. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 103, p. 1-8, 2014.
- WELINDER, K. G.; MAURO, J. M.; NØRSKOV-LAURITSEN, L. **Structure of plant and fungal peroxidases**. V. 20, n. 2, p. 337-340, 1992.
- WILTSE, C. C., ROONEY, W.L., CHEN, Z., SCHWAB, A.P., BANKS, M.K. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. **Journal of Environmental Quality**, v. 27, n. 1, p. 169-173, 1998.
- ZHOU, X.; XIANG, X. Effect of different plants on azo-dye wastewater biodecolorization. **Procedia Environmental Sciences**, v. 18, p. 540-546, 2013.
- ZOLLIGER, H. Synthesis, Properties of Organic Dyes and Pigments. In: Color Chemistry. New York, USA: **VCH Publishers**, p. 92-102, 1987.