

Respostas antioxidativas à acumulação de As, Pb e Zn em *Cistus ladanifer* L. na Mina de São Domingos: Implicações na fitorremediação

Santos, E. S.^{1*}; Nabais, C.²; Abreu, M. M.³; Saraiva, J.⁴

^{1*} Fac. de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve, Faro. E-mail: ekra@portugalmail.pt

² Dep. de Botânica, Universidade de Coimbra, Coimbra. E-mail: crnabais@bot.uc.pt

³ Dep. de Ciências do Ambiente, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa (TULisbon), Tapada da Ajuda. E-mail: manuelaabreu@isa.utl.pt

⁴ Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro. E-mail: jsaraiva@dq.ua.pt

* autor para contacto

Resumo

A actividade mineira pode gerar distintos impactos negativos nos ecossistemas, nomeadamente, o aumento dos teores de metais pesados nos solos envolventes. O stress oxidativo é uma consequência importante da exposição das plantas a estes elementos. Este estudo teve como objectivo determinar o potencial de acumulação de As, Pb, Zn e as respostas antioxidativas de *Cistus ladanifer* L. (esteva), para avaliar a sua aplicação em programas de fitorremediação. Compararam-se populações de *C. ladanifer* da mina de São Domingos e de dois locais não contaminados (Pomarão e Serra do Caldeirão). As estevas desenvolvem-se nos solos muito contaminados e apresentam teores elevados de As, Pb e Zn nas folhas. A actividade das enzimas antioxidativas (catalase, peroxidase e superóxido dismutase) é diferente consoante a tolerância de cada população e específica para cada elemento. A população de São Domingos apresentou menor sensibilidade aos teores elevados dos elementos nas folhas. Este estudo mostrou que o *C. ladanifer* pode ter elevada potencialidade para utilização em programas de fitorremediação devido ao seu carácter espontâneo e tolerância às condições extremas dos solos das áreas mineiras.

Introdução

A contaminação do solo é um problema que tem atraído, nas últimas décadas, considerável atenção das populações e da comunidade científica em geral. Os elementos químicos classificados como vestigiais (metais e metalóides) existentes no solo podem ter uma origem geogénica e por isso natural ou em actividades humanas, nomeadamente, a actividade mineira. Em Portugal, a exploração mineira é antiga, havendo indícios, designadamente na mina de São Domingos, anteriores à ocupação Romana, porém o seu desenvolvimento intensivo ocorreu a partir da revolução industrial até meados do século XX. Este tipo de actividade pode conduzir à acumulação, em escombreciras, de materiais da rocha encaixante e produtos residuais resultantes da extração do minério, os quais são, muitas vezes, ainda ricos em elementos contaminantes. Deste modo, os solos adjacentes das áreas mineiras podem estar sujeitos a impactos de natureza diversa que poderão conduzir à alteração das suas propriedades físico-químicas e mineralógicas. Além disso, o teor de metais pesados disponíveis para as plantas depende de parâmetros vários, entre os quais a própria constituição química e mineralógica dos solos. Assim, a contaminação dos solos, sedimentos e águas dessas áreas e a consequente degradação da paisagem, com perda de biodiversidade, são efeitos com forte probabilidade de ocorrer (Wong, 2003; Tordoff *et al.*, 2000).

Apesar da contaminação afectar as espécies vegetais, o seu uso pode ser uma alternativa para a recuperação de ambientes degradados devido à capacidade de acumulação ou de tolerância das plantas (Salt *et al.*, 1995). Autores como Flathman e Lanza (1998) e Yoon *et al.* (2006) consideram que a fitorremediação com espécies autóctones pode ser mais eficiente e económica na reabilitação das áreas mineiras, devido a estas já serem tolerantes aos stresses ambientais aí existentes. O estudo destas comunidades pode pois ser essencial para uma boa gestão ambiental, com a utilização das espécies na remediação de áreas contaminadas.

De igual forma, como para outras formas de stresse, a resposta das plantas à absorção de metais pesados baseia-se na alteração da concentração ou da actividade de enzimas antioxidativas (Pandey *et al.*, 2005). A catalase, peroxidase, superóxido dismutase, entre muitas outras enzimas, são importantes agentes envolvidos na tolerância ao stress oxidativo, tanto a nível celular como sub-celular (Foyer *et al.*, 1997).

Neste trabalho foi feito um estudo comparativo do teor de As, Pb e Zn e da actividade de algumas enzimas antioxidativas (catalase, guaiacol peroxidase e superóxido dismutase) em plantas de *Cistus ladanifer* L. desenvolvidas numa área mineira e em duas áreas não contaminadas, de modo a avaliar a sua potencial utilização em fitorremediação.

Materiais e Métodos

Amostras de solo (horizonte superficial) e folhas, com diferentes níveis de desenvolvimento (jovens, maduras e senescentes), de *Cistus ladanifer* foram colhidas na Primavera de 2005 na área mineira de São Domingos e em duas áreas não contaminadas: Serra do Caldeirão e a cerca de 2 km do Pomarão.

Nas amostras de solo (fracção <2 mm) foi quantificado o teor total de As, Pb e Zn, por ICP-EAS e INAA após digestão ácida. Determinaram-se ainda aqueles elementos na fracção disponível após extracção com DTPA (Lindsay e Norvell, 1978) e com nitrato de cálcio, esta baseada na extracção com soluções de sais (Kabata-Pendias, 2004). Os mesmos elementos químicos foram quantificados nas folhas de esteva após digestão ácida com ácido nítrico. A análise das soluções resultantes da extracção da fracção disponível no solo e da digestão das folhas foi efectuada em espectrofotometria de absorção atómica em chama (Zn), em câmara de grafite (Pb) ou através do método de geração de hidretos (As).

De modo a poder analisar as formas ligantes das enzimas realizou-se uma extracção sequencial onde se obteve a fracção de enzimas solúveis e a fracção de enzimas ligadas ionicamente à parede celular (Pang *et al.*, 2003; Ingham *et al.*, 1998). A determinação da actividade enzimática resultou da adaptação de alguns métodos descritos, nomeadamente por: Wong e Whitaker (2003) e Chance e Maehly (1955), para a catalase; Yuan e Jiang (2003) e Chance e Maehly (1955), para a guaiacol peroxidase e Sun e Zigman (1977) e Khopde *et al.* (2001), para a superóxido dismutase.

Resultados e discussão

Nos solos da mina de São Domingos os teores totais dos elementos foram elevados atingindo valores de aproximadamente 3 g As kg⁻¹ e 9 g Pb kg⁻¹. Para as restantes áreas de amostragem o teor total foi inferior a 20 mg kg⁻¹ e 67 mg kg⁻¹, respectivamente para o As e Pb. Assim, a concentração total destes elementos na mina

de São Domingos ultrapassou os limites considerados como tóxicos, por Kabata-Pendias e Pendias (1985), para a maioria dos organismos (As: 5-10 mg kg⁻¹; Pb: 100-400 mg kg⁻¹) e os indicados pela legislação portuguesa (Pb: 50 mg kg⁻¹ para solos com pH ≤ 5,5; Decreto-Lei nº 236/98) ou de outros países da Europa (As: 30-500 mg kg⁻¹). Deste modo, torna-se indispensável a remediação dos solos desta área mineira. Os teores totais de Zn nos solos das distintas áreas de amostragem foram similares entre si, sendo que os obtidos em São Domingos apresentaram os menores teores (< 57 mg kg⁻¹), como consequência do Zn ter sido um dos elementos extraídos da mineralização.

O conteúdo As, Pb e Zn nas folhas de São Domingos e Pomarão teve a mesma tendência, isto é um aumento da concentração ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento, porém os teores máximos de São Domingos atingiram valores mais altos (As: 4,26 mg kg⁻¹; Pb 65,31 mg kg⁻¹; Zn 184,51 mg kg⁻¹). Este facto, pode dever-se aos solos de São Domingos apresentarem maior quantidade destes elementos na fracção disponível (As: 0,23 mg kg⁻¹; Pb: 43,16 mg kg⁻¹; Zn: 5,00 mg kg⁻¹). Em alguns casos, no Caldeirão o teor destes elementos nas folhas foi maior que o obtido, no mesmos tipo de folhas, colhidas no Pomarão (teor de Pb e As nas folhas novas; teor de Zn nas folhas novas e maduras). A quantidade disponível no solo ou a distinta mobilidade dos elementos dentro das plantas do Caldeirão podem ser factores relacionados com este facto.

O teor elevado destes elementos vestigiais pode induzir stresse oxidativo nas plantas de *C. ladanifer* devido ao aumento dos radicais livres. O estudo da distribuição da actividade enzimática pelo citoplasma (fracção solúvel) ou pela parede celular ou membrana de alguns organelos (fracção iónica) pode contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de tolerância face a teores elevados dos elementos químicos nas plantas. Assim, a variação da actividade de cada uma das enzimas face aos diferentes elementos revelou uma resposta específica das enzimas e formas ligantes para cada elemento, nomeadamente:

1. Nas folhas de São Domingos - a actividade da catalase e peroxidase na fracção solúvel associou-se com os teores de Zn porém, o comportamento enzimático com o desenvolvimento das folhas foi inverso. A actividade da catalase aumentou enquanto que a actividade da peroxidase diminuiu face às concentrações de Zn;

2. Nas folhas do Pomarão – a actividade da superóxido dismutase em ambas as fracções diminuiu com o desenvolvimento das folhas contudo, o elemento indutor foi distinto (fracção solúvel: Pb; fracção iónica: Zn).

Por outro lado, também foram observadas diferenças significativas entre as respostas antioxidativas de folhas colhidas nas distintas áreas de amostragem. Estas respostas podem depender da sensibilidade da população, pois a mesma concentração de um elemento induziu um funcionamento diferente das enzimas. Assim, a população de São Domingos pareceu demonstrar menor sensibilidade ao elevado teor de elementos nas folhas já que, concentrações de Zn e As consideradas tóxicas para a generalidade das plantas não induziram, na espécie estudada, a inibição da actividade enzimática. Para as populações do Caldeirão e Pomarão a presença de concentrações mais baixas dos mesmos elementos, relativamente às obtidas para São Domingos, provocou o declínio da actividade das enzimas.

Conclusões

Os elevados níveis de contaminação relativamente ao As e Pb na mina de São Domingos parecem não afectar a sobrevivência das plantas de *Cistus ladanifer* devido ao eficiente funcionamento das enzimas antioxidativas. A existência espontânea das estevas na mina de São Domingos permite assegurar a eficácia do processo de fitorremediação já que, esta espécie parece também ser tolerante às características físico-químicas dos solos da área mineira, nomeadamente baixa fertilidade e disponibilidade de água. Pode-se considerar que esta espécie arbustiva apresenta um elevado potencial de utilização na fitorremediação de áreas mineiras podendo contribuir para a redução da degradação ambiental.

Referências bibliográficas

- Chance, B.; Maehly, A. C. (1955), Assay of Catalases and Peroxidases, *Methods in Enzymology* 2, 764-817.
- Flathman, P. E.; Lanza, G. R. (1998), Phytoremediation: Current Views on Emerging Green Technology. *Journal of Soil Contamination* 7, 415-432.
- Foyer, C. H.; Lopez-Delgado, H.; Dat, J. F.; Scott, I. M. (1997), Hydrogen Peroxide and Glutathione associated Mechanisms of Acclamatory Stress Tolerance and Signaling, *Physiologia Plantarum* 100, 241-254.
- Ingham, L. M.; Parker, M. L.; Waldron, W. (1998), Peroxidase: Changes in Soluble and Bound Forms during Maturation and Ripening of Apples, *Physiologia Plantarum* 102, 93-100.

- Kabata-Pendias, A. (2004), Soil-plant Transfer of Trace Elements – an Environmental Issue, *Geoderma* 122, 143-149.
- Kabata-Pendias, A.; Pendias, H. (1985), *Trace Elements in Soil and Plants*, CRC Press, Boca Raton, Londres, 315.
- Khopde, s. M.; Priyadarsini, K. I.; Mohan, H.; Gawandi, V. B.; Satav, J. G.; Yakhmi, J. V.; Banavaliker, M. M.; Biyani, M. K.; Mittal, J. P. (2001), Characterizing the Antioxidant Activity of Amla (*Phyllanthus emblica*) Extract, *Current Science* 81, 185-190.
- Lindsay, W. L.; Norvell, W. A. (1978), Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese and Copper, *Soil Science* 42, 421-428.
- Pandey, V.; Dixit, V.; Shyam, R. (2005), Antioxidative Responses in Relation to Growth of Mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) Plants Exposed to Hexavalent Chromium, *Chemosphere* 31, 40-47.
- Pang, J.; Chan, G. S. Y.; Zhang, J.; Liang, J.; Wong, M. H. (2003), Physiological Aspects of Vertiver Grass for Rehabilitation in Abandoned Metalliferous Mine Wastes, *Chemosphere* 52, 1559-1570.
- Sun, M.; Zigman, S. (1977), An Improved Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on Epinephrine Autoxidation, *Analytical Biochemistry* 90, 81-89.
- Taylor, R. W.; Ibeabuchi, I. O.; Sistani, K. R.; Shuford, J. W. (1992), Accumulation of some Metals by Legumes and their Extractability from Acid Mine Spoils, *Journal of Environmental Quality* 21, 176-180.
- Tordoff, G. M.; Baker, A. J. M.; Willis, A. J. (2000), Current Approaches to the Revegetation and Reclamation of Metalliferous Mine Wastes, *Chemosphere* 41, 219-228.
- Wong, D. W. S.; Whitaker, J. R. (2003), Catalase. In: Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. (2003), *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker, Inc., Nova York, 389-401.
- Wong, M. H. (2003), Ecological Restoration of Mine Degraded Soils with Emphasis on Metal Contaminated Soils, *Chemosphere* 50, 775-780.
- Yoon, J.; Cao, X.; Zhou, Q.; Ma, L. Q. (2006), Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site, *Science of the Total Environment* 368, 456-464.
- Yuan; Jiang (2003), Peroxidase. In: Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. (2003), *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker, Inc., Nova York, 389.