

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
ENGENHARIA AMBIENTAL

**Matheus Augusto de Souza Moura**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FITORREMEDIAÇÃO DE OCTOCRILENO  
POR *Salvinia biloba* Raddi Emend La sota.**

CAMPO MOURÃO  
2022

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
ENGENHARIA AMBIENTAL

MATHEUS AUGUSTO DE SOUZA MOURA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FITORREMEDIAÇÃO DE OCTOCRILENO  
POR *Salvinia biloba* Raddi Emend La sota.**

**EVALUATION OF THE PHYTORREMEDICATION ABILITY OF OCTOCRYLENE BY  
*Salvinia biloba* Raddi Emend La sota.**

Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Engenharia Ambiental, do Departamento Acadêmico de Ambiental (DAAMB), do Câmpus Campo Mourão, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Orientador: Prof. Dr. Debora Cristina de Souza

CAMPO MOURÃO  
2022



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**MATHEUS AUGUSTO DE SOUZA MOURA**

**Avaliação da capacidade de fitorremediação de octocrileno por *Salvinia biloba*  
Raddi Emend La sota**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 02/maio/2022

---

\_\_\_\_\_ Debora Cristina de Souza  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

\_\_\_\_\_ Ana Paula Peron  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

\_\_\_\_\_ Elizabete Satsuki Sekine  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CAMPO MOURÃO  
2022

## Resumo

O octocrileno está presente em diversos tipos de produtos cosméticos e de cuidados pessoais que são usados em todo o mundo. O uso regular desses produtos faz com que diferentes compostos sejam liberados na água e no solo tornando-os potenciais contaminantes a diferentes ecossistemas. Grande parte desses compostos são classificados como poluentes emergentes por não estarem incluídos em programas de monitoramento ambiental, uma vez que a extensão dos riscos que eles representam ao meio ambiente ainda não é clara, Com base nisso este TCC busca verificar por meio de análises de atividades enzimáticas e Análise de toxicidade em *Allium cepa*, se *Salvinia biloba* La sota apresenta potencial para tratar contaminação de octocrileno nas concentrações de 200 µg/L, 400 µg/L e 600 µg/L. Com os resultados das análises feitas as 24h, 48h e 96h do experimento observamos que as atividades das enzimas catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e superóxido dismutase indicam que *S. biloba* combateu o octocrileno em seu sistema fisiológico. As análises de clorofila confirmam o estresse sofrido pela planta. Ainda a análise de toxicidade em *A. cepa* na solução após tratamento indicam a contaminação de *A. cepa*, com a análise de todos estes dados podemos dizer que a *Salvinia biloba* La Sota não tem capacidade de tratar octocrileno, apenas de suportar a exposição ao contaminante.

**Palavras - chave: substâncias emergentes, fitotratamento, macrófitas aquáticas**

## **Abstract**

Octocrylene is present in many types of cosmetic and personal care products that are used around the world. The regular use of these products causes different compounds to be released in water and soil, making them potential contaminants in different ecosystems. Most of these compounds are classified as emerging pollutants because they are not included in environmental monitoring programs, since the extent of the risks they pose to the environment is still unclear. Based on this, this TCC seeks to verify through activity analysis enzymatic and Toxicity analysis in *Allium cepa*, whether *Salvinia biloba* La Sota has the potential to treat octocrylene contamination at concentrations of 200 µg/L, 400 µg/L and 600 µg/L. With the results of the analyzes carried out at 24h, 48h and 96h of the experiment, we observed that the activities of the enzymes catalase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase indicate that *S. biloba* fought octocrylene in its physiological system. Chlorophyll analyzes confirm the stress suffered by the plant. Even the analysis of toxicity in *A. cepa* in the solution after treatment indicates the contamination of *A. cepa*, with the analysis of all these data we can say that *Salvinia biloba* La Sota does not have the capacity to treat octocrylene, only to withstand exposure to the contaminant .

**Keywords: emerging substances, phytotreatment, aquatic macrophytes**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural do octocrileno.....	10
Figura 2 - Síntese das propriedades químicas do octocrileno.....	11
Figura 3 - Indivíduos de <i>Salvinia biloba</i> Raddi emend. de La Sota.....	14
Figura 4 - Parque Joaquim Teodoro de Oliveira Campo Mourão.....	15
Figura 5 - Espectrofotômetro de UV-VIS.....	17
Figura 6 - Cubeta utilizada para a leitura no espectrofotômetro.....	18
FIGURA 7 - Cubeta utilizada para a leitura no espectrofotômetro para a análise de SOD.....	21
FIGURA 8 - Extração do Pigmento de clorofila com o auxílio do grau e do pistilo.....	23
Figura 9 - Resultados da análises enzimáticas de raízes e folhas de <i>Salvinia biloba</i> em soluções de octocrileno: a) Catalase raízes, b) Catalase folhas, c) Ascorbato Peroxidase raízes, d) Ascorbato Peroxidase folhas, e) Guaiacol Peroxidase raízes, f) Guaiacol Peroxidase folhas, g) Superóxido dismutase raízes, h) Superóxido dismutase folhas.....	27
Figura 10 - Resultados da análises de clorofila a, b e c <i>Salvinia biloba</i> Raddi emend. de La Sota em soluções de octocrileno.....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índices mitóticos de meristemas de raízes provenientes de bulbos de <i>Allium cepa</i> L. expostos por 120 horas a Octocrileno, em três concentrações, antes (0 hora) e após fitotratamento em diferentes tempos de exposição (24, 48 e 96 horas).....	29
Tabela 2 - Índices de alterações celulares de meristemas de raízes provenientes de bulbos de <i>Allium cepa</i> L. expostos por 120 horas Octocrileno, em duas concentrações, antes (0h) e após fitotratamento em diferentes tempos de exposição (24, 48 e 96 h).....	29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>8</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>8</b>
<b>4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>9</b>
<b>4.1 Descrição de Poluentes Emergentes.....</b>	<b>9</b>
<b>4.2 Descrição de Octocrileno.....</b>	<b>10</b>
<b>4.3 Descrição de Biorremediação.....</b>	<b>11</b>
<b>4.4 Descrição de Fitorremediação.....</b>	<b>12</b>
<b>4.5 Descrição de Macrófitas Aquáticas.....</b>	<b>12</b>
4.5.1 Descrição de <i>Salvinia biloba</i> Raddi emend. de La Sota.....	13
<b>4.6 Descrição de Mecanismos de Defesa das Plantas.....</b>	<b>14</b>
<b>5. METODOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
<b>5.1 Área de Estudo e Coleta.....</b>	<b>15</b>
<b>5.2 Experimento.....</b>	<b>16</b>
5.2.1 Preparação do Extrato Enzimático.....	16
5.2.2 Determinação da Atividade Enzimática da Catalase =CAT.....	16
5.2.3 Determinação da Atividade Enzimática da Ascorbato Peroxidase =APX.....	18
5.2.4 Determinação da Atividade Enzimática da Guaiacol Peroxidase =GPOX.....	19
5.2.5 Determinação da Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase = SOD.....	19
5.2.6 Cálculo de Atividades Enzimáticas.....	22
5.2.7 Determinação da Clorofila.....	22
<b>5.3 Obtenção e Enraizamento de Bulbos.....</b>	<b>24</b>
5.3.1 Avaliação de Citotoxicidade e Genotoxicidade.....	24
<b>5.4 Análise de Dados.....</b>	<b>25</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O octocrileno está presente em diversos tipos de produtos cosméticos e de cuidados pessoais que são usados em todo o mundo. O uso regular desses produtos faz com que diferentes compostos sejam liberados na água e no solo tornando-os potenciais contaminantes a diferentes ecossistemas. Grande parte desses compostos são classificados como poluentes emergentes por não estarem incluídos em programas de monitoramento ambiental (SCALIA; MEZZENA, 2009).

Para resolver casos de contaminação em corpos hídricos, a comunidade científica e acadêmica está sempre buscando meios de remediação. Um deles é a possibilidade do uso de plantas, advindas da biorremediação, que vem crescendo ao longo dos anos, tornando-se uma alternativa emergente para restauração das áreas contaminadas (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005)

Em suma, o método que utiliza as plantas como forma de remediação de metais pesados é denominado fitorremediação. As macrófitas aquáticas são as mais aplicadas, sendo necessário avaliar a disponibilidade dos indivíduos da região e testar se sobreviveriam em outro ambiente, uma vez que as respostas podem variar (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2014).

As macrófitas aquáticas utilizadas vão desde espécies flutuantes às emergentes apresentando grande potencial de descontaminação e melhoria da qualidade da água. Vale ressaltar, que cada espécie reage de forma diferente a cada tipo de poluentes (FERREIRA et al., 2016).

Este trabalho verificar a capacidade de sobrevivência de *S. biloba* em solução de 200 µg/L, 400 µg/L e 600 µg/L de octocrileno, o efeito do octocrileno sobre o metabolismo da planta através de análises enzimáticas, o efeito do octocrileno na fisiologia de *S. biloba* por meio de alterações na quantidade de clorofila foliar ao longo do experimento e a toxicidade de octocrileno em *Allium cepa* da solução após tratamento com *S. biloba*.

Assim com os dados obtidos foi feita os gráficos representados pelas ilustrações 9 e 10 e as tabela, que indicam as capacidade da *S. biloba* com relação aos objetivos tratados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial de fitorremediação, em pequena escala, de *Salvinia biloba* Raddi Emend. de La Sota imersa em solução de octocrileno.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade de sobrevivência de *S. biloba* em solução de 200 µg/L, 400 µg/L e 600 µg/L de octocrileno;
- Verificar o efeito do octocrileno sobre o metabolismo da planta através de análises enzimáticas.
- Verificar o efeito do octocrileno na fisiologia de *S. biloba* por meio de alterações na quantidade de clorofila foliar ao longo do experimento.
- Verificar toxicidade em *Allium cepa* da solução após tratamento com *S. biloba*.

## 3 JUSTIFICATIVA

O trabalho foi proposto sob justificativa da ameaça dos poluentes emergentes, substâncias presentes em uma série de produtos e que entram de maneira constante no ambiente e que não são removidas pela maioria das estações de tratamento (SOARES; SOUZA, 2020). A pesquisa ainda é de interesse público pela carência de legislações que tratam de limites para o lançamento do composto (SOUZA; SOUZA, 2016), em especial no contexto ambiental atual (2022) do país, que nunca foi exemplar, mas se agravou com medidas recentes de ganho econômico rápido e concessões.

A escolha do octocrileno foi pela possibilidade de se obtê-lo em sua forma pura e pelo fato de estar presente em diversos tipos de protetores solares. *Salvinia biloba* Raddi emend. de La Sota é conhecida por sua capacidade fitotratadora por isso se mostrou uma espécie de interesse para esse estudo. O uso da cebola (*Allium cepa* L.) foi motivado por ser um teste aceito mundialmente como indicador de alterações genômicas e pela praticidade em lidar com plantas como

organismos-teste, seja pela facilidade de aquisição, manutenção de bulbos e sementes, logística de espaço ou duração do experimento. Além disso, foram considerados aspectos técnicos como a presença de uma região de intensa proliferação celular e cromossomos em número reduzido e de fácil visualização (KURAS et al., 2006).

## **4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **4.1 Descrição de Poluentes Emergentes**

Os poluentes emergentes aparecem principalmente em produtos farmacêuticos, estéticos, drogas ilícitas, agroquímicos, artigos de limpeza e polimento, tintas e vernizes, retardantes de chamas e nano e micro plásticos (HESPANHOL, 2015). Alguns exemplos que podemos citar vão desde remédios mais populares como antibióticos, analgésicos e anti-inflamatórios, até drogas psiquiátricas, reguladores lipídicos,  $\beta$ -bloqueadores e contraceptivos e de cuidados (BELL et al., 2011).

Os métodos convencionais das estações de tratamento de esgoto (ETEs) não são eficientes para a remoção dessas substâncias pois as ETEs, em geral, contam apenas com o tratamento primário, que consiste em etapas de separação físico químicas para remoção de sólidos suspensos, e tratamento secundário para matéria orgânica (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015) pois normalmente são formados por longas cadeias carbônicas o que é um agravante por dar a eles baixa solubilidade em água e caráter persistente em outros segmentos como solo, sedimentos e mesmo partículas atmosféricas, além de muitos microrganismos não possuem enzimas necessárias para sua deterioração (CALVO-FLORES; ISAC-GARCIA; DOBADO, 2018), sendo um exemplos de poluentes emergentes de alta complexidade estrutural e dificuldade de remoção o corante tartrazina  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$  (FREITAS, 2012) e o conservante triclosan  $C_{12}H_7Cl_3O_2$  (TIBURTIUS; SCHEFFER, 2014).

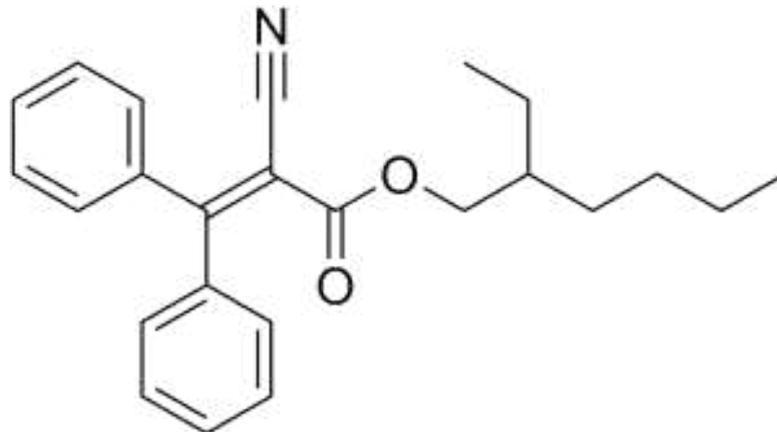
Por causa da baixas concentrações de despejo impediram que os poluentes emergentes fossem detectados e quantificados até pouco tempo (BELL et al., 2011), contribuíram para que seu entendimento permanece inconclusivo e não fossem incluídos em regulamentos ou programas de monitoramento (TANG et al., 2019), o que tem mudado com o passar do tempo onde novas técnicas analíticas avançadas

foram surgindo e sendo cada vez mais aplicadas, como as que combinam o poder de separação da cromatografia líquida com a capacidade de análise sensível da espectrometria de massa (CALDAS et al., 2019; FOLARIN et al., 2019).

#### 4.2 Descrição de Octocrileno

O octocrileno é classificado como um éster, que são compostos derivados dos ácidos carboxílicos onde ocorre a substituição do hidrogênio da carboxila ( $-\text{COOH}$ ) por um grupo orgânico (Figura 1). Em sua forma pura, ele se apresenta como um líquido de aspecto viscoso e amarelado (BROOKE; BURNS; CROOKES, 2008), com registro de identificação no Chemical Abstract Service (CAS) de número 6197-30-4 e fórmula molecular  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_2$  (Figura 2).

Figura 1 - Fórmula estrutural do octocrileno.



Fonte: fciência 2014

Entre suas propriedades químicas estão peso molecular de 361,49 g/mol; densidade de 1,051 g/cm<sup>3</sup>; baixa solubilidade em água de 0,0013 g/L a 20 °C; caráter pouco volátil com ponto de ebulição de 218 °C, e ponto de fusão de 14 °C (BROOKE; BURNS; CROOKES, 2008).

Seu elevado coeficiente de partição octanol-água (log Kow) de 6,88, que é uma constante adimensional referente à hidrofobicidade (MARGOT et al., 2015), tida como alta se log Kow > 4,0 (ROGERS, 1996), atestam seu comportamento lipofílico, com fácil associação à gorduras, óleos e lipídeos (BAKER; HORBURY; STAVROS, 2016), e reforçam sua pouca biodegradabilidade. Mesmo limitado à proporção máxima de 10% nas composições, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 69 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que

segue os mesmos parâmetros adotados no mundo todo, ele tem sido registrado constantemente em matrizes ambientais.

Figura 2 - Síntese das propriedades químicas do octocrileno

Propriedade	Valor
CAS	6197-30-4
Ponto de fusão (°C)	14
Fórmula molecular	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub>
Ponto de ebulição (°C)	218
Peso molecular (g/mol)	361,49
Solubilidade em água a 20 °C	0,0013
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,051
Coefficiente de partição octanol-água (log Kow)	6,88

Fonte: Adaptado de Brooke, Burns e Crookes (2008)

Ao redor do mundo o octocrileno ele foi observado por Kameda, Kimura e Miyazaki (2011), que mediram bloqueadores solares, incluindo filtros UV e estabilizadores de luz em rios, quatro efluentes e três lagos no Japão, e apesar de encontrado em poucas amostras de água foram encontradas na amostra níveis de contaminação entre 1 e 14 ng/L, esteve presente em todas as de sedimentos entre 0,4 e 635 µg/kg, geralmente associado ao fixador Galaxolide®.

Depois, Kaiser et al. (2012), estudando sete dos filtros mais utilizados em sedimentos da Alemanha por seis meses, encontraram o octocrileno como principal contaminante, em concentrações que chegavam até 642 µg/kg. No Mar Mediterrâneo, Amine et al. (2012), ao longo de áreas costeiras com possibilidade de ocorrer de lixiviados e efluentes sem tratamento, selecionaram rios impactados e os compararam com pontos de efluentes tratados, relatando diferenças na ocorrência de filtros em áreas com e sem atividades balneares, onde apresentou um pico de octocrileno de 128 ng/g.

No campo dos organismos vivos, Langford et al. (2015), com a intenção de estimar o potencial de acumulação trófica de oito filtros e estabilizadores UV na Noruega, utilizaram representantes da vida aquática como caranguejo, camarão e bacalhau na baía do fiorde de Oslo, e perca, peixe branco e burbot no lago Mjøsa

surpreendendo o pesquisador, o fígado de todos os bacalhaus estavam contaminados com pelo menos um dos filtros, sendo 80% deles com octocrileno, sendo que maior valor encontrado foi de 12 µg/g.

Mesmo que em espécies de água doce a frequências de detecção seja menores, eles fizeram questão de ressaltar que diferentes cargas dos poluentes chegavam até as matrizes dependendo da extensão do tratamento, e que somente etapas primárias eram insuficientes para sua remoção, principalmente pela natureza hidrofóbica das substâncias (LANGFORD et al., 2015).

### **4.3 Descrição de Biorremediação**

Caracterizada pelo uso de organismos vivos, em especial plantas e microorganismos, a biorremediação é uma forma de remediar áreas contaminadas, com a remoção de metais e poluentes orgânicos. Essa técnica está entre as mais eficazes, além de ser adequada ecologicamente em comparação com processos químicos ou físicos. Suas aplicações incluem tratamento de corpos d'água, solos, aterros e áreas de contenção (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Por apresentar um custo menor, essa técnica é vantajosa quando comparada a outras, como incineração ou simplesmente a remoção do material em que esteja localizado o ponto de contaminação. A biorremediação permite a destruição ou transformação do poluente em substância que não prejudique o ambiente. Entretanto, nem todos os contaminantes são biodegradáveis, podendo gerar outros contaminantes tóxicos, caso não seja feito um estudo prévio da situação (BOOPATHY, 2000).

### **4.4 Descrição de Fitorremediação**

Salt et al. (1995) definiu a poluição de águas e solos por metais pesados como um grande problema ambiental, em que métodos convencionais não fornecem soluções adequadas. Para esses autores, o uso de plantas acumuladoras de metal é uma alternativa eficaz. O processo de fitorremediação é composto por cinco mecanismos de atuação: fitotransformação, fitoextração, fitovolatilização, fitoestimulação e fitoestabilização (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2014). O enfoque desse estudo são as plantas que utilizam o mecanismo da fitoextração.

Esse mecanismo consiste na absorção da substância contaminante pela planta e retenção nos tecidos vegetais.

A fitoextração se limita a acumular substâncias, sem as degradar. Diante disso, deve ser realizado um estudo acerca da destinação final do material vegetal, levando-se em conta o potencial de acumulação da espécie utilizada e quais contaminantes estão acumulados no organismo (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2014).

#### **4.5 Descrição de Macrófitas Aquáticas**

Por macrófitas aquáticas entende-se o conjunto de vegetais que habitam desde brejos até ambientes que sejam totalmente aquáticos, incluindo grupos de macroalgas e plantas vasculares. Em regiões tropicais, estabelecem uma importante conexão entre sistemas terrestres e aquáticos. Outro papel importante do grupo é a proteção de margens de corpos hídricos contra erosão, além de servir de abrigo para organismos em fases jovens e ainda servirem de substrato para outras espécies (FERREIRA et al., 2016).

Uma das principais características desses vegetais é a alta produtividade, principalmente em ambientes lânticos e rasos. As macrófitas aquáticas podem ser classificadas como emersas, flutuantes e submersas, podendo ser enraizadas ou de vida livre (SANTINO; BIANCHINI, 2011).

De acordo com Rodrigues et al. (2016), as características fisiológicas desse grupo de plantas favorecem seu uso para a fitorremediação, no intuito de retirar, inertizar ou conter poluentes do ambiente. As macrófitas hiperacumuladoras são muito utilizadas nos processos de fitoextração, justamente por serem capazes de armazenar altos níveis de metais em seus tecidos, diminuindo sua concentração no meio em que estão inseridas.

##### **4.5.1 Descrição de *Salvinia biloba* Raddi emend. de La Sota**

*Salvinia biloba* Raddi emend. de La Sota é uma erva aquática flutuante livre da família *Salviniaceae*, gênero *Salvinia* com tricomas hidrofóbicos nas folhas. Essa espécie pode habitar os mais diferenciados habitats de água doce, ocorrendo em altas densidades com acumulação nas margens devido à ação dos ventos (Figura 3)

Apesar dos estudos relacionados à *Salvinia biloba* serem poucos, já podemos ressaltar a sua eficiência no âmbito da fitorremediação, principalmente na retirada de cobre do ambiente. Sua propagação se dá por meio da brotação e ocorre rapidamente, ocupando extensas superfícies aquáticas (CASAGRANDE, 2017).

Figura 3 - INDIVÍDUOS DE *Salvinia biloba*.



Fonte: Biblioteca Digital CABI (2019).

*Salvinia biloba* é capaz de acumular facilmente os poluentes em seus tecidos, já que possui sistema de absorção de nutrientes com grande área de superfície que capta os elementos em suspensão antes de serem sedimentados no fundo dos corpos hídricos (CASAGRANDE, 2017).

#### **4.6 Mecanismos de Defesa das Plantas**

Embora o oxigênio seja um elemento essencial para a sobrevivência, apresenta algumas desvantagens para os organismos aeróbicos. Há uma eficiente produção energética por combustão enzimática de compostos orgânicos, mas ao mesmo tempo o oxigênio é o líder nos danos aeróbicos na célula, por formar Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que reagem com todas as classes de biomoléculas (BARTOSZ, 1997).

Os organismos desenvolveram diferentes formas para reduzir e minimizar os efeitos das ERO, com a elaboração de um sistema antioxidante que minimiza as

ações prejudiciais e, em alguns casos, utilizando-se destas espécies como meio de defesa, e às vezes como um mensageiro secundário (KHAN; WILSON, 1995).

Os diferentes estresses ambientais, sejam bióticos ou abióticos, podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio, tais como  $^1O_2$ ,  $O_2^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\bullet}$ . Como forma de se proteger destes tóxicos intermediários do oxigênio, as organelas das células vegetais, como mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, possuem um sistema de defesa antioxidante, composto por enzimas e outras moléculas não enzimáticas como carotenoides, ácido ascórbico, vitamina E, flavonoides, pirolina, glutathione, entre outras (DAVAR et al., 2013).

A exposição a metais pesados tem como consequência diferentes respostas biológicas a nível bioquímico, celular e fisiológico, entre os quais se podem citar: aumento da peroxidação lipídica, variações na relação clorofila/carotenoides, alterações na concentração de ácido jasmônico, nicotiana, glutathione (GSH) e tióis, aparição de peptídeos quelantes e fitoquelatinas, além de alteração da atividade de enzimas antioxidantes (PÉRNIA et al., 2008). A atividade de peroxidases está classificada como resposta de tolerância para evitar danos celulares.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Área de Estudo e Coleta

Na primeira etapa do experimento foram coletadas plantas aquáticas encontradas na região de Campo Mourão. A coleta ocorreu no lago artificial no Parque Joaquim Teodoro de Oliveira Campo Mourão (Figura 4), no Rio do Campo, bacia do Alto do Ivaí.

Figura 4 - Parque Joaquim Teodoro de Oliveira Campo Mourão.



Fonte: cidade portal 2017

A bacia do Alto do Ivaí tem uma área de 23.195 km<sup>2</sup> e sua temperatura média no mês mais frio é inferior a 18°C e temperatura média no mês mais quente acima de 22°C. A maioria dos rios formadores da bacia, incluindo o Rio do Campo, são oficialmente classificados como classe 2.

## 5.2 Experimento

O experimento de fitorremediação foi realizado em local arejado e com luz adequada para as plantas, no laboratório de Ecologia da Universidade Federal do Paraná Câmpus Campo Mourão. As folhas submersas (que neste trabalho foram tratados por raiz) foram lavadas para retirar de seu sistema de absorção qualquer resquício de material do local onde foram recolhidas e em seguida, foi realizado um período de adaptação de *Salvinia biloba*.

Para simular um efluente contaminado com octocrileno, foi preparada 7,2 L de solução de octocrylene para cada uma das concentrações a serem analisada, estas sendo a de 200 µg/L, de 400 µg/L e a de 600 µg/L .

### 5.2.1 Preparação do Extrato Enzimático

Para cada amostra, foram maceradas, a frio, 200 mg de folhas e 50 mg de raízes. Para que as fibras pudessem ser trituradas no processo, em geral com pistilo foram misturados 1 mL de HCl a 0,38% e 2 mL de uma solução de DTPA 5 mM (ácido diethylenetriamino-penta acético). Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi coletada e mantida congelada até a realização das análises.

### 5.2.2 Determinação da Atividade Enzimática da Catalase = CAT

Presente nos peroxissomos, a catalase é uma enzima intracelular, produzida por diversos organismos, que auxilia na degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultando na formação de água e oxigênio (MAGALHÃES, 2022). O peróxido de hidrogênio, tóxico aos vegetais, necessita ser neutralizado, e a peroxidase trabalha para transformá-lo em uma substância que não seja nociva (BUNDE, 2018).

FIGURA 5 - Espectrofotômetro de UV-VIS.



Fonte: autor (2022).

Para a determinação da atividade da CAT, utilizar-se-á como base o método de Kraus, McKersie e Fletcher (1995) com contribuições de Azevedo et al. (2002). E a leitura foi em espectrofotômetro UV-VIS (Figura 5) a 240 nm, por um minuto com intervalos de dois segundos.

Do extrato enzimático, foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  em solução de reação contendo 2 mL de tampão fosfato de potássio (0,33 M), pH 7,5, e, por último, foram adicionados 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,01 M. A atividade foi determinada de acordo com a decomposição do peróxido de hidrogênio e calculada pelo coeficiente de extinção de  $2,8 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ , com resultados expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

Para a produção das soluções tampão fosfato de potássio utilizadas na análise da enzima de CAT foram utilizadas respeitadas as seguintes proporções (MONTEIRO, 2017).

Pesar 17,41 g para 1 L de água destilada de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Dibásico).

Pesar 13,60 g para 1 L de água destilada de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Monobásico).

Após pesar e dissolver, passa-se para acertar o pH da solução para 7,5, onde, coloca-se a solução Monobásica sobre a Dibásica até chegar ao pH desejado (7,5).

Figura 6 - Cubeta utilizada para a leitura no espectrofotômetro.



Fonte: autor (2022).

O UV-VIS um equipamento que detecta a quantidade de luz que uma amostra absorve ou emite, em determinados comprimentos de onda. A concentração das substâncias é medida a partir da absorção de energia radiante em um solvente.

### 5.2.3 Determinação da Atividade Enzimática da Ascorbato Peroxidase = APX

Assim como a catalase, a APX também catalisa a reação de decomposição do peróxido de hidrogênio. Essa enzima atua doando elétrons para a redução do  $H_2O_2$  em água. Ela também protege os cloroplastos e outras partes da célula da atividade da água oxigenada e do radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (LOPES et al., 2006).

A determinação da atividade da APX baseia-se em Zhu et al. (2004). Foram utilizados 200  $\mu$ L do extrato enzimático e adicionados uma mistura reacional contendo 2 mL de solução tampão de fosfato de sódio (25 mM), pH 7,0, com 0,1 mM de EDTA, 0,25 mM de ascorbato e por fim, 1,0 mM de  $H_2O_2$ . (Figura 6).

Para a produção das soluções tampão fosfato de sódio utilizadas na análise das enzimas de foram utilizadas respeitadas as seguintes proporções(MONTEIRO,

2017).

Pesar 10,053 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dibásico) para diluir em 500 mL de água destilada.

Pesar 5,1746 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Monobásico) para diluir em 500 mL de água destilada.

Após pesar e dissolver, passa-se para acertar o pH da solução para 7,5, onde, coloca-se a solução Monobásica sobre a Dibásica até chegar ao pH desejado (7,5).

Da mesma forma que a determinação da atividade da CAT, a APX foram determinada pelo decréscimo de peróxido de hidrogênio na reação por espectrofotometria, por dois minutos, com intervalo de dois segundos a 290 nm e coeficiente de extinção de 2,8 M.cm<sup>-1</sup>, com resultados em μmol/min/μg de proteína.

#### 5.2.4 Determinação da Atividade Enzimática da Guaiacol Peroxidase = GPOX

Trata-se de enzima que atua indiretamente sobre o estresse do peróxido de hidrogênio, dependendo de elétrons liberados pelo enxofre, que está associado ao ciclo de formação da glutathione. As isoenzimas aniônicas da guaiacol peroxidase estão relacionadas à formação de parede celular e síntese de lignina e suberina (FIELDES; GERHARDT, 1998).

A GOPX teve sua atividade determinada com base na técnica descrita por Matsuno e Uritani (1972). A mistura de reação utilizada foi de 250 μL de tampão fosfato-citrato (uma solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M, com pH 5,0), além de 150 μL de extrato enzimático e 25 μL de guaiacol 0,5%, misturados em vórtex com 25 μL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A solução é levar a estufa a 30°C por 15 minutos. Em seguida, são adicionados 25 μL de solução de metabissulfito de sódio a 2%, e novamente agitado em vórtex, seguido por repouso de 10 minutos.

Após a conclusão desse procedimento, a leitura da atividade da GOPX foi no espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm, por um minuto com intervalos de dois segundos. O coeficiente de extinção utilizado para os cálculos foi de 26,6 M.cm<sup>-1</sup>. Os resultados são expressos em μmol/min/μg de proteína.

#### 5.2.5 Determinação da Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase = SOD

A SOD é considerada a primeira enzima na proteção ao excesso de peróxido ( $H_2O_2$ ) apresentou maior reatividade após 48 horas e na maior concentração. SOD é capaz de coordenar rigorosamente a produção de OH gerado a partir da Reação de Haber-Weiss O radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) é o ROS mais perigoso e reativo estando associado a morte programada da célula (Gupta et al., 2018). Alterações nas concentrações do cofator metálico da SOD (cobre/zinco, ferro e manganês), pode levar a superprodução de  $OH^\cdot$  e esta enzima não expressa atividade.

Para a determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase foram utilizados o método descrito por Monteiro (2017) três tubos de ensaio, sendo um identificado como mostra, o outro como branco da amostra e o terceiro tubo que foi utilizado para a amostra de controle.

Todo o processo da metodologia foi feito com baixa luminosidade, e para garantir o mínimo de luz, para que não haja perda de atividade enzimática, os tubos de ensaio foram embrulhados em papel kraft.

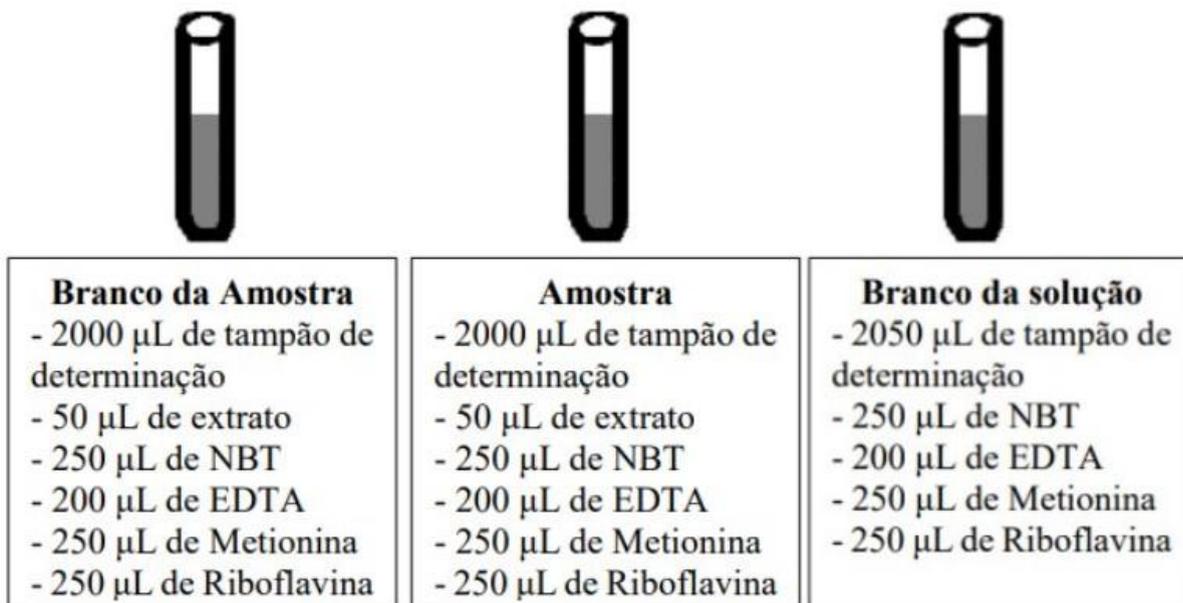
Nos tubos de ensaio marcados como branco da amostra e amostra foi adicionado 50  $\mu$ L de extrato enzimático, 200  $\mu$ L de Ácido Etilenodiamino Tetra-acético, 250  $\mu$ L de Cloreto de Azul Nitrotetrazólio, 250  $\mu$ L Riboflavina, 250  $\mu$ L Metionina e por último foi adicionado 2050  $\mu$ L da solução tampão, e no tubo de ensaio marcados como branco da solução foi adicionado 200  $\mu$ L de Ácido Etilenodiamino Tetra-acético, 250  $\mu$ L de Cloreto de Azul Nitrotetrazólio, 250  $\mu$ L Riboflavina, 250  $\mu$ L Metionina e por último foi adicionado 2050  $\mu$ L da solução tampão.

No momento de serem colocados sob a ação da luz retira-se dos tubos controle e amostra o papel kraft (os tubos do branco da amostra continuaram cobertos por alumínio para não haver ação da luz sobre eles, pois os mesmos apresentam o mesmo conteúdo para reação do tubo da amostra “exceto a luz”) e coloca-se sobre ação da luz por 10 minutos (temperatura ambiente).

Após a conclusão desse procedimento, a atividade da SOD foi lida no espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 500 nm e zerando o espectrofotômetro com água antes de iniciar, em seguida foi lida a amostra da solução e depois zeramos o espectrofotômetro com esta amostra da solução que não recebeu luz e depois as amostra que receberão luz.

Para a produção das soluções utilizadas na análise da enzima de SOD foram respeitadas as seguintes proporções.

Figura 7 - Cubeta utilizada para a leitura no espectrofotômetro para a análise de SOD.



Fonte: Adaptado de Monteiro (2017)

Solução NBT - Pesar 0,0081 g de NBT (Cloro de Azul Nitrotetrazólio) e diluir em 25 mL de água destilada.

Solução EDTA - Pesar 3,684 g de EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético) e diluir em 1000 mL de água destilada, após armazenar em geladeira.

Solução de Riboflavina - Pesar 0,0074 g de Riboflavina e diluir em 1000 mL de água destilada.

Solução Metionina - Pesar 0,2238 g de metionina e diluir em 25 mL de água destilada.

Leitura da amostra = Leitura amostra – Leitura branco da amostra (2)

Calcular a percentagem de inibição

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Leitura branco da solução} - \text{Leitura da amostra}}{\text{Leitura branco da solução}} \quad (3)$$

Cálculo da unidade da SOD é medida como quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotorredução do NBT, portanto por regra de 3

$$\begin{array}{l} 50\% \rightarrow 1 \text{ unidade} \quad (4) \\ \% \rightarrow X \end{array}$$

### 5.2.6 Calculo de Atividades Enzimaticas

As enzimas são calculadas pela seguinte fórmula (1):

$$U = \frac{A}{T} \times \frac{1}{E} \times \frac{1}{V_e} \times FD \times 1000 \quad (1)$$

Em que:

U – unidade de enzima, que pode ser definida como a quantidade de extrato enzimático que causa um aumento na absorvância de 0,001 unidades por minuto.

A – absorvância, obtida pela diferença entre a maior e a menor absorvância.

E – absorvidade molar da enzima, sendo que para a CAT e APX o valor de 2,8 e para GOPX, de 26,6.

Ve – volume da solução da enzima utilizada.

T – tempo de reação em minutos.

FD – fator de diluição, calculado pela relação extrato bruto e solução final lida.

### 5.2.7 Determinação da Clorofila

A extração do pigmento de clorofila foi realizada pela técnica de maceração a frio (Figura 8) com 2 mL de solução aquosa de acetona 90%, em gral com pistilo (EATON et al., 2005). As amostras foram armazenadas em tubos de ensaio e centrifugadas, a 3000 rpm por 20 minutos, a fim de sedimentar as fibras remanescentes.

A leitura das amostras foi realizada no mesmo espectrofotômetro que foi utilizado para a leitura dos extratos enzimáticos, após transferência para uma cubeta. Os comprimentos de onda utilizados foram de 630 nm, 647 nm e 664 nm, referentes às clorofilas α, b e c respectivamente.

As concentrações absolutas de clorofila, em mg/L, foram obtidas com as equações (2), (3) e (4) (EATON et al., 2005).

FIGURA 8 - Extração do Pigmento de clorofila com o auxílio do grau e do pistilo.



Fonte: autor (2022).

A clorofila  $\alpha$  é o tipo mais abundante, representando cerca de 75% de todos os pigmentos verdes encontrados nas plantas. É encontrada em praticamente todos os organismos que realizam fotossíntese, excetuando-se algumas bactérias fotossintetizantes que possuem pigmentos especializados. Ela possui papel fundamental no processo de fotossíntese, atuando ativamente na produção de substâncias orgânicas. A clorofila  $a$  é o tipo mais abundante, representando cerca de 75% de todos os pigmentos verdes encontrados nas plantas. É encontrada em praticamente todos os organismos que realizam fotossíntese, excetuando-se algumas bactérias fotossintetizantes que possuem pigmentos especializados. Ela possui papel fundamental no processo de fotossíntese, atuando ativamente na produção de substâncias orgânicas(DOS SANTOS, 2018).

Clorofila  $\alpha$  =  $[11,85 \times (\text{absorbância } 664)] - [1,54 \times (\text{absorbância } 647)] - [0,08 \times (\text{absorbância } 630)]$  (2)

A clorofila  $b$  é encontrada em plantas, algas verdes e euglenófitas. A concentração desse tipo de clorofila é maior em plantas sombreadas, uma vez que ela aumenta os comprimentos de onda que podem ser capturados pela planta. A clorofila  $b$  pode ser convertida em  $a$  pela ação da enzima clorofila  $a$  oxigenase. Na natureza, as clorofilas  $a$  e  $b$  encontram-se em uma proporção de 3:1(DOS SANTOS, 2018).

Clorofila b = [21,03 x (absorbância 647)] – [5,43 x (absorbância 664)] – [2,66 x (absorbância 630)] (3)

A clorofila c, por sua vez, possui a mesma função da clorofila b e é um substituinte desta em alguns grupos de algas, tais como as diatomáceas e as algas pardas. Já a clorofila d é encontrada em algas vermelhas (DOS SANTOS, 2018).

Clorofila c = [24,52 x (absorbância 647)] – [7,60 x (absorbância 647)] – [1,67 x (absorbância 664)] (4)

### 5.3 Obtenção e Enraizamento de Bulbos

Bulbos de *A. cepa* (cebola), da variedade baia periforme, foram obtidos em horta orgânica e estavam isentos de inibidores de crescimento e pesticidas. Para toda concentração e para o controle com água destilada (tratamentos) utilizou-se três bulbos de cebolas que foram previamente escarificados para retirada de catáfilos mortos e lavados em água destilada. Após a limpeza, os bulbos foram postos em seus respectivos tratamentos, que foram: solução de Octocrileno nas concentrações 200 e 600 µg/ L antes da exposição a *S. biloba* (0h) e após a exposição as plantas nos tempos 24, 48 e 96 horas. Os bulbos permaneceram em suas respectivas soluções por 120 horas para enraizamento. Após esse tempo realizou-se as análises de citotoxicidade e genotoxicidade.

As avaliações de toxicidade em *A. cepa* foram realizadas de acordo com Fiskesjö (1985), com modificações.

#### 5.3.1 Avaliação de Citotoxicidade e Genotoxicidade

Para avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3: 1 (metanol: ácido acético) por 24 horas. Após a fixação, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N, e suas regiões meristemáticas foram excisadas para confecção de lâminas por meio da técnica de esmagamento conforme Herrero et al. (2012). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico em aumento de 400 x.

A citotoxicidade foi estabelecida com base na proliferação celular dos meristemas, onde se contabilizou células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase e

telófase, e calculou-se o Índice Mitótico (IM) (Equação 5). De cada bulbo contou-se 2,000 células, totalizando 6,000 células analisadas por tratamento.

$$MI: \frac{\text{Número total de células em divisão}}{10,000} \times 100 \quad (5)$$

A genotoxicidade foi definida com base no Índice de Alterações Celulares (IAC) calculado a partir do número de alterações celulares observado nos meristemas (equação 6). De cada bulbo observou-se 300 células, totalizando 1,000 células analisadas por tratamento. As categorias de células aberrantes consideradas foram micronúcleo, viscosidade, metáfase com desagregação cromossômica e ana/telófases anormais, que incluem pontes, cromossomos vagantes, desagregação cromossômica e fusos multipolares.

$$IAC: \frac{\text{Número de alterações celulares}}{1000} \times 100 \quad (6)$$

#### 5.4 Análise de Dados

Comparar os diferentes resultados das enzimas obtidas da espécie que foram deixadas em tempos diferentes na solução de octocrileno.

As informações obtidas após a finalização dos experimentos, foram submetidas à análise de correlação, para verificar se há um grau de associação entre o que foi observado nas cebolas e os resultados das enzimas.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas foram retiradas após 96 horas de experimento sem sinais aparentes de danos físicos. As enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e superóxido dismutase (SOD) são componentes do sistema de defesa contra espécies reativas ao oxigênio (Santo et al., 2022; Nascimento et al., 2023) e foram analisadas a cada 48 horas apresentando alterações durante esse período (Figura 9).

Nas raízes a CAT foi inibida nas concentrações 400 e 600µg/L de octocrileno (Figura 9a) comparada ao controle. Nas folhas a reação da CAT foi indiferente à concentração de octocrileno em 200 e 600µg/L a atividade aumentou (Figura 9b) em relação ao controle nas 48h e apresentou inibição nas 96h, ficando

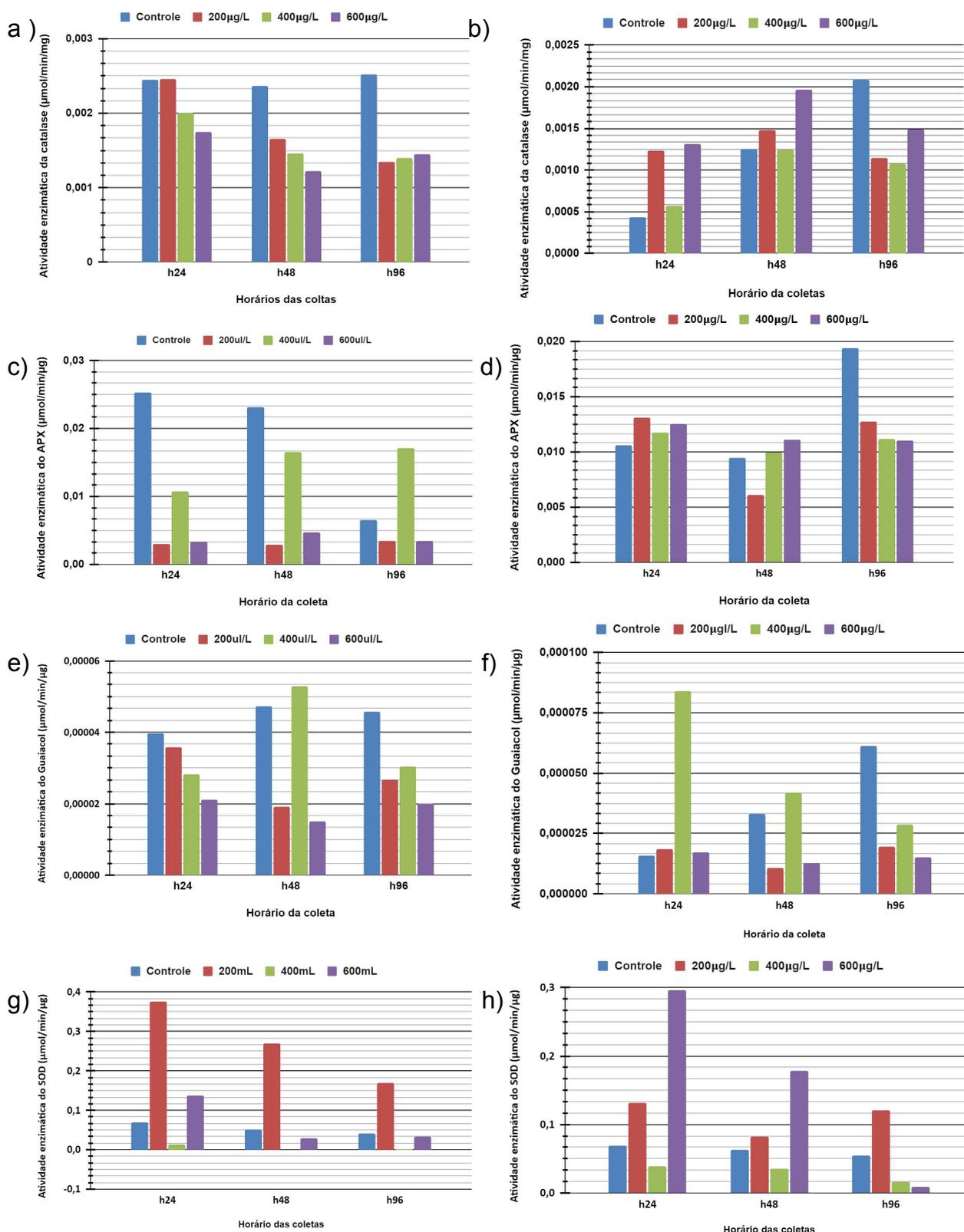
abaixo do controle. Na concentração de 400 $\mu$ g/L a enzima manteve sua atividade próxima ao da amostra controle em todos os intervalos avaliados. A CAT auxilia na degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, substância tóxica aos vegetais, a maior vantagem de atuação dessa enzima está no fato de não precisar de agentes redutores para eliminar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Carvalho et al., 2012).

A APX apresentou inibição em todas as concentrações nas raízes (Figura 9c) com exceção de 400  $\mu$ g/L que após 96h ficou muito acima das demais e do controle. Nas folhas as primeiras 48 horas não apresentaram grandes alterações da atividade desta enzima, mas a partir de 96 h há inibição de atividade em todas as concentrações (Figura 9d). Diferente da CAT a APX precisa de um cofator, e usa o ascorbato como precursor da degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, isto lhe dá a capacidade de atuar em baixas concentrações do peróxido, mas é inibida quando os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentam (Soares et al., 2019).

A GPOX é inibida em todas as concentrações nas raízes em relação ao controle (Figura 9e), nas folhas a concentração 400 $\mu$ g/L teve atividade acima do controle nas primeiras 24 horas, mas nos horários seguintes também sofreu inibição (Figura 9f). A concentração de 600  $\mu$ g/L foi a que apresentou a maior inibição da atividade enzimática ao final do experimento (96h). A atuação dessa enzima se dá pela reação do guaiacol com o peróxido de hidrogênio formando o tetraguaiacol, nesta reação, o peróxido de hidrogênio é reduzido (Zeraik et al., 2008). Esta enzima está associada a proteção das membranas celulares e quando ativa é um indicativo de peroxidação lipídica.

A SOD foi ativada desde o início nas concentrações 200 e 600  $\mu$ g/L, nas raízes após 96 horas de experimento sofreu a maior inibição de atividade (Figura 9g), mas mantém-se bem ativa nas concentrações 200 e 400  $\mu$ g/L. Nas folhas a inibição foi acentuada nas concentrações 400 e 600  $\mu$ g/L, e em 200  $\mu$ g/L o efeito foi de ativação da atividade seguida de redução, mas sem ficar abaixo do controle em nenhum dos intervalos analisados (Figura 9h). Estes resultados indicam que a SOD reagiu a formação do superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), nesse processo há formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Flores et al., 2014), o que pode se associar as atividades da CAT e da APX. A SOD atua dismutando o superóxido e é a primeira enzima de proteção dos organismos em relação a espécies reativas de oxigênio.

Figura 9 - Resultados da análises enzimáticas de raízes e folhas de *Salvinia biloba* Raddi emend. de La Sota em soluções de octocrileno: a) Catalase raízes, b) Catalase folhas, c) Ascorbato Peroxidase raízes, d) Ascorbato Peroxidase folhas, e) Guaiacol Peroxidase raízes, f) Guaiacol Peroxidase folhas, g) Superóxido dismutase raízes, h) Superóxido dismutase folhas

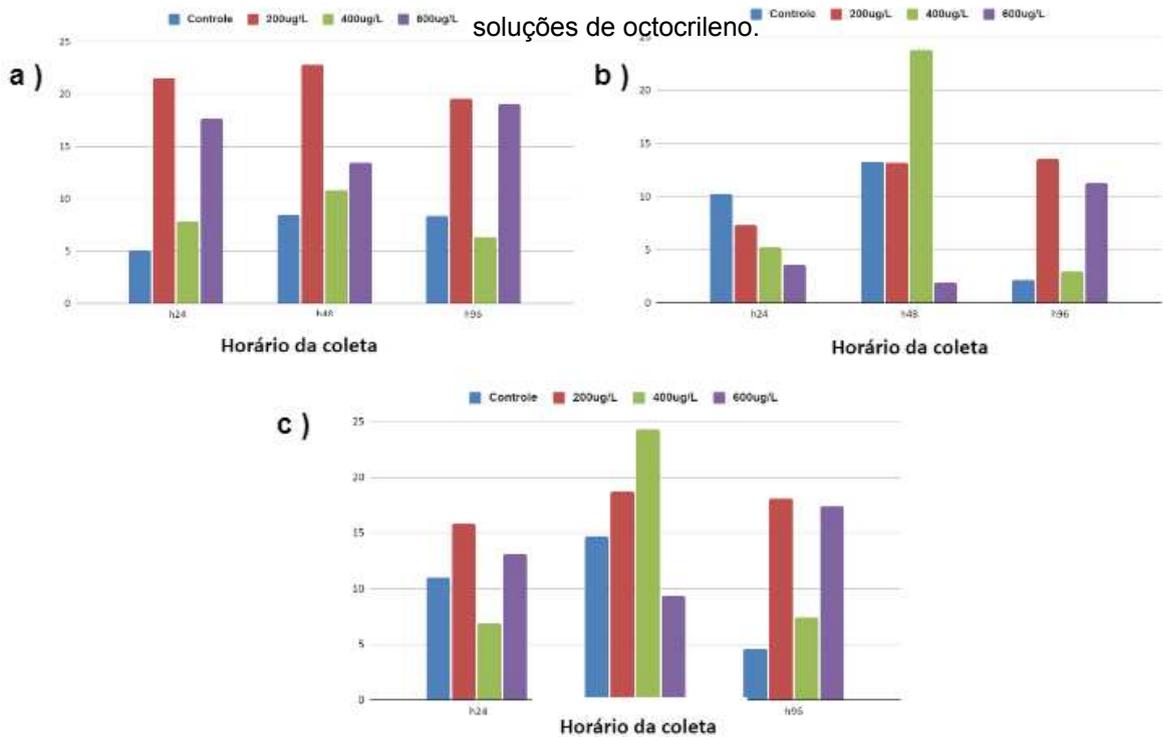


Toda esta instabilidade citada acima (figura 9) indica que *Salvinia biloba* está lutando contra a contaminação provocada pelo octocrileno. Além da atuação da SOD que indica a formação inicial de superóxido seguida da formação de  $H_2O_2$  pela ativação e inibição das enzimas CAT e APX.

A clorofila serve como indicador da saúde das plantas, após serem realizadas as análises das enzimas, foram gerados os gráficos com os valores de clorofilas a b e c (Figura 10).

Podemos observar na que a produção de clorofila a nas amostras de 200 e 600  $\mu\text{g/L}$  superaram os valores do controle indicando que a planta está sob estresse (Figura 10a). A clorofila b é inicialmente reduzida e recupera-se em 200 e 400  $\mu\text{g/L}$  após 48 h, já para 600  $\mu\text{g/L}$  a recuperação ocorre após as 96 horas de experimento (Figura 10b). A clorofila c nas 24h iniciais apenas na amostra de 400  $\mu\text{g/L}$  ficou abaixo do controle e em 48h isso ocorreu em 600  $\mu\text{g/L}$ . Porém, após as 96h todos as amostras estavam acima do controle indicando tentativa de recuperação da planta ao estresse do octocrileno (Figura 10c).

Figura 10 - Resultados da análises de clorofila a, b e c *Salvinia biloba* Raddi emend. de La Sota em soluções de octocrileno.



Fonte: A autora (2022)

Com base nos resultados de IM verificou-se uma diminuição do índice mitótico em relação ao controle conforme o aumento do tempo de exposição as duas concentrações avaliadas. Para a concentração 200 µg/L o índice de divisão celular não diferiu do controle em 24 horas, porém, nas 48 e 96 horas houve uma drástica diminuição da proliferação celular, demonstrando elevada toxicidade. Para a concentração de 600 µg/L, em todos os tempos de exposição considerados houve redução significativa do índice de divisão celular em relação ao tempo 0h, caracterizando alto potencial citotóxico das soluções após fitotratamento (Tabela 1).

Tabela 1 Índices mitóticos de meristemas de raízes provenientes de bulbos de *Allium cepa* L. expostos por 120 horas a Octocrileno, em três concentrações, antes (0 hora) e após fitotratamento em diferentes tempos de exposição (24, 48 e 96 horas)

Octocrileno (g/L)	Tempo de exposição/Índice Mitótico(%)			
	0h	24h	48h	96h
200	100	77,9 ± 0,5	55.5 ± 1,4*	32.0 ± 2,0*
600	100	60,0 ± 0,9*	30,1 ± 1,8*	17,0 ± 2,4*

h: horas. IM de cada concentração foram expressos com base na porcentagem para Co, ao qual foi estabelecido 100%. \* indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações e controle, de acordo com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ( $p \leq 0,05$ ).

Com base nos resultados de alterações celulares verificou-se que com o aumento do tempo de exposição as raízes expostas as soluções tratadas tiveram aumento significativo de alterações celulares em relação aos seus respectivos controles, demonstrando elevada genotoxicidade.

Tabela 2 - Índices de alterações celulares de meristemas de raízes provenientes de bulbos de *Allium cepa* L. expostos por 120 horas Octocrileno, em duas concentrações, antes (0h) e após fitotratamento em diferentes tempos de exposição (24, 48 e 96 h).

Conc de Octocrileno (ug/L)	TE	Número e tipos de alterações celulares				IAC±DP (%)
		Micronucleous	Células binucleadas	Desarranjos em metáfase	Anáfase chromosomal	
200	0h	01	n.d.	n.d	01	0.20 ± 0.3
	24h	02	03	14	00	1.90 ± 0.7*
	48h	24	15	18	14	7.10 ± 1.2*
	96h	25	25	16	20	8.60 ± 1.4*
600	0h	01	n.d.	n.d	03	0.40 ± 0.5
	24h	03	14	10	15	4.20 ± 0.8
	48h	34	39	35	14	12.20 ± 1,9*
	96h	39	52	44	22	15.70 ± 1.0*

Conc: concentração, TE: Tempo de Exposição, IAC: Índice de Alterações Celulares, DP: Desvio Padrão. \* indicam diferenças estatisticamente significativas das concentrações e o controle, de acordo com Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ( $p \leq 0,05$ ).

## 7. CONCLUSÃO

Com base nas informações apresentadas podemos concluir que o sistema de defesa contra EROS de *Salvinia biloba* Raddi emend. de La Sota foi ativado, mas o metabolismo da planta foi prejudicado e apesar de ter ocorrido recuperação das formas de clorofilas ao longo dos horários esta não foi constante e por isso não pode-se afirmar que *S. biloba* manteria-se viva o suficiente para eliminar do ambiente o contaminante.

A análise do crescimento das raízes e de sua divisão celular apresentou alteração e irregularidade indicando que a *Salvinia biloba* Raddi emend. de La Sota não foi capaz de tratar o octocrileno corretamente.

## REFERÊNCIAS

- AMINE, H.; GOMEZ, E.; HALWANI, J.; CASELLAS, C.; FENET, H. UV filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene and ethylhexyl dimethyl PABA from untreated wastewater in sediment from eastern Mediterranean river transition and coastal zones. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, n. 11, p. 2435-2442, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.07.051>. Acesso em: 28 dez. 2021.
- ANDRADE, J. C. da M.; TAVARES, S. R. de L.; MAHLER, C. F. **Fitorremediação**: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental. Edição digital. São Paulo: Oficina de Textos, 2014.
- BAKER, L. A.; HORBURY, M. D.; STAVROS, V. G. Ultrafast photoprotective properties of the sunscreens octocrylene. *Optics Express*, v. 24, n. 10, p. 10700-10709, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1364/OE.24.010700>. Acesso em: 23 dez. 2021.
- BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 19, n. 1, p. 47-64, mar. 1997.
- BELL, K. Y.; WELLS, M. J. M.; TRAEXLER, K. A.; PELLEGRIN, M.; MORSE, A.; BANDY, J. Emerging Pollutants. *Water Environment Research*, v. 83, n. 10, p. 1906-1984, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2175/106143011X13075599870298>. Acesso em: 22 dez. 2022.
- BENÍCIO, Danniely Alves. Análise do perfil enzimático da catalase em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sob condições de estresse oxidativo.: Analysis of the catalase enzymatic profile in *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan seedlings under oxidative stress conditions.. Biblioteca digital de teses e dissertações da UFCG, 2011. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/25043>. Acesso em: 23 dez. 2022.
- BERNEGOSSI AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE CRÔNICA DOS FOTOPROTETORES OCTOCRILENO E 2-ETILHEXIL-4-METOXICINAMATO EM *Daphnia magna*; [https://www.researchgate.net/profile/Aline-Bernegossi/publication/331357554\\_Sublethal\\_effects\\_of\\_caffeine\\_in\\_Daphnia\\_magna\\_life\\_cycle\\_using\\_a\\_new-term\\_endpoint/links/5f567dc3a6fdcc9879d62356/Sublethal-effects-of-caffeine-in-Daphnia-magna-life-cycle-using-a-new-term-endpoint.pdf#page=625](https://www.researchgate.net/profile/Aline-Bernegossi/publication/331357554_Sublethal_effects_of_caffeine_in_Daphnia_magna_life_cycle_using_a_new-term_endpoint/links/5f567dc3a6fdcc9879d62356/Sublethal-effects-of-caffeine-in-Daphnia-magna-life-cycle-using-a-new-term-endpoint.pdf#page=625)
- Biblioteca Digital CABI. *Salvinia biloba* (salvinia gigante); Folhagem. Jardim Botânico de Berlim, Alemanha. Dezembro de 2019. 1 fotografia, color. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.54121419> Acesso em: 15 jan. 2023.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, Los Angeles, v. 74, n.1, p. 63-67, ago. 2000.
- BRANCO, N. M. C.; ALBERT, A. L. M.; ROMÃO, C. M. C. P. A. Emerging Pollutants: Antimicrobials in the environment, environmental education and the national and 58 international regulatory aspect. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 8, p. e16910817083, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17083>. Acesso em: 19 dez. 2022.

CALDAS, S. S.; ARIAS, J. L. O.; ROMBALDI, C.; MELLO, L. L.; CERQUEIRA, M. B. R.; MARTINS, A. F.; PRIMEL, E. G. Occurrence of Pesticides and PPCPs in Surface and Drinking Water in Southern Brazil: Data on 4-Year Monitoring. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180154>. Acesso em: 18 dez. 2022.

BROOKE, D. N.; BURNS, J. S.; CROOKES, M. J. UV-filters in cosmetics – prioritisation for environmental assessment. Bristol: Environment Agency, 2008. fonte imagen fciencias <https://www.fciencias.com/2014/07/17/octocrileno-e-o-protetor-solar-molecula-da-semana/2014>

BUNDE, M. **Todo Estudo**.

Disponível em: <https://www.todoestudo.com.br/biologia/catalase>. Acesso em: 08 dez. 2022.

CALVO-FLORES, F. G.; ISAC-GARCIA, J.; DOBADO, J. A. Emerging Pollutants: Origin, Structure, and Properties. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2018.

CARVALHO, S. J. P., MACHADO, E. C. R., MARQUES, B. S., SILVA, A. P. P., LIMA, R. S. O., & COSTA, R.. (2012). Atividade relativa da catalase de losna-branca (*Parthenium hysterophorus*) comparada à de outras espécies daninhas. *Planta Daninha*, 30(2), 395–400. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582012000200019>

CASAGRANDE, G. C. R. **Bioacumulação e bioissorção de cobre e mercúrio por *Salvinia biloba Raddi (Salviniaceae)***. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, 2017.

DĄBROWSKA, Grażyna. CHARACTERISTICS OF THE PLANT ASCORBATE PEROXIDASE FAMILY. *pan*, 2007. *Acta Botanica plantharum*, 49: e01. Disponível em: [https://abcbot.pl/pdf/49\\_1/01dabrow.pdf](https://abcbot.pl/pdf/49_1/01dabrow.pdf). Acesso em: 08 dez. 2022.

DAVAR, R.; DARVISHZADEH, R.; MAJD, A. Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biologia**, v. 68, n. 5, p. 821-829, out. 2013.

Silva, Josenilda Maria da , Graças Ongarelli, Maria das , Saavedra del Aguila, Juan , Fumi Sasaki, Fabiana , Kluge Ricardo Alfredo Métodos de determinação de clorofila em alface e cebolinha minimamente processadas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha [en linea]*. 2007, 8(2), 53-59[fecha de Consulta 15 de Mayo de 2023]. ISSN: 1665-0204. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=8131122100>. Acesso em: 13 dez. 2022.

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Ufsc. DETERMINAÇÃO DA CLOROFILA-A E FEOPIGMENTOS. UFSC, 2019. Disponível em: <https://limaens.paginas.ufsc.br/files/2019/01/Clorofila.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2022.

DE FIGUEIREDO GOMES CRISÓSTOMO, Patrícia Cordeiro Pires 2014. Toxicidade Reprodutiva em Compostos Cosméticos Potencial toxicidade do Octocrileno segundo o

teste de Maturação In Vitro de Oócitos de Bovino: Potencial toxicidade do Octocrileno segundo o teste de Maturação In Vitro de Oócitos de Bovino. *ubibliorum*, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.6/5566>. Acesso em: 07 dez. 2022.

DOS SANTOS, Vanessa Sardinha . Tipos de clorofila. *Mundo Educação*, 2018. Disponível em: <https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/tipos-clorofila.htm>. Acesso em: 13 dez. 2022.

FERREIRA, F. A.; POTT, A.; POTT, V. J.; LATINI, R. O.; RESENDE, D. C. Macrófitas aquáticas. In: LATINI, A. O.; RESENDE, D. C.; POMBO, V. B.; CORADIN, L. (Org.). **Espécies exóticas invasoras de águas continentais no Brasil**. Brasília: MMA, 2016. p. 657-726.

FIELDES, M. A.; GERHARDT, K. E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. *Plant Science*, v. 132, n. 1, p. 89-99, fev. 1998.

FLORES, A. V., BORGES, E. E. DE L. E ., GUIMARÃES, V. M., GONÇALVES, J. F. DE C., ATAÍDE, G. DA M., & BARROS, D. DE P.. (2014). Atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna schott* sob diferentes temperaturas. *CERNE*, 20(3), 401–408. <https://doi.org/10.1590/01047760201420031399>.

FREITAS, F. Accumulation of copper by the aquatic macrophyte *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae): Acumulação de cobre pela macrófita aquática *Salvinia biloba* Raddi. *SciELO-Brasil*, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.166377>. Acesso em: 16 dez. 2022.

FREITAS, A. S. Corante artificial amarelo tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. *Acta Tecnológica*, v. 7, n. 2, p. 65-72, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.35818/acta.v7i2.90>. Acesso em: 15 dez. 2022.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. de L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *BIOTECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, n. 34, p. 34-43, jan./jun. 2005.

GOLTERMAN, H. L., CLYMO, R. S. & OHNSTAD, M. A. M. Methods for physical and chemical analysis of freshwaters: Oxford. Blackwell Scientific Publications, v.I.B.P. Handbook. 8. 1978. 213 p.

HESPANHOL, I. Reúso potável direto e o desafio dos poluentes emergentes. *Revista USP*, n. 106, p. 79-94, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9036.v0i106p79-94>. Acesso em: 20 dez. 2022.

KAMEDA, Y.; KIMURA, K.; MIYAZAKI, M. Occurrence and profiles of organic sunblocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 6, p. 1570-1576, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.055>. Acesso em: 20 dez. 2022.

KAISER, D.; WAPPELHORST, O.; OETKEN, M.; OEHLMANN, J. Occurrence of widely used organic UV filters in lake and river sediments. *Environmental Chemistry*, v. 9, n. 2, p. 139-147, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/EN11076>. Acesso em: 21 dez. 2022.

- LANGFORD, K. H.; REID, M. J.; FJELD, E.; ØXNEVAD, S.; THOMAS, K. V. Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway. *Environment International*, v. 80, p. 1-7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.012>. Acesso em: 29 dez. 2021
- KHAN, A. U.; WILSON, T. Reactive oxygen species as cellular messengers. **Chemistry & Biology**, v. 2, n. 7, p. 437-445, jul. 1995.
- KRAUS, T. E.; MCKERSIE B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-Induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Increased Antioxidant Enzyme Activity. **Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570-576, fev. 1995.
- KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; ŚLIWIŃSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 2, p. 211-221, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.018>. Acesso em: 23 dez. 2022.
- LOPES, M. J. C.; SOUZA, I. R. P. de; MAGALHÃES, P. C.; GAMA, E. E. G.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; VILLAFORT, M. T. Atividade da Enzima Peroxidase do Ascorbato em Plântulas de Diferentes Ciclos de Seleção do Milho 'Saracura' sob Encharcamento Contínuo. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 26., 2006, Belo Horizonte. **Anais... Sete Lagoas: ABMS**, 2006. p. 93-93.
- SHIGEOKA, Shigeru; Ishikawa, Takahiro; Tamoi, Masahiro, Miyagawa, Yoshiko; Takeda, Toru; Yabuta, Yukinori; Yoshimura, Kazuya. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/53/372/1305/644123>. Acesso em: 15 dez. 2022.
- J.L. FIELDING, J.L. HALL, A Biochemical and Cytochemical Study of Peroxidase Activity in Roots of *Pisum sativum*: I. A COMPARISON OF DAB-PEROXIDASE AND GUAICOL-PEROXIDASE WITH PARTICULAR EMPHASIS ON THE PROPERTIES OF CELL WALL ACTIVITY, *Journal of Experimental Botany*, Volume 29, Issue 4, August 1978, Pages 969–981, <https://doi.org/10.1093/jxb/29.4.969>. Acesso em: 5 dez. 2022.
- MAGALHÃES, Lana. Catalase. Toda Matéria, [s.d.]. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/catalase/>. Acesso em: 08 dez. 2022.
- MARGOT, J.; ROSSI, L.; BARRY, D. A.; HOLLIGER, C. A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. *WIREs Water*, v. 2, n. 5, p. 457-487, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wat2.1090>. Acesso em: 17 dez. 2022.
- MARKER, A. F. H., NUSCH, H. & RIEMANN, B. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods: conclusion and recommendations. *Arch. Hydrobiol Beih. Ergebn. Limnol.*, v.14, p.91-106. 1980.
- MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, v. 13, p. 1091-1101, 1972.

- PERNIA, B.; SOUSA, A.; REYES, R.; CASTRILLO, M. Biomarcadores de contaminación por cádmio em las plantas. *Interciência*, v. 33, n. 2, p. 112, 2008.
- PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, v. 72, p. 3-27, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>. Acesso em: 15 dez. 2021.
- Katsumi Amako, Gong-Xiang Chen, Kozi Asada, Separate Assays Specific for Ascorbate Peroxidase and Guaiacol Peroxidase and for the Chloroplastic and Cytosolic Isozymes of Ascorbate Peroxidase in Plants, *Plant and Cell Physiology*, Volume 35, Issue 3, 1994, Pages 497–504, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a07862>. Acesso em: 17 dez. 2021.
- ROGERS, H. R. Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *Science of The Total Environment*, v. 185, n. 1- 3, p. 3-26, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05039-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05039-5). Acesso em: 16 dez. 2022.
- SCHÄFER, A. Fundamentos de ecologia e biogeografia das águas continentais. Porto Alegre: Editora da Universidade. UFRGS. 1984. 532 p.
- SOARES C., CARVALHO M. E., AZEVEDO R. A, FIDALGO, F., 2019. Plants facing oxidative challenges—A little help from the antioxidant networks. *Environmental and Experimental Botany* 161, p. 4-25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.009>
- SOARES, A. F. S.; SOUZA, L. P. S. E. Contaminação das águas de abastecimento público por poluentes emergentes e o direito à saúde. *Revista de Direito Sanitário*, v. 20, n. 2, p. 100-133, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9044.v20i2p100-133>. Acesso em: 18 dez. 2022.
- SUN, Y. I.; OBERLEY, Larry W.; LI, Ying. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.
- TANG, Y.; YIN, M.; YANG, W.; LI, H.; ZHONG, Y.; MO, L.; LIANG, Y.; MA, X.; SUN, X. Emerging pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, and risk assessment. *Water Environment Research*, v. 91, n. 10, p. 984-991, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wer.1163>. Acesso em: 19 dez. 2022.
- TIBURTIUS, E. R. L.; SCHEFFER, E. W. O. Triclosan: Destino no Meio Ambiente e Perspectivas no Tratamento de Águas de Abastecimento Público. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 5, p. 1144-1159, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140075>. Acesso em: 17 dez. 2022.
- ZERAIK, Ana Eliza, Souza, Fernanda Sant'Ana e Fatibello-Filho, Orlando 2008. Desenvolvimento De Um Spot Test Para O Monitoramento Da Atividade Da Peroxidase Em Um Procedimento De Purificação. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 4, 731-734.
- SCALIA, S.; MEZZENA, M. Incorporation in Lipid Microparticles of the UVA Filter, Butyl Methoxybenzoylmethane Combined with the UVB Filter, Octocrylene: Effect on Photostability. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, p. 384-390, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9217-2>. Acesso em: 12 dez. 2022.

MONTEIRO, Gean Charles. Superóxido Dismutase (SOD): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS. *Nome do Site*. 2017. Disponível em: <https://www.ibb.unesp.br/Home/ensino/departamentos/quimicaebioquimica/metodo-da-atividade-da-superoxido-dismutase-sod.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2022.