Efeito da adição de ácidos orgânicos de baixa massa molecular no substrato de crescimento sobre as respostas de cana-de-açúcar à toxidez por cromo

Cíntia Oliveira Silva; Gabriela Santistevan, Fernanda Vidal de Campos, Paola R. C. Coutinho, Audrey Moraes da Costa, Raquel Bezerra Chiavegatto, Letícia Sayuri Suzuki, Leônidas Paixão Passos

Resumo

Uma causa de preocupação, atualmente, é a toxidez por cromo, em virtude dos reflexos na saúde humana e da perspectiva de contaminação da cadeia alimentar. O cromo depositado no meio ambiente pode ser prejudicial aos microrganismos do solo e também ser um contaminante grave nas produções agrícolas. Nas plantas, o cromo inicia a degradação de pigmentos fotossintéticos, levando à diminuição de seu crescimento, pode causar distúrbios aos cloroplastos e obstruir o sistema fotossintético. Estudos aplicados no campo da fisiologia vegetal comprovam que metalotioneínas e ácidos orgânicos são importantes componentes em plantas no mecanismo de tolerância e estão envolvidos na desintoxicação desse metal. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da inclusão de ácidos orgânicos de baixa massa molecular no substrato de crescimento sobre a mitigação dos efeitos do Cr(III) em plantas de cana-de-açúcar. O experimento foi realizado em ambiente controlado, as plântulas foram cultivadas em solução nutritiva de Clark em 1/4 de força e receberam os seguintes tratamentos: 1 Testemunha , 2 Testemunha + Cr(III); 3 Ácido Aspártico, 4 Ácido Aspártico + Cr(III); 5 Ácido Cítrico, 6 Ácido Cítrico + Cr(III); 7 Ácido Málico, 8 Ácido Málico + Cr(III); 9 Fosfoenol piruvato (PEP), 10 PEP + Cr(III); 11 Ácido Fumárico, 12 Ácido Fumárico + Cr(III); 13 Ácido Lático, 14 Ácido Lático + Cr(III); 15 Ácido Oxálico e 16 Ácido Oxálico + Cr(III). Os resultados obtidos até o momento sugerem que os ácidos orgânicos estudados não foram eficazes na mitigação do efeito tóxico do cromo na cana-de-açúcar. Três repetições do experimento ainda estão em andamento para a adequada análise estatística dos dados. De acordo com as tendências verificadas até o momento, estudos com maior detalhamento fisiológico serão necessários para caracterizar adequadamente a atuação dos ácidos na mitigação dos efeitos tóxicos do cromo na cana-de-açúcar.

Palavras-chave: ácidos orgânicos; cana-de-açúcar; cromo; toxidez.

Effect of the addition of low-molecular-mass organic acids in the growth substrate on the responses of sugarcane to chromium toxicity

Abstract

Chromium toxicity is currently a matter of concern, due to the arising developments on human health and the prospect of contamination in the food chain. Chromium released in the environment may be harmful to soil microorganisms and also pose a serious risk of contamination in agricultural production. In plants, chromium initiates the degradation of photosynthetic pigments, leading to a decrease in the growth rates, may cause disturbances to chloroplasts and hamper the photosynthetic system. Applied studies in the field of plant physiology have shown that metallothioneins and organic acids are important components in plants as part of the tolerance mechanism and are involved in detoxification processes of this metal. Thus, the purpose of this study was to evaluate the influence of the addition of low-molecular-mass organic acids to the growth medium on the mitigation of the effects of Cr(III) on sugarcane seedlings. The experiment was conducted in a

controlled environment, the seedlings were grown in ¼ strength Clark's nutrient solution and received one of the following treatments: 1 Control; 2 Control + Cr(III); 3 Aspartic acid; 4 Aspartic acid + Cr(III); 5 Citric acid; 6 Citric acid + Cr(III); 7 Malic acid; 8 Malic acid + Cr(III); 9 Phosphoenolpyruvate (PEP); 10 PEP + Cr(III); 11 Fumaric acid; 12 Fumaric acid + Cr(III); 13 Lactic acid; 14 Lactic acid + Cr(III); 15 Oxalic acid; and 16 Oxalic acid + Cr(III). The results obtained so far suggest that the studied organic acids were not capable of mitigating toxic effects of Cr(III) on sugarcane. Three replications of the experiment are still being carried out so that adequate statistical analyses of the data can be performed. According to the trends verified so far, further studies with greater physiological detailing are needed to better characterize the influence of low-molecular-mass organic acids in mitigating the toxic effects of chromium in sugarcane.

Key words: chromium; organic acids; sugarcane; toxicity.

Introdução

O potencial de produção e o papel fundamental da cana-de-açúcar e de seus subprodutos – açúcar, etanol e energia elétrica, entre outros, tanto na agricultura quanto na indústria, fazem dessa cultura uma das mais importantes atividades da agroindústria nacional. O Brasil é hoje o maior produtor mundial de cana, com 624,99 milhões de toneladas na safra 2010/2011, em uma área de 8,03 milhões de hectares, o que representa apenas 2,3% da área agrícola do País (CONAB, 2011). Os bons números e o aprimoramento tecnológico permitem que o país seja também o maior exportador mundial de açúcar, respondendo sozinho por 45% de todo o produto comercializado no mundo. A cana-de-açúcar sempre teve um papel importante na economia brasileira, desde o período dos engenhos coloniais. Não é de hoje que especialistas vêm buscando maneiras de aprimorar o cultivo da planta, tornando-a mais produtiva e resistente, entre outras vantagens agronômicas. Todavia, muitos solos brasileiros são ácidos, de baixa fertilidade e apresentam toxidez por metais, sejam esses oriundos de sua própria formação rochosa ou por contaminação, tendo a agropecuária extensiva e a expansão industrial grande responsabilidade nesse aspecto. A toxidez por alumínio em solos ácidos, por exemplo, é um dos fatores que mais limitam o desenvolvimento das plantas em solos ácidos. Segundo Hartwig et al. (2007), a utilização de corretivos do pH do solo nem sempre apresenta viabilidade técnica ou econômica, forçando pesquisas para o desenvolvimento de genótipos tolerantes a esse estresse. Outra causa de preocupação, atualmente, é a toxidez por cromo, em virtude dos reflexos na saúde humana e da perspectiva de contaminação da cadeia alimentar (LABRA et al., 2010).

A intensificação da indústria pesada na região Sudeste e o aumento de efluentes das grandes cidades têm causado níveis alarmantes de comprometimento na qualidade do solo e das reservas hídricas (JORDÃO et al., 2005). Devido a este intensivo uso industrial (produção de aço inoxidável, couro e cromagem de peças automotivas), quantidades consideráveis de cromo são liberadas no meio ambiente sem o tratamento adequado, que o caracteriza como um grave poluidor ambiental. Apenas os estados de oxidação (VI) e (III) são estáveis no meio ambiente e diferenciados pela mobilidade. O Cr(VI) é mais tóxico e absorvido por transporte ativo, o outro, por osmose (PANDA E CHAUDHURY et al.,2005). O cromo, por apresentar potencial redox, participa das reações de Fenton, onde há liberação de espécies oxidantes reativas (do inglês, ROS) como O2-,OH-. As ROS produzidas são responsáveis pelo estresse oxidativo nas células das plantas, levando a morte (VERNAY et al., 2008). Reações indutoras de resistência ao cromo tóxico ainda não foram descritas em plantas, somente em microrganismos (CERVANTES et al., 2001). Dentre elas, se destacam a bio-absorção, diminuição do acúmulo, precipitação, redução do Cr(VI) para Cr(III) e efluxo de cromato (MORALES et al., 2007). O estresse oxidativo induzido pelo cromo inicia a degradação de pigmentos fotossintéticos, levando à diminuição do crescimento da planta. Sua alta concentração pode causar distúrbios à ultraestrutura dos cloroplastos e, consequentemente, afetar o processo fotossintético. O cromo também interfere inibindo a germinação das sementes, no crescimento das raízes, na produção de pigmentos foliares, carboidratos e proteínas (ANDRADE et al., 2007). Como consequência, provoca queda acentuada na produção das culturas expostas ao elemento. Os principais mecanismos de inibição do estresse oxidativo causado pelo cromo são: (1) acúmulo de cromo nos vacúolos celulares; (2) produção de enzimas, catalase e peroxidase, que degradam os oxidantes formados; (3) produção de aminoácidos contendo enxofre que exibem poder fitoquelante; (4) exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes que complexam com o cromo impedindo as reações de Fenton (OLIVEIRA et al., 2005).

Estudos aplicados no campo da fisiologia vegetal corroboram que metalotioneínas e ácidos orgânicos são importantes componentes em plantas como mecanismo de tolerância e estão envolvidos na desintoxicação desse metal. Ácidos orgânicos de baixa massa molecular são comuns e constituintes naturais de muitas plantas. A análise destes ácidos orgânicos tornou-se cada vez mais importante devido ao seu papel na atividade fisiológica das plantas. Alguns ácidos orgânicos, como cítrico, málico, succínico e oxálico são componentes do ciclo de Krebs. Eles são os mais importantes intermediários do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Acredita-se que muitos deles possam desempenhar um papel importante no transporte de cátions, como nutriente ou mesmo ser tóxico nos vasos do xilema. Além disso, estes ácidos orgânicos respondem aos estímulos ambientais, como fotoperíodo, temperatura e água. A exsudação de ácidos orgânicos de baixa massa molecular na raiz, incluindo principalmente acético, cítrico, fórmico, ácido glicólico, láctico, málico, oxálico e ácido succínico, são reforçadas em muitas espécies de plantas sob deficiência de fósforo. Além disso, estes ácidos exsudados na raiz estão relacionados com a mobilização de nutrientes minerais do solo, por exemplo, níquel, alumínio, ferro, zinco, cobre e manganês. O acúmulo de ácidos orgânicos nos compartimentos da célula da raiz pode indicar espécies vegetais tolerantes ao metal. O sucesso no esclarecimento dessa função depende da identificação dos ácidos orgânicos, em diferentes partes do solo e das plantas e da confirmação da sua atividade na neutralização dos efeitos tóxicos dos metais (EPSTEIN; BLOOM, 2006;WANG et al., 2007).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito da adição de ácidos orgânicos de baixa massa molecular no substrato de crescimento de plantas de cana-de-açúcar submetidas à toxidez por cromo.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG.

Meristemas axilares de cana-de-açúcar, acesso 7 foram micropropagados e cultivados *in vitro* (32-26 ± 2 °C dia-noite, 60-70% de umidade relativa do ar, 16h de fotoperíodo e 220 μmol.s^{1}.m^{-2} de irradiação), em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado para cana-de-açúcar com adição de carvão vegetal e o dobro de sacarose, com pH corrigido para 5,7, até a obtenção de plântulas desenvolvidas.

Em seguida, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade e vigor, sendo aclimatadas (*ex vitro*). Essa aclimatação consistiu em abrir os tubos de ensaio das plântulas, adicionar água deionizada e deixá-las aclimatando em temperatura ambiente por um período mínimo de sete dias. O estágio seguinte foi um pré-tratamento em solução de Clark em 1/4 de força para se evitar um possível choque osmótico, com 8 vezes o teor de ferro e 4 vezes o de boro. Por fim, o cultivo das plantas foi feito em solução nutritiva de Clark em 1/4 de força, sem ferro, sem boro e sem fósforo, com manutenção rigorosa do pH em 4,3 ou menor, com os seguintes tratamentos: 1 Testemunha (sem adição de Cr(III) ou de ácidos orgânicos de baixa massa molecular), 2 Testemunha + 5 mg.L^{-1} Cr(III), 3 Ácido aspártico, 4 Ácido aspártico + 5 mg.L^{-1} Cr(III), 5 Ácido cítrico, 6 Ácido cítrico + 5 mg.L^{-1} Cr(III), 7 Ácido málico, 8 Ácido málico + 5 mg.L^{-1} Cr(III), 9 Fosfoenol piruvato (PEP), 10 PEP + 5 mg.L^{-1} Cr(III), 11 Ácido fumárico, 12 Ácido fumárico + 5 mg.L^{-1} Cr(III), 13 Ácido lático, 14 Ácido lático + 5 mg.L^{-1} Cr(III), 15 Ácido oxálico, e 16 Ácido oxálico + 5 mg.L^{-1} Cr(III). Cada ácido orgânico de baixa massa molecular foi adicionado à solução nutritiva no volume de 5 mL, na concentração de 2,5 mg.L^{-1} e o volume do Cromo (III) foi de 1,250 mL. Antes do início do cultivo nos devidos tratamentos, foram medidos o comprimento da raiz (cm), da parte aérea (cm), número de folhas e a massa inicial (g).

O experimento se desenvolveu em câmara de crescimento Biotronette (25 ± 4 °C, 200 μmol.s^{-1}.m^{-2} de irradiância, 60% de umidade relativa do ar, 14 horas de fotoperíodo e aeração da solução nutritiva), com duração de um (01) mês. O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, com quatro repetições e quatro plantas/parcela num total de 64 plantas por repetição. Três repetições ainda se encontram em andamento.

Durante o cultivo, o volume de cada solução nutritiva foi monitorado e completado com água deionizada, para fins de prevenção de efeitos osmóticos, sempre que necessário. Além disso, visando manter os níveis

iniciais de toxidez por Cr(III) e de exposição aos ácidos orgânicos, foram adicionados, a cada dois dias 0,375 mL de solução aquosa contendo 1,5 mg.L^{-1} de Cr(III) e 1,250 mL de solução aquosa contendo 0,5 mg.L^{-1} do respectivo ácido orgânico de baixa massa molecular, nos tratamentos pertinentes.

Imediatamente após o período estipulado para o experimento, as plantas passaram por medições finais de comprimento das raízes (cm), parte área (cm), massa fresca (g), número de folhas, teor de clorofila, área foliar. O índice de crescimento da planta foi calculado seguindo a fórmula: (massa fresca final – massa fresca inicial)/massa fresca inicial.

Os dados ainda não foram analisados estatisticamente, pois seguem em andamento mais três repetições do experimento.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos ilustram a alta toxicidade do cromo às plantas, na concentração avaliada. As células radiculares, que são as primeiras a entrarem em contato com o contaminante, são as que mais sofrem prejuízos (Figura 1). As variáveis crescimento da raiz e número de folhas foram as que apresentaram as respostas mais negativas ao tratamento com os ácidos orgânicos nas plantas submetidas à intoxicação por cromo (Figuras 2 e 3). Esse estresse desestabiliza toda a estrutura fisiológica da planta, interferindo em sua capacidade de absorver nutrientes, o que pode ser refletido na grande perda de folhas, pois pode acarretar em um déficit nutricional, diminuindo a quantidade de nutrientes translocados para a parte aérea da planta. A toxicidade por cromo nas plantas pode ser observada em vários níveis, desde a produção reduzida, por meio dos efeitos sobre o crescimento da raiz e da folha, à inibição de atividades enzimáticas e mutagênese (MALAVOLTA, 2006).

O teor de clorofila (Figura 4) foi afetado pela contaminação por cromo. Os ácidos orgânicos, principalmente o fumárico, pareceram exercer pouco efeito na mitigação da ação do cromo. A falta de clorofila prejudica a fotossíntese, podendo levar a planta à morte, já que os danos ao aparelho fotossintético interferem negativamente em todo o desenvolvimento da planta. Os ácidos que revelaram o melhor rendimento na análise do teor de clorofila foram o ácido aspártico, seguido do lático. As variáveis crescimento da parte aérea, índice de crescimento (g) e área foliar (Figuras 5,6 e 7) demonstraram pouca eficiência dos ácidos orgânicos em auxiliar os processos de tolerância ou desintoxicação pelo cromo na cana-de-açúcar. Em relação ao crescimento da parte aérea (Figura 5), o ácido málico foi o que propiciou maior crescimento na presença de cromo e os ácidos lático e aspártico foram os que demonstraram os mais baixos resultados para essa variável. O índice de crescimento (Figura 6) ilustra claramente os efeitos deletérios do cromo, sendo que nenhum ácido orgânico apresentou capacidade de mitigar esse dano. Para a variável área foliar, os tratamentos com PEP e ácido fumárico foram os que apresentaram os menores valores (Figura 7) na presença de cromo. Os tratamentos com ácidos lático e oxálico foram os que apresentaram menores diferenças em relação ao tratamento sem cromo. Por último, na variável peso seco (Figura 8) o ácido aspártico, lático e oxálico foram os que apresentaram os mais baixos resultados na presença de cromo. Já os de índice mais alto, na presença de cromo, foram o controle e o tratamento com ácido málico.

Conclusão

Até o presente momento conclui-se que os ácidos orgânicos de baixa massa molecular estudados neste experimento, em geral, não apresentaram resultados satisfatórios na mitigação do efeito tóxico do cromo em plântulas de cana-de-açúcar.

Agradecimentos

A Embrapa Gado de Leite, ao CNPq e à Fapemig pelo apoio ao desenvolvimento dessa pesquisa.

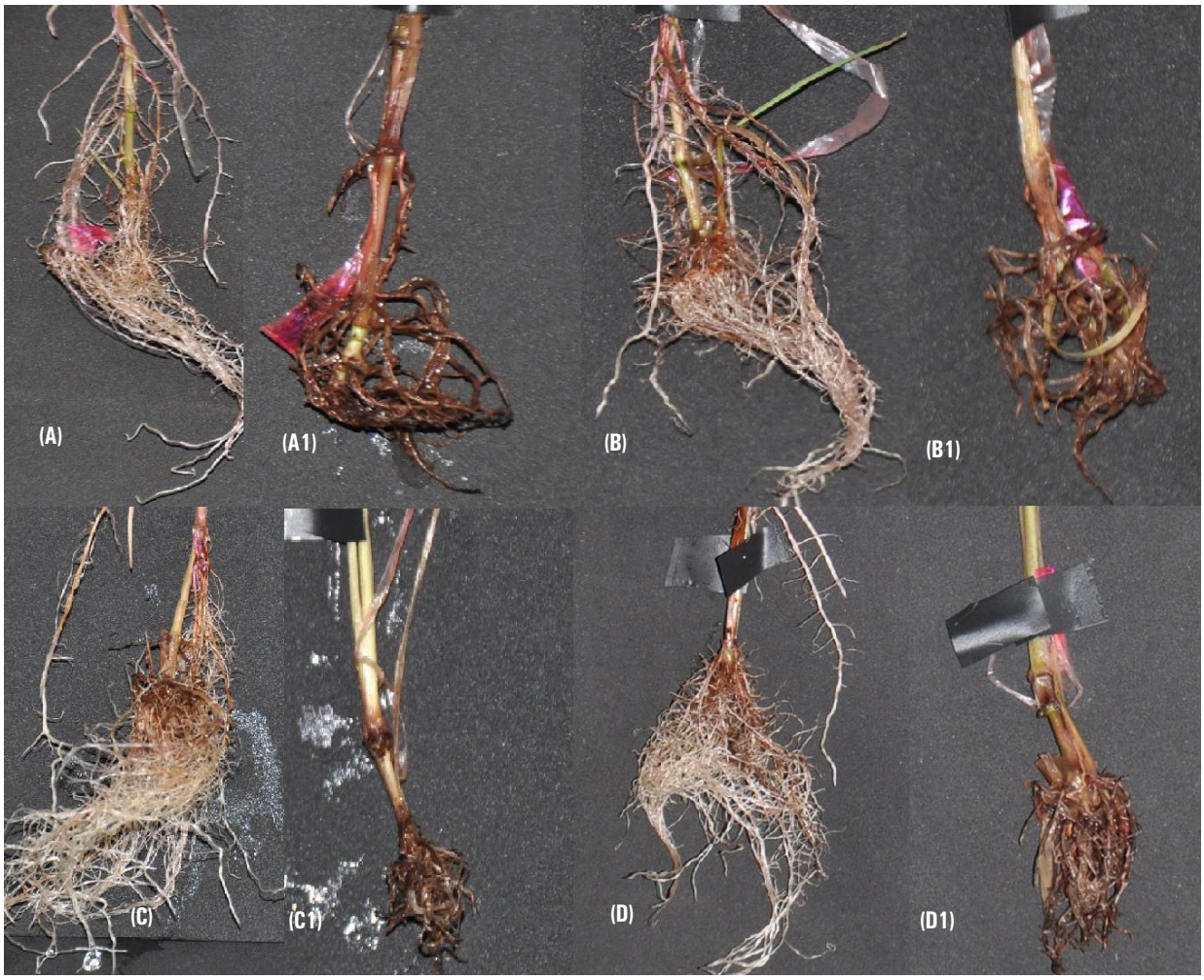

Figura 1. Aspecto das raízes sob o efeito de quatro tratamentos, respectivamente: (A) testemunha, (A1) testemunha com cromo; (B) ácido aspártico, (B1) ácido aspártico com cromo; (C) ácido cítrico, (C1) ácido cítrico com cromo; (D) ácido fumárioco, (D1) ácido fumárico com cromo.

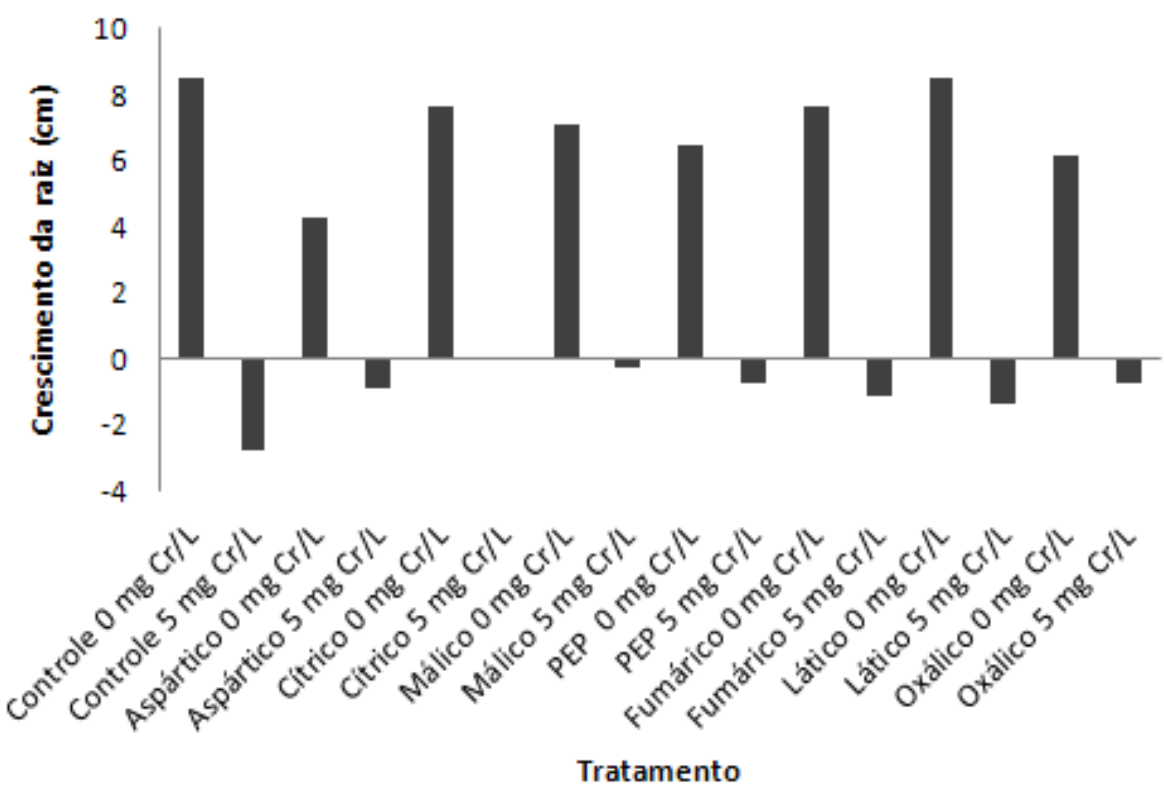

Figura 2. Crescimento da raiz (cm) de cana-de-açúcar em resposta à toxidez por Cr(III) e à aplicação de ácidos orgânicos de baixa massa molecular à solução nutritiva.

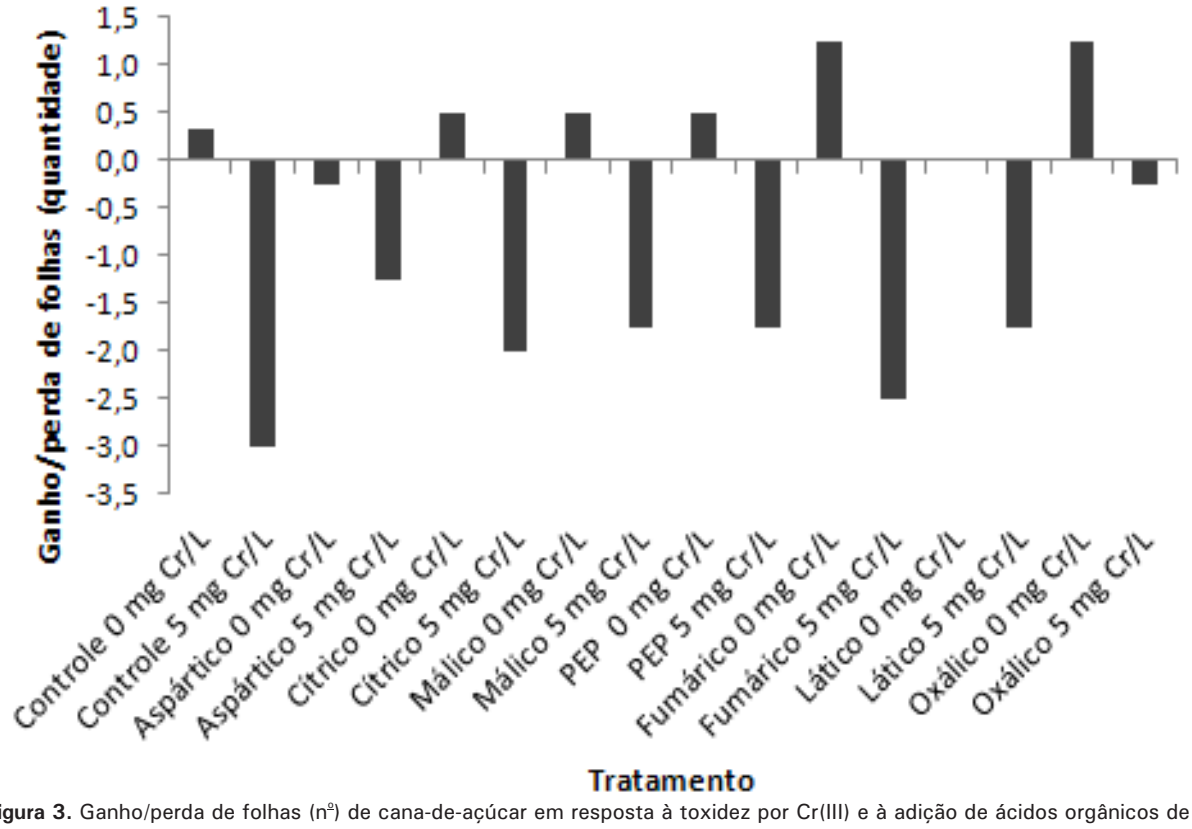

Figura 3. Ganho/perda de folhas (nº) de cana-de-açúcar em resposta à toxidez por Cr(III) e à adição de ácidos orgânicos de baixa massa molecular à solução nutritiva.

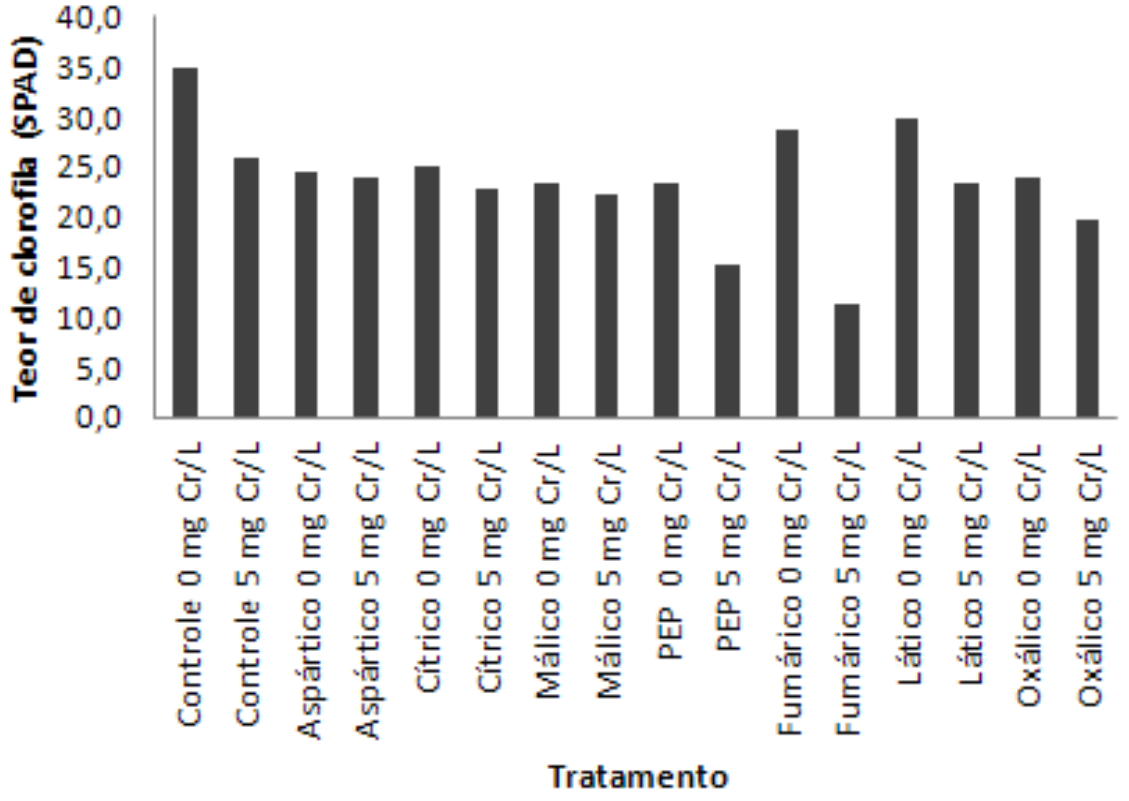

Figura 4. Teor de clorofila (SPAD) de folhas de cana-de-açúcar em resposta à toxidez por Cr(III) e à adição de ácidos orgânicos de baixa massa molecular à solução nutritiva.

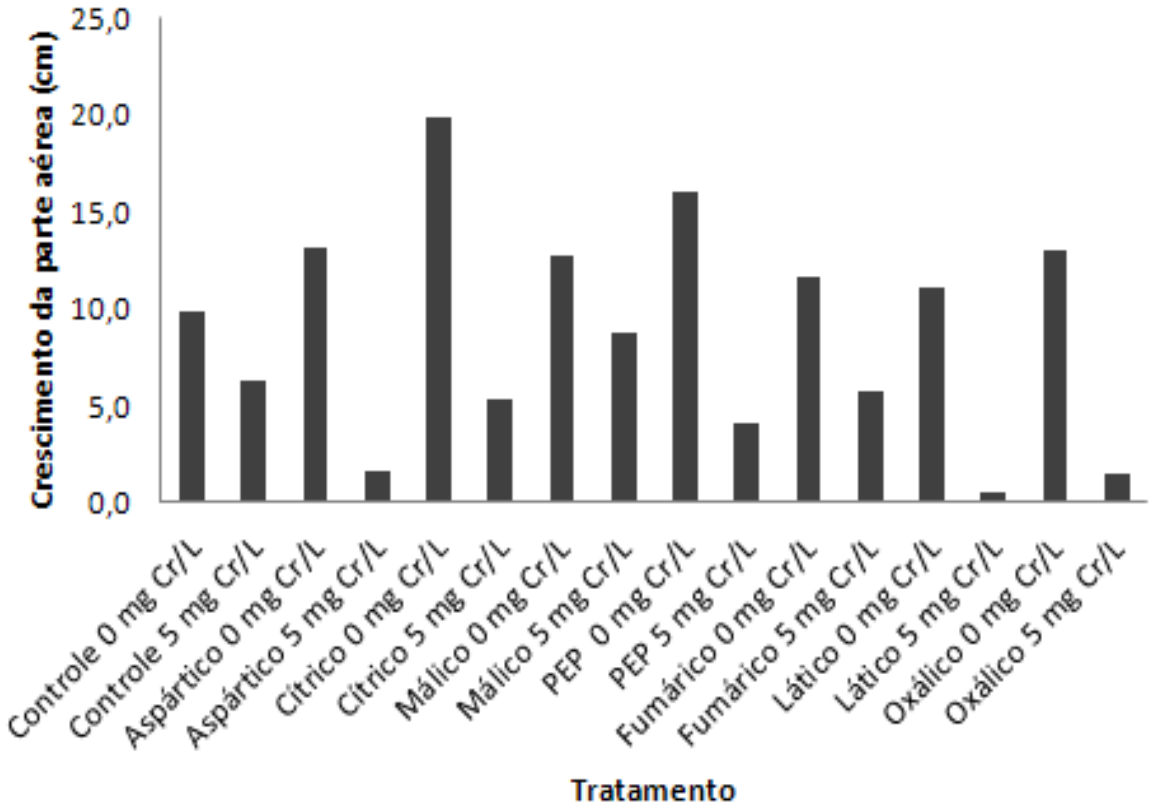

Figura 5. Crescimento da parte aérea (cm) de cana-de-açúcar em resposta à toxidez por Cr(III) e à adição de ácidos orgânicos de baixa massa molecular à solução nutritiva.

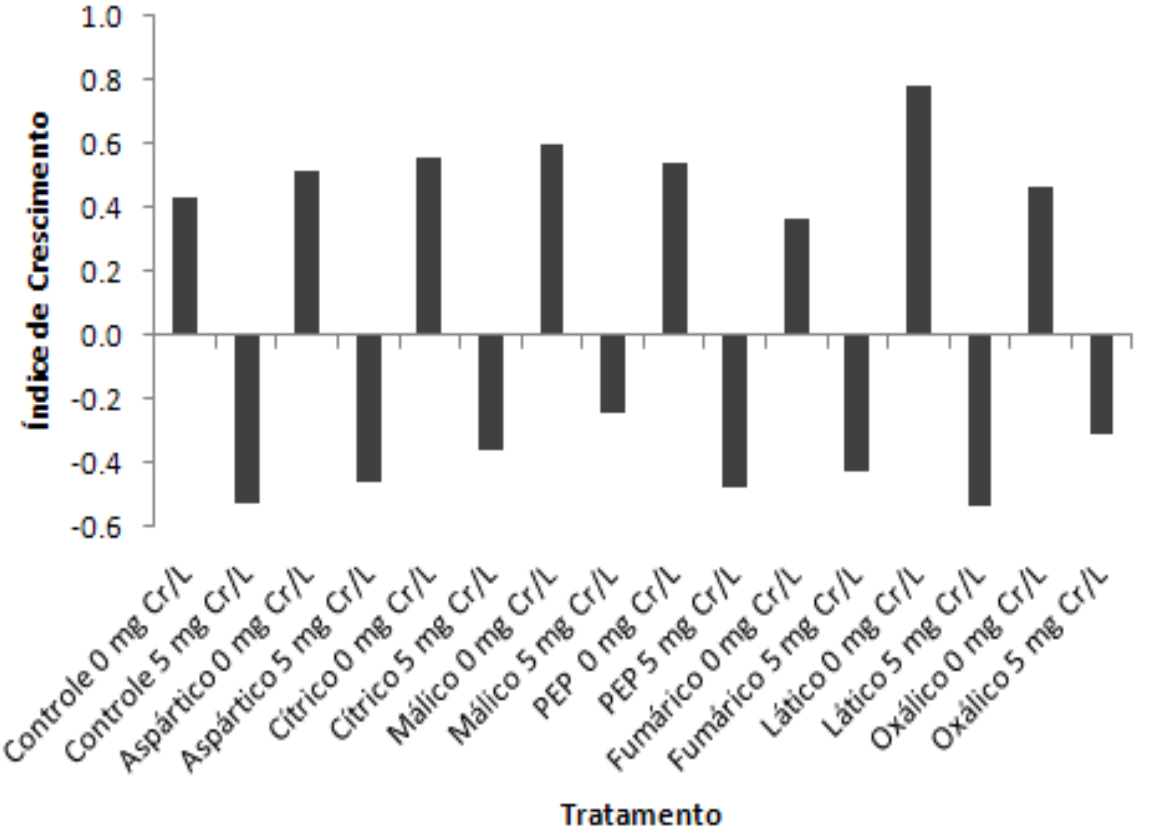

Figura 6. Índice de crescimento de cana-de-açúcar em resposta à toxidez por Cr(III) e à adição de ácidos orgânicos de baixa massa molecular à solução nutritiva.

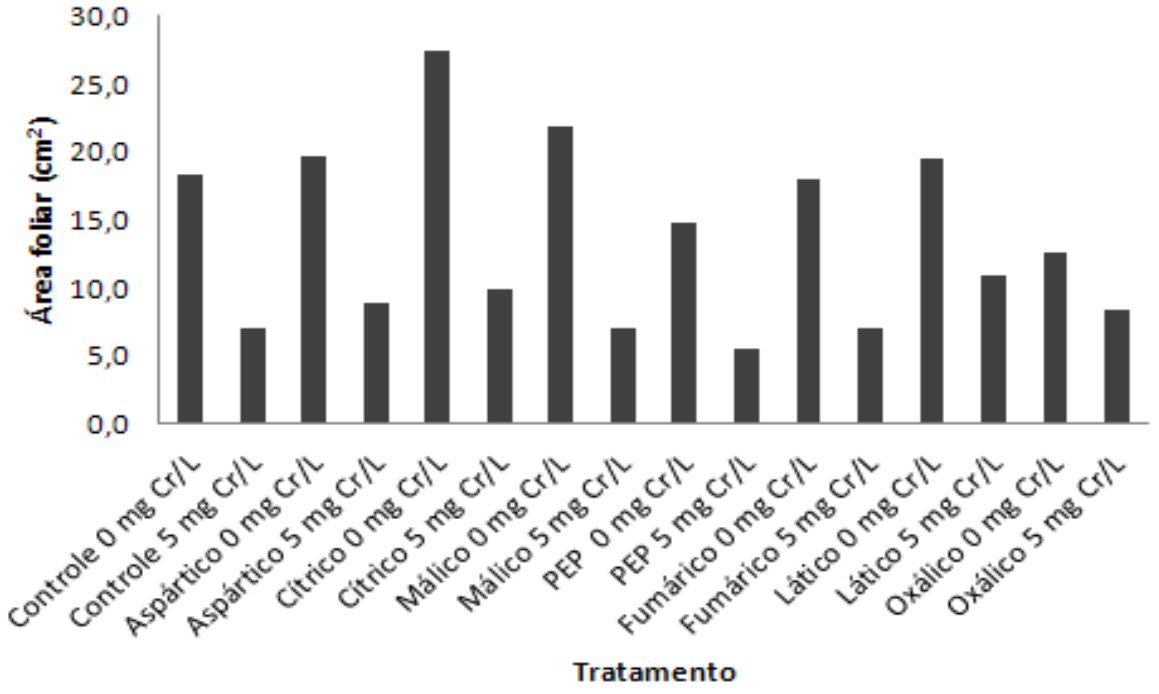

Figura 7. Área foliar (cm^2) de cana-de-açúcar em resposta à toxidez por Cr(III) e à adição de ácidos orgânicos de baixa massa molecular à solução nutritiva.

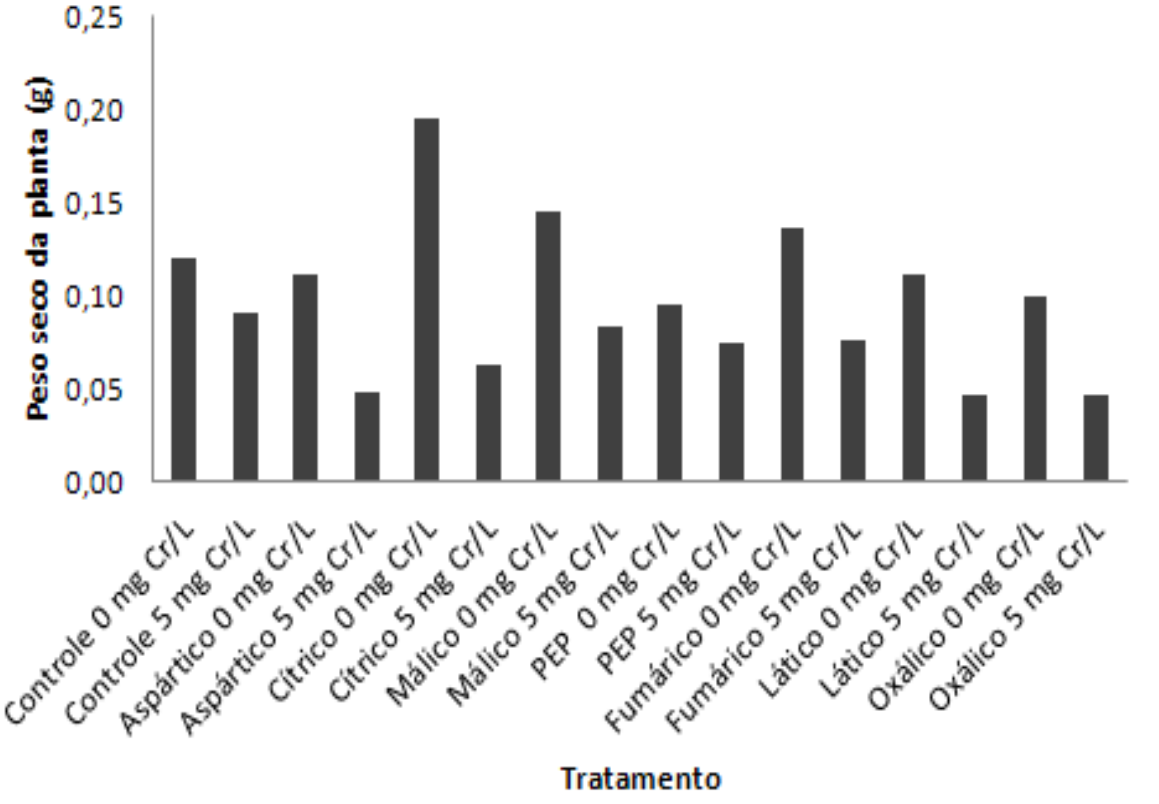

Figura 8. Peso seco (g) (raiz, caule, folhas) de cana-de-açúcar em resposta à toxidez por Cr(III) e à adição de ácidos orgânicos de baixa massa molecular à solução nutritiva.

Referências

ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R.; MAHLER, C. F. **Fitorremediação**: O uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental. São Paulo: Oficina de Textos, 2007. 176p.

CERVANTES, C.; CAMPOS-GARCIA, J; DEVARS, S.; GUTIÉRREZ-CORONA, F.; LOZA-TAVERA, H.; TORRES-GUZMAN, J. C.; MORENO-SANCHEZ, R.; Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS MICROBIOL. **Rev**., v.25, p. 335-347, 2001.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, **Acompanhamento da safra brasileira**. Cana-de-açúcar, safra 2010/2011, terceiro levantamento. Janeiro de 2011.

EPSTEIN, E. & BLOOM, A. J. **Nutrição Mineral de Plantas**. Princípios e perspectivas. Segunda edição. Editora Planta, 2006. 403 páginas.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Ciências Agrárias**, v.28, p. 219-228, 2007.

JORDÃO, C. P.; PEREIRA, M. G.; MATOS, A. T.; PEREIRA, J. Influence of domestic and industrial waste discharges on water quality at Minas Gerais State, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.16, p.241-250, 2005.

LABRA, M.; DE MATTIA, F.; BERNASCONI, M.; BERTACHI, D.; GRASSI, F.; BRUNI, I.; CITTERIO, S. **The combined toxic and genotoxic effects of chromium and volatile organic contaminants to Pseudokirchnerriella subcapitata**. Water Air Soil Pollut, DOI 10.1007/s11270-010-0367-3. Published on line, 2010.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638 páginas.

MORALES, D. K.; OCAMPO, W.; ZAMBRANO, M. M. Efficient removal of hexavalent chromium by a tolerant *Streptomyces* sp. affected by the toxic effect of metal exposure. **J. Appl. Microbiol**., v.103, n.6, p.2704-2712, 2007.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**., v.15, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, R. C.; MELLO, J. W. V.; SILVA, I. R. et al. Avaliação dos Efeitos de cromo tri- e hexavalente no crescimento de soja em solução nutritiva. In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, Recife, 2005. **Anais...** Recife: SBCS, 2005. CD – ROM.

PANDA, S. K; CHOUDHURY, S. Chromium stress in plant. **Braz. Soc. Plant Physiol**., v.17p.95-102, 2005.

VENAY, P.; MOUSSARD-GAUTHIER, C.; HITMI, A interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation , mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. **Chemosphere**, v. 68, 1563-1575, 2007.

WANG, M.; QU, F.; SHAN, X-Q.; LIN, J-M. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **J.Chromatogr. A**, v.989, p.285-292, 2003.