

**RAFAELLA TELES ARANTES FELIPE**

**CRESCIMENTO E RESPOSTAS  
ANTIOXIDATIVAS EM ESPÉCIES LEGUMINOSAS SUBMETIDAS AO  
ARSÊNIO**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F315c  
2007

Felipe, Rafaella Teles Arantes, 1983-  
Crescimento e respostas antioxidativas em espécies  
leguminosas submetidas ao arsênio / Rafaella Teles Arantes  
Felipe. – Viçosa, MG, 2007.  
xi, 29f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 23-25.

1. Plantas - Metabolismo. 2. Leguminosa - Efeito do  
arsênio. 3. Revegetação. 4. Fitorremediação. 5. Arsênio -  
Efeito fisiológico. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22.ed. 572.42

**RAFAELLA TELES ARANTES FELIPE**

**CRESCIMENTO E RESPOSTAS  
ANTIOXIDATIVAS EM ESPÉCIES LEGUMINOSAS SUBMETIDAS AO  
ARSÊNIO**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.**

**APROVADA: 23 de julho de 2007.**

---

**Prof. José cambraia  
(Co-Orientador)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Rosane Maria de A. Euclides**

---

**Prof. Marco Aurélio P. e Silva**

---

**Pesq. Rogério Ferreira Ribas**

---

**Prof. Juraci Alves de Oliveira  
(Orientador)**

*“Ando devagar porque já tive pressa  
e levo esse sorriso porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe,  
eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei,  
eu nada sei*

*Conhecer as manhas e as manhãs,  
o sabor das massas e das maçãs,  
é preciso amor pra poder pulsar,  
é preciso paz pra poder sorrir,  
é preciso a chuva para florir  
Cada um de nós compõe a sua história,  
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,  
de ser feliz...”  
(Renato Teixeira)*

*Ao meu amado pai, Amilton de Souza Felipe:*

*MINHA HOMENAGEM*

*A todos os “mestres” e “doutores” desta vida que possuem simplicidade, sinceridade,  
humildade, respeito e amor ao próximo:*

*OFEREÇO E DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades e bênçãos recebidas.

À minha maravilhosa mãe, Erly, pelo maior amor do mundo, pelo exemplo, pelo carinho e por todo apoio.

Ao meu querido pai, Amilton, pelo amor que muitas vezes não pude compreender.

Aos melhores irmãos do mundo, Diogo, Natália e Andressa, por todo amor e carinho.

A toda minha família maravilhosa e em especial à minha querida avó, Leoza, pelo exemplo de força, ao lindo sobrinho João Vitor por tanta alegria e à cunhadinha Reila pelo carinho.

Aos queridos amigos, Neuzinha, Irisneides, Sivaldo, Marcelo, Roberta, Débora, Cíntia, Regiane e Vitor, que na forma de “mães, pais e irmãos” deixam minha vida mais feliz e cheia de luz.

Aos queridos “Mestres”, Takeshi, Sérgio e Débora, pelo encorajamento e pela força.

À Universidade Federal de Viçosa-UFV pelo curso oferecido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Juraci pelos conselhos, pela amizade, pelas boas risadas, pelo carinho e pela orientação, é claro.

À Gabriela, pela linda amizade que nasceu assim que nos conhecemos, por ser uma querida “Mestra” e tanto nos auxiliar com sua excelente didática, por toda ajuda desde o início do mestrado, pelo carinho, pela força, pelo amor e, principalmente, pelas boas e longas risadas.

Aos estagiários Aldo, Fernanda e, em especial, à Tainá que tanto me auxiliaram na execução deste trabalho.

Ao Prof. Cambraia pela co-orientação, pelos ensinamentos em Fisiologia Vegetal e pela grande ajuda na realização deste trabalho.

Ao Prof. Luiz Eduardo Dias pela co-orientação.

A todos os amigos da Fisiologia Vegetal pela convivência e trocas de experiências.

Ao Prof. Marco Aurélio pelos ensinamentos em Fisiologia Vegetal, pela disponibilidade em analisar esse material e por ser um professor muito querido.

À Profª. Rosane Aguiar e ao Rogério Ferreira Ribas pela disponibilidade em analisar este material.

Aos técnicos e outros funcionários que me auxiliaram em algum momento.

Ao Maurel, minha maior conquista em Viçosa, por toda ajuda, desde a montagem dos experimentos até a conclusão da minha dissertação, pela enorme paciência e compreensão, por todos os ensinamentos, por sua alegria contagiante e acima de tudo, pelo amor, que possibilitou a conclusão deste trabalho e que me ajuda a ser uma pessoa melhor.

Aos queridos “Pirigozos”, Claudinei (Bad), Roni, Jocimar (Mar), Diou, Matt, pelo carinho, pela amizade e por todos os almoços deliciosos de domingo e às respectivas pirigozas, principalmente à Roberta, pelo carinho.

Às colegas de república Josie, Poli e Alexandra pela excelente convivência.

## **BIOGRAFIA**

Rafaella Teles Arantes Felipe, filha de Erly de Fátima Teles Arantes e Amilton de Souza Felipe, nasceu em 18 de julho de 1983, em Rio Verde, GO.

Em julho de 2005, graduou-se em Ciências Biológicas, licenciatura, pela Universidade de Rio Verde.

Iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, em agosto de 2005 e, em julho de 2007, submeteu-se à defesa de tese.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	4
2.1 Obtenção das plantas.....	4
2.2 Efeito do As sobre a taxa de crescimento relativo (TCR) e determinação da concentração deste elemento nas plantas .....	5
2.3 - Efeito do As sobre as atividades enzimáticas .....	5
2.3.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos .....	6
2.3.1.1 Determinação da atividade da SOD .....	6
2.3.1.2 Determinação da atividade da CAT .....	7
2.3.1.3 Determinação da atividade da POX .....	7
2.3.1.4 Determinação da atividade da APX .....	7
2.3.1.5 Determinação da atividade da GR.....	7
2.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	8
3. RESULTADOS.....	8
3.1 Efeito do As sobre a TCR e concentração deste elemento nas plantas.....	8
3.2 Efeito do As sobre as atividades enzimáticas .....	13
4. DISCUSSÃO .....	19
5. CONCLUSÃO .....	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
APÊNDICE.....	26



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Taxa de crescimento relativo de *C. cajan* (●) e *C. spectabilis* (○) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias. ... 9
- Figura 2.** Concentração de As em raízes de *C. cajan* (●) e *C. spectabilis* (○) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias. . 10
- Figura 3.** Concentração de As na parte aérea de *C. cajan* (●) e *C. spectabilis* (○) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias. . 11
- Figura 4.** Taxa de crescimento relativo de *L. leucocephala* (■) e de *S. grandiflora* (□) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias. . 12
- Figura 5.** Concentração de As em raízes de *L. leucocephala* (■) e de *S. grandiflora* (□) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias..... 13
- Figura 6.** Concentração de As na parte aérea de *L. leucocephala* (■) e de *S. grandiflora* (□) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias. .... 13
- Figura 7.** Atividade da SOD em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias..... 16
- Figura 8.** Atividade da CAT em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias..... 17
- Figura 9.** Atividade da POX em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias..... 17
- Figura 10.** Atividade da APX em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias..... 18
- Figura 11.** Atividade da GR em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias..... 18

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Taxa de crescimento relativo de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias..... 9
- Tabela 2.** Concentração de As nas raízes e na parte aérea de *C. cajan* e de *C. spectabilis* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias. . 10
- Figura 3.** Concentração de As na parte aérea de *C. cajan* (●) e *C. spectabilis* (○) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias. . 11
- Tabela 3.** Taxa de crescimento relativo de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias..... 11
- Tabela 4.** Concentração de As em raízes e na parte aérea de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias. .... 12
- Tabela 5.** Atividade da SOD em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias..... 14
- Tabela 6.** Atividade da CAT em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias. .... 14
- Tabela 7.** Atividade da POX em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias. .... 15
- Tabela 8.** Atividade da APX em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias. .... 15
- Tabela 9.** Atividade das GR em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias. .... 16

## RESUMO

FELIPE, Rafaella Teles Arantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007.  
**Crescimento e respostas antioxidativas em espécies leguminosas submetidas ao arsênio.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Co-orientadores: José Cambraia e Luiz Eduardo Dias.

A influência do As sobre a taxa de crescimento relativo (TCR) e sobre o sistema antioxidante de quatro espécies vegetais leguminosas: *Leucaena leucocephala* e *Sesbania grandiflora* (arbóreas) e *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* (arbustivas), foi avaliada, assim como, o acúmulo deste elemento por estas espécies. Após a exposição destas espécies ao As, em solução nutritiva, foram avaliadas a TCR e a atividade enzimática das enzimas: dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), da peroxidase (POX), da peroxidase do ascorbato (APX) e da redutase da glutatona (GR) e o acúmulo de As pelas mesmas. Das espécies arbóreas, *S. grandiflora* apresentou menor influência do As sobre sua TCR, além de apresentar maior acúmulo deste elemento do que *L. leucocephala*. A maior tolerância apresentada por *S. grandiflora* pode estar relacionada às repostas do sistema antioxidante da mesma. *S. grandiflora*, quando cultivada em solução nutritiva sem adição de As, apresentou as maiores atividades das enzimas SOD, CAT, POX e GR do que *L. leucocephala*. Na presença de As, *S. grandiflora* apresentou incremento na atividade da SOD, da CAT e da POX e, *L. leucocephala* apresentou incremento na atividade da SOD e da GR. Das espécies arbustivas, *C. spectabilis* apresentou menor influência do As sobre sua TCR, mesmo apresentando maior concentração deste elemento, do que *C. cajan*. A maior tolerância apresentada por *C. spectabilis* ao As, deve estar relacionada ao eficiente sistema antioxidante apresentado por esta espécie. *C. spectabilis*, quando cultivada em solução contendo As, apresentou incremento na atividade das enzimas SOD, CAT, POX e APX, enquanto que *C. cajan* apresentou redução na atividade destas mesmas enzimas. Apesar de outros estudos serem necessários para conhecer melhor os mecanismos de tolerância ao As, *S. grandiflora* (arbórea) e *C. spectabilis* (arbustiva) parecem ter maiores potenciais para utilização em programas de revegetação de áreas contaminadas com As.

## ABSTRACT

FELIPE, Rafaella Teles Arantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007.

**Growth and antioxidants responses in species leguminous submitted to arsenic.**

Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-Advisers: José Cambraia and Luiz Eduardo Dias.

The arsenic (As) influence on the relative growth rate (TCR) and on the antioxidant system of four leguminous species: *Leucocephala leucocephala*, *Sesbania grandiflora* (woody), *Cajanus cajan* and *Crotalaria spectabilis* (shrub), it was evaluated, as well as, the accumulation of this element for these species. After the exhibition of these species to the As, in nutritious solution, they were appraised TCR and the enzymatic activity of the enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) and the accumulation of As for the same ones. Of the woody species, *S. grandiflora* showed minor influences of the As on TCR, besides presenting larger accumulation of this element than *L. leucocephala*. The largest tolerance presented by *S. grandiflora* can be related to efficient of the antioxidant system of the same. *S. grandiflora*, when cultivated in nutritious solution without addition of As, it presented the largest activities of the enzymes SOD, CAT, POX and GR than *L. leucocephala*. In the presence of As, *S. grandiflora* presented increment in the activity of SOD, of CAT and of POX and, *L. leucocephala* presented increment in the activity of SOD and of GR. Of the shrub species, *C. spectabilis* introduced minor influences of the As on TCR, same presenting larger concentration of this element, that *C. cajan*. The largest tolerance presented by *C. spectabilis* to the As, it should be related to the efficient antioxidant system presented by this species. *C. spectabilis*, when cultivated in solution containing As, it presented increment in the activity of the enzymes SOD, CAT, POX and APX, while *C. cajan* presented reduction in the activity of these same enzymes. In spite of other studies they be necessary to know better the mechanisms of tolerance to the As, *S. grandiflora* (woody) and *C. spectabilis* (shrub) they seem to have larger potentials for use in revegetation programs of polluted areas with As.

# CRESCIMENTO E RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS EM ESPÉCIES LEGUMINOSAS SUBMETIDAS AO ARSÊNIO

## 1. INTRODUÇÃO

A revegetação de solos degradados é prática crescente devido a necessidade de restabelecer ambientes que sofreram alterações por diversas intervenções, como por exemplo, atividade de mineração. Porém, algumas áreas apresentam concentrações elevadas de metais e metalóides tóxicos, o que agrava a situação destes locais, devido ao risco de contaminação de solos vizinhos, águas superficiais e subterrâneas (Boulabah *et al.*, 2006).

Dentre os diversos contaminantes oriundos de atividade de mineração, a liberação de arsênio (As) no ambiente é um dos fatores de maior risco para os ecossistemas, com sérios danos à saúde humana, que incluem efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (Tapio e Grosche, 2006).

A utilização de plantas na redução da contaminação do ambiente, a fitorremediação, é uma alternativa passível de ser utilizada, em substituição ou complementação aos métodos físico-químicos, por ser considerada uma técnica de baixo custo (Aldrich *et al.*, 2007). A fitoestabilização pode estabilizar os contaminantes pela absorção e acúmulo nas raízes e/ou pela adsorção nas raízes e precipitação na rizosfera. Pode ser útil na reabilitação de solos contaminados, reduzindo a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, ambientes vizinhos e a disponibilidade do contaminante entrar na cadeia alimentar (Wong, 2003).

A escolha de espécies vegetais para utilização desta técnica é de grande importância, uma vez que algumas espécies são sensíveis a elementos tóxicos, como o As, e não sobreviveriam na presença do mesmo. Outras, entretanto, são consideradas tolerantes e, assim, indicadas para utilização em programas de revegetação de áreas contaminadas com este poluente.

O arsênio, na forma de arsenato ( $As^{5+}$ ), predomina em ambientes aeróbicos e, devido à similaridade com o fosfato, pode participar de muitas reações celulares, como a substituição do fosfato em macromoléculas de DNA, a competição pelo transportador de fosfato e inibir a síntese de ATP (Paivoke e Simola, 2001; Rosen, 2002). Uma vez absorvido, o arsenato pode ser reduzido a arsenito ( $As^{3+}$ ) e inibir a atividade de várias enzimas, reagindo com os grupos sulfidrílicos das proteínas (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). Outros estudos mostram que este metalóide pode levar ao aumento na

produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) (Bhattacharya e Bhattacharya, 2005), pela oxidação espontânea do arsenito em arsenato e pela inibição da dissipação do gradiente protônico na cadeia transportadora de elétrons, podendo acarretar em desequilíbrio entre os processos de produção e remoção de oxidantes (Kitchin e Ahmad, 2003). Os ROIs como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) são continuamente produzidos, predominantemente, em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Jemiola-Rzemnska *et al.*, 2007). O equilíbrio entre a produção e o consumo dos ROIs pode ser perturbado por diversos fatores estressantes como alta luminosidade, déficit hídrico, baixas temperaturas, metais pesados e outros agentes (Apel e Hirt, 2004).

As plantas exibem várias respostas bioquímicas para proteção contra agentes oxidantes, que incluem a ação de mecanismos enzimáticos, como aumento na atividade da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), das peroxidases (POX), da peroxidase do ascorbato (APX), da redutase da glutatona (GR) e de mecanismos não enzimáticos, como o incremento na produção de tióis (Cao *et al.*, 2004; Santos, 2006).

A enzima dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), um dos mais efetivos processos enzimáticos antioxidantes, catalisa a dismutação do  $O_2^{\bullet -}$ , na presença de prótons, a oxigênio molecular e  $H_2O_2$ . As várias isoenzimas da SOD diferem na natureza do metal presente no centro ativo, na constituição da cadeia aminoacídica e, no número de subunidades. As diferentes isoenzimas da SOD estão localizadas nos cloroplastos, no citosol, nas mitocôndrias, nos peroxissomos e no apoplasto (Valko *et al.*, 2006).

A enzima catalase (CAT EC 1.11.1.6), por sua vez, promove a conversão do  $H_2O_2$  a água e oxigênio molecular e está localizada, principalmente, nos peroxissomos (Mittler, 2002).

As enzimas peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) degradam o  $H_2O_2$  em água e em um composto oxidado, que depende do tipo de peroxidase atuante. São encontradas no citosol, nos vacúolos, nos cloroplastos, na parede celular, no apoplasto, nas mitocôndrias e nos peroxissomos (Mittler, 2002). A POX predominante é a peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), que catalisa a oxidação do ascorbato em peróxido de hidrogênio gerando o desidroascorbato. A APX está presente no citosol, nas mitocôndrias, nos peroxissomos, no apoplasto e nos cloroplastos (Mittler, 2002). A APX participa, juntamente com a redutase da glutatona, do ciclo ascorbato-glutatona.

A redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7) reduz a glutatona oxidada (GSSG) utilizando NADPH, que é utilizada para regenerar o ascorbato, substrato da APX (Apel

e Hirt, 2004). Incremento na atividade da GR resulta em aumento na concentração de glutathiona reduzida (GSH) e decréscimo na concentração de GSSG no interior das células, aumentando assim, a razão GSH/GSSG (Israr *et al.*, 2006). A GSH é um tripeptídeo ( $\gamma$ -glu-cys-gly) que, além de participar do ciclo ascorbato-glutathiona, é capaz de consumir alguns ROIs. A GSH participa, também, na síntese de fitoquelatinas (PC), que são peptídeos não protéicos com a estrutura geral  $(\gamma$ -glu-cys)<sub>n</sub>-gly, em que n varia de 2-11. As PCs podem ser rapidamente sintetizadas, pela sintase da fitoquelatina (PCS, EC 2.3.2.15), em resposta a níveis tóxicos de metais pesados (Schmöger *et al.*, 2000) e arsênio (Pawlik-Skowronska *et al.*, 2004). As PCs produzidas podem, então, formar complexos com os metais, reduzindo a toxicidade dentro das células. Dessa forma, a produção de PCs e a formação dos complexos com os metais tóxicos fazem parte de um importante mecanismo envolvido na tolerância diferencial entre espécies vegetais (Cao *et al.*, 2004; Clemens, 2006).

Espécies vegetais fixadoras de nitrogênio, como as leguminosas *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit., *Sesbania grandiflora* (L.) Pers., *Cajanus cajan* (L.) Millsp e *Crotalaria spectabilis* Roth têm sido indicadas para utilização em programas de revegetação de áreas degradadas, porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de tolerância destas espécies quando expostas ao As (Zhang *et al.*, 2001; Lins *et al.*, 2006). Em parte, esta indicação se deve à capacidade destas espécies sobreviverem em ambientes degradados, com reduzida quantidade de matéria orgânica e de diversos nutrientes, principalmente de nitrogênio (Wong, 2003).

*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. é uma espécie perene, de porte arbóreo, pertencente à família Fabaceae, nativa da América Central. É uma das espécies mais difundidas do gênero *Leucaena*, possui rápido crescimento e seu sistema radicular pode atingir grande profundidade (Barreto *et al.*, 2001).

*Sesbania grandiflora* (L.) Pers. é uma espécie perene, de porte arbóreo, pertencente à família Fabaceae, nativa de países asiáticos e possui boa adaptação a solos com baixa fertilidade. Algumas espécies do gênero *Sesbania* têm demonstrado tolerância a elementos como o Hg (Israr *et al.*, 2006), o Pb (Ruley *et al.*, 2006) e o Cu (Sahi *et al.*, 2007), sendo indicadas para utilização em programas de fitorremediação de áreas contaminadas por estes elementos.

*Cajanus cajan* (L.) Millsp é uma espécie perene, de porte arbustivo, pertencente à família Fabaceae, nativa da África. Essa espécie é indicada para melhorar a fertilidade de solos degradados e compactados, visto que suas raízes quebram as camadas

compactadas e adensadas do solo, favorecendo a infiltração de água e reduzindo a erosão do solo (Wong, 2003).

*Crotalaria spectabilis* Roth é uma espécie perene, de porte arbustivo, pertencente à família Fabaceae, nativa da América do Norte. É de ampla adaptação ecológica, usada como adubo verde e com grande potencial de fixação biológica de nitrogênio (Wong, 2003).

Neste trabalho avaliou-se a taxa de crescimento relativo, o acúmulo de As e algumas respostas antioxidantes de duas espécies arbóreas: *L. leucocephala* e *S. grandiflora* e de duas espécies arbustivas: *C. cajan* e *C. spectabilis*, submetidas ao As, com o objetivo de avaliar o potencial destas espécies para utilização em programas de revegetação de áreas contaminadas com este elemento.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das plantas

Nos experimentos foram utilizadas sementes de duas espécies arbóreas, *L. leucocephala* e *S. grandiflora* e de duas espécies arbustivas, *C. cajan* e *C. spectabilis*, fornecidas pelo Laboratório de Sementes do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Após seleção quanto ao tamanho e forma, as sementes de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* foram imersas em ácido sulfúrico concentrado, por 40 minutos, para quebra de dormência, e posteriormente, as sementes das quatro espécies foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1 %, durante 1 minuto, seguidas de lavagem em água corrente e em água desionizada.

Vinte e cinco sementes de cada espécie foram colocadas para germinar em rolos de papel germtest, parcialmente imersos em recipientes contendo 1,5 L de água desionizada, em sala de crescimento, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, no escuro. Quatro dias após a germinação, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para vasos (4 plantas/vaso) contendo 1,8 L da solução nutritiva de Clark (1975), com pH 6,5 ajustado diariamente, aeradas e colocadas para crescer em sala de crescimento, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sob irradiância de  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo luminoso de 16 horas.



## **2.2 Efeito do As sobre a taxa de crescimento relativo (TCR) e determinação da concentração deste elemento nas plantas**

Após oito dias de crescimento, as plantas foram novamente selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma. As plantas foram então pesadas, transferidas para vasos (4 plantas/vaso) com 1,8 L da solução nutritiva de Clark (1975), com pH 6,5 ajustado diariamente, aeradas, contendo ou não As, na forma de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , nas concentrações de 0,0, 1,5, 2,5, 5,0 e 7,5  $\text{mg L}^{-1}$ . O experimento foi mantido nas mesmas condições de crescimento, por sete dias.

O peso de matéria seca inicial foi estimado a partir de amostras de plantas tomadas do mesmo lote daquelas utilizadas no experimento. Ao final do período de exposição ao As, as plantas foram lavadas com água corrente e água desionizada, pesadas, separadas em raízes e parte aérea. A seguir, foram colocadas para secar em estufa convencional, à temperatura de 80 °C até a obtenção do peso constante.

As taxas de crescimento relativo (TCR) das plantas foram então calculadas utilizando-se a equação:  $\text{TCR} = (\ln w_1 - \ln w_0) \times 1000 / (t_1 - t_0)$ , em que, TCR foi expressa em termos de ganho de massa seca, no período experimental ( $\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ ),  $\ln w_1$  e  $\ln w_0$  correspondem ao logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente, e  $t_1 - t_0$  corresponde à duração do experimento, em dias (Hunt, 1978).

Para determinação dos teores de arsênio, aproximadamente 100 mg de massa seca foram homogeneizados e submetidos à mineralização úmida, com 3 mL de mistura nítrico-perclórica 2:1 e 2 gotas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mantida à temperatura de 90-100 °C, para evitar a volatilização do As, até o aparecimento de profuso fumo branco, que corresponde à completa oxidação da matéria orgânica (Adaptado de Alder e Wilcox, 1985). As amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, analisadas por espectrofotometria de emissão em plasma indutivamente acoplado, marca Perkin Elmer e modelo Optima 3300 DV, no comprimento de onda de 193,7 nm.

## **2.3 - Efeito do As sobre as atividades enzimáticas**

Após 35 dias de crescimento, as plantas foram transferidas para vasos (4 plantas/vaso) contendo 1,8 L da solução nutritiva de Clark (1975), com pH 6,5 ajustado diariamente, aeradas, contendo ou não As, na forma de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , nas concentrações de 0,0 e 1,5  $\text{mg L}^{-1}$ , para as espécies arbóreas e, 0,0 e 5,0  $\text{mg L}^{-1}$ , para as espécies arbustivas (observou-se em experimentos prévios, que as espécies arbóreas e

arbustivas apresentaram comportamentos distintos quando submetidas a doses crescentes de As). As plantas foram mantidas nas mesmas condições de crescimento, durante 3 dias. Ao final do período de exposição, as plantas foram lavadas, com água corrente e desionizada, e separadas em raízes e folhas.

A determinação da concentração de As nas plantas neste experimento seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente.

### **2.3.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos**

Os extratos enzimáticos brutos para a determinação das atividades da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), da catalase (CAT, EC 1.11.1.6), das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e da redutase da glutathione (GR, EC 1.8.1.7) foram obtidos pela homogeneização de 0,3 g de folhas e de raízes em nitrogênio líquido, seguida de adição de 2 mL de meio de extração e de centrifugação a 12.000 xg, por 15 min, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram executadas à temperatura de 4 °C.

Os meios de extração foram: 1) tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mmol L<sup>-1</sup>, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mmol L<sup>-1</sup> e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999), para as enzimas SOD, CAT e POX; 2) tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, ácido ascórbico 1 mmol L<sup>-1</sup>, PMSF 1 mmol L<sup>-1</sup>, ditioneitol (DTT) 2 mmol L<sup>-1</sup> e PVPP 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999), para a APX; 3) tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, triton 0,02 % (v/v), DTT 2 mmol L<sup>-1</sup>, PMSF 1 mmol L<sup>-1</sup> e PVPP 1 % (p/v) (Carlberg e Mannervik, 1985), para a GR.

#### **2.3.1.1 Determinação da atividade da SOD**

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 5 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, contendo metionina 13 mmol L<sup>-1</sup>, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µmol L<sup>-1</sup>, EDTA 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e riboflavina 2 µmol L<sup>-1</sup>. A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação, sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977).

Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

#### **2.3.1.2 Determinação da atividade da CAT**

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mmol L<sup>-1</sup> (Havir e McHale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup> (Anderson *et al.*, 1995) e expressa em μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF.

#### **2.3.1.3 Determinação da atividade da POX**

A atividade das peroxidases foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,8, pirogalol 20 mmol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mmol L<sup>-1</sup> (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mmol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>MF.

#### **2.3.1.4 Determinação da atividade da APX**

A atividade da APX foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mmol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup> (Nakano e Asada, 1981, modificado por Koshiba, 1993). O decréscimo na absorvância a 290 nm foi medido no primeiro minuto de reação, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mmol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup> (Nakano e Asada, 1981) e expressa em μmol de ácido ascórbico min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF.

#### **2.3.1.5 Determinação da atividade da GR**

A atividade da GR foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão tris-HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5, GSSG 1 mmol L<sup>-1</sup>, NADPH 0,1 mmol L<sup>-1</sup> (Carlberg e Mannervik, 1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm foi medido no primeiro minuto de reação, a 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mmol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup> e expressa em μmol de GSSG min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF.

## 2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos para determinação da taxa de crescimento relativo e acúmulo de As, nas espécies arbóreas e arbustivas, foram conduzidos, separadamente, no esquema fatorial 2 x 5 (duas espécies vegetais e cinco concentrações de As), no delineamento em blocos casualizados, com três repetições. Devido à falta de normalidade e homogeneidade, os dados da variável ‘concentração de As em raízes’, nas espécies arbustivas, foram transformados em  $\log(x+50)$ . Atendidos os pressupostos, os dados foram submetidos à análise de variância, pelo teste F a 5 % de probabilidade do erro. Para o fator ‘concentração de As’ ( $\text{mg L}^{-1}$  As), realizou-se análise de regressão polinomial e para o fator ‘espécie’ foi aplicado o teste de Scott-Knot a 5 % de probabilidade para comparação das médias.

Os experimentos para avaliação das atividades enzimáticas nas espécies arbóreas e arbustivas foram conduzidos, separadamente, no esquema fatorial 2 x 2 (duas espécies vegetais e duas concentrações de As), no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Devido à falta de normalidade e homogeneidade, nas espécies arbóreas, os dados das variáveis ‘concentração de As em raízes’ foram transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ , ‘CAT e GR de raízes’ transformados em  $\sqrt{x}$ , e ‘SOD de folhas e de raízes’ transformados em  $1/\sqrt{x}$ . Nas espécies arbustivas, devido à falta de normalidade e homogeneidade, os dados das variáveis ‘concentração de As em raízes’ foram transformados em  $\ln(x+50)$ , ‘POX de raízes’ e ‘GR de folhas’ transformados em  $\sqrt{x+0,5}$  e ‘APX de folhas’ transformados em  $\log(x)$ . Atendidos os pressupostos, os dados foram então submetidos à análise de variância, pelo teste F a 5 % de probabilidade do erro e, em seguida, procedeu-se a comparação das médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa computacional SAEG (Ribeiro, 2001).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Efeito do As sobre a TCR e concentração deste elemento nas plantas

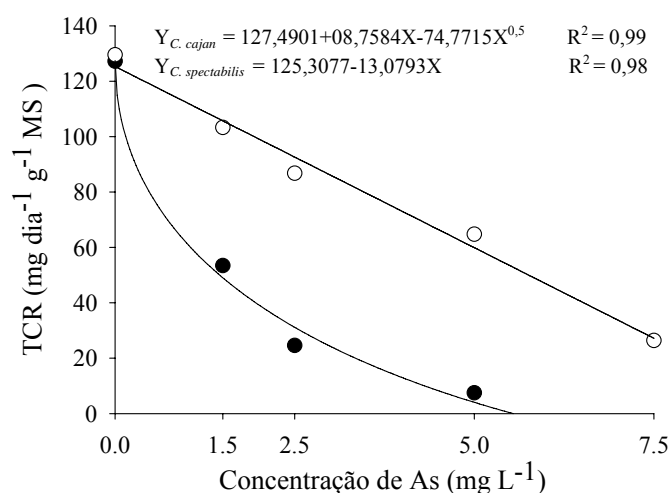
As TCR das espécies arbustivas, *C. cajan* e *C. spectabilis*, mostraram-se semelhantes em condições de cultivo sem a adição de As. Entretanto, quando expostas a concentrações crescentes de As, as taxas de crescimento da espécie *C. spectabilis* foram muito superiores àquelas apresentadas pela espécie *C. cajan* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Taxa de crescimento relativo de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	TCR (mg dia <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> MS)	
	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>
0,0	127,20 a	129,49 a
1,5	53,44 b	103,29 a
2,5	29,59 b	86,79 a
5,0	7,53 b	64,75 a
7,5	-12,57 b	26,40 a

As médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

A exposição das plantas ao As provocou significativa redução na TCR das duas espécies, sendo de forma mais intensa em *C. cajan*. Ficou evidente a maior severidade do dano em *C. cajan*, onde a concentração de As, em solução, capaz de causar redução de 50 % na taxa de crescimento foi de 0,93 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que em *C. spectabilis* foi de 4,80 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Taxa de crescimento relativo de *C. cajan* (●) e *C. spectabilis* (○) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

A elevada sensibilidade da espécie *C. cajan* ao As ficou evidenciada, também, quando foi avaliada a concentração de As nas plantas capaz de causar a redução de 50 % na TCR, sendo de 56,85 µg g<sup>-1</sup> MS de As em *C. cajan* e de 582,13 µg g<sup>-1</sup> MS de As, em *C. spectabilis*.

A espécie *C. spectabilis* apresentou maiores concentrações de As nas raízes do que *C. cajan*, com reduzida translocação para a parte aérea. Entretanto, na parte aérea, apesar da pequena translocação, a espécie *C. cajan* teve concentrações maiores do que *C. spectabilis*, a partir da concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 2).

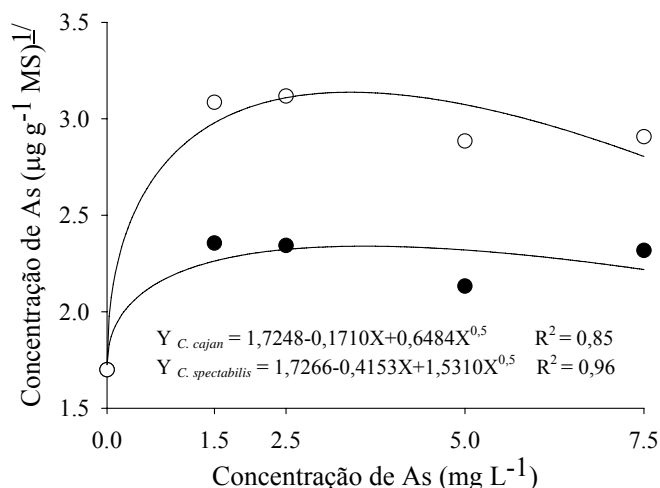
**Tabela 2.** Concentração de As nas raízes e na parte aérea de *C. cajan* e de *C. spectabilis* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração As (μg g <sup>-1</sup> MS)			
	Raiz <sup>1/</sup>		Parte aérea	
	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>
0,0	1,70 a (0,00)	1,70 a (0,00)	0,00 a	0,00 a
1,5	2,35 b (177,12)	3,07 a (1169,33)	7,94 a	7,03 a
2,5	2,34 b (170,58)	3,11 a (1273,05)	11,18 a	8,67 b
5,0	2,13 b (85,83)	2,88 a (716,52)	40,57 a	12,84 b
7,5	2,31 b (157,89)	2,90 a (763,68)	50,45 a	22,14 b

As médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade. <sup>1/</sup>

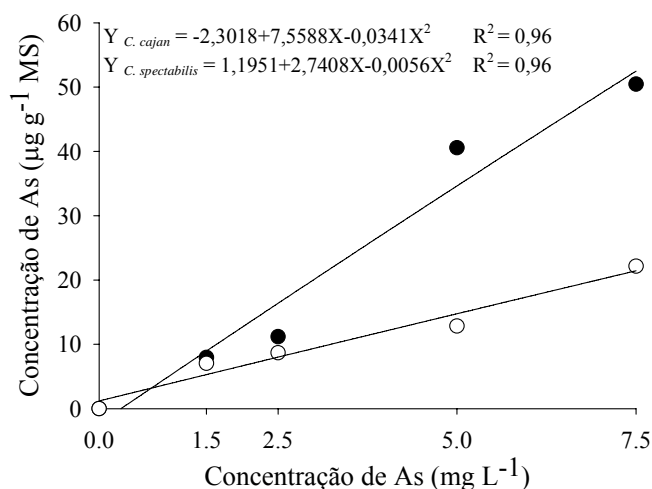
<sup>1/</sup>Dados transformados em log (x+50). Valores entre parênteses correspondem aos valores reais.

A concentração de As nas raízes das duas espécies aumentou até a concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de As em solução, seguida de decréscimo nas maiores concentrações. *C. cajan* apresentou máxima concentração de As em suas raízes, 149,52 μg g<sup>-1</sup> MS, quando submetida a 3,6 mg L<sup>-1</sup> de As e *C. spectabilis* apresentou máxima concentração de As em suas raízes, 1208,92 μg g<sup>-1</sup> MS, quando submetida a 3,4 mg L<sup>-1</sup> deste elemento (Figura 2).



**Figura 2.** Concentração de As em raízes de *C. cajan* (●) e *C. spectabilis* (○) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias. <sup>1/</sup>Dados transformados em log (x+50).

Na parte aérea, *C. cajan* e *C. spectabilis* apresentaram incremento na concentração de As com o aumento da concentração deste elemento em solução, sendo de forma mais intensa em *C. cajan* (Figura 3).



**Figura 3.** Concentração de As na parte aérea de *C. cajan* (●) e *C. spectabilis* (○) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

O cultivo das espécies arbóreas, *L. leucocephala* e *S. grandiflora*, em solução nutritiva, sem adição de As, revelou que elas não diferiram entre si, quanto à TCR. E quando expostas ao As, as duas espécies apresentaram redução na TCR, sendo de forma mais intensa em *L. leucocephala* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Taxa de crescimento relativo de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

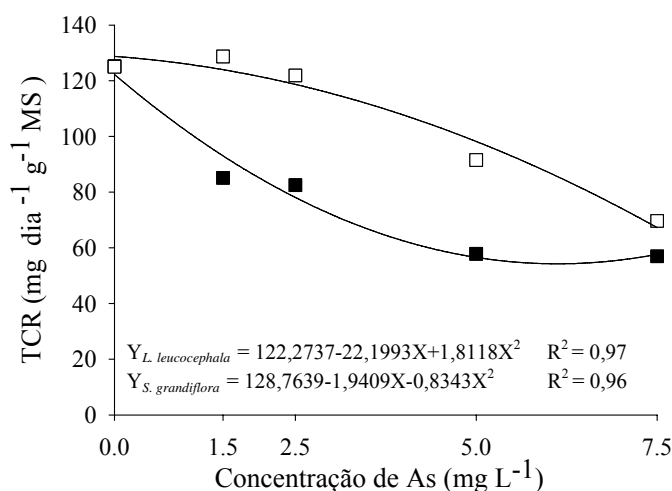
Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	TCR (mg dia <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> MS)	
	<i>L. leucocephala</i>	<i>S. grandiflora</i>
0,0	125,24 a	125,02 a
1,5	85,11 b	128,72 a
2,5	82,11 b	121,93 a
5,0	57,87 b	91,54 a
7,5	56,94 a	69,68 a

As médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

Quando expostas a crescentes concentrações de As, as duas espécies apresentaram significativas reduções na TCR, onde, *L. leucocephala* apresentou os maiores decréscimos. A maior sensibilidade desta espécie ao As, também pode ser constatada observando-se a concentração deste elemento em solução capaz de reduzir em 50 % sua TCR. Enquanto *S. grandiflora* apresentou redução de 50 % em sua TCR quando cultivada em 7,5 mg L<sup>-1</sup> de As, *L. leucocephala* demonstrou essa mesma redução quando cultivada em 4,2 mg L<sup>-1</sup> de As (Figura 4).

Quando se relaciona a redução na TCR com os teores de As nas plantas, verifica-se que a espécie *S. grandiflora* realmente apresenta maior tolerância,

requerendo 727,27  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS de As para redução de 50 % em sua TCR, enquanto que *L. leucocephala* requereu 482,28  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS de As para redução de 50 % em sua TCR.



**Figura 4.** Taxa de crescimento relativo de *L. leucocephala* (■) e de *S. grandiflora* (□) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

Embora os efeitos tóxicos do As tenham sido mais evidentes em *L. leucocephala*, com maior redução em sua TCR, os maiores acúmulos deste elemento, tanto em raízes como na parte aérea, ocorreram em *S. grandiflora* (Tabela 4).

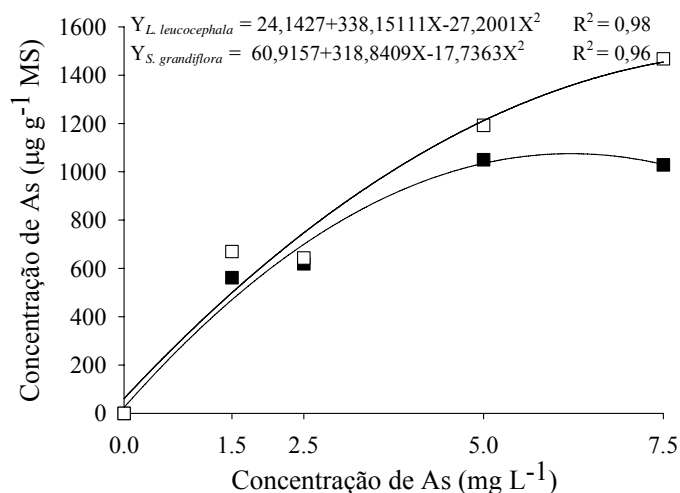
**Tabela 4.** Concentração de As em raízes e na parte aérea de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MS)			
	Raiz		Parte aérea	
	<i>L. leucocephala</i>	<i>S. grandiflora</i>	<i>L. leucocephala</i>	<i>S. grandiflora</i>
0,0	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
1,5	561,38 a	669,75 a	5,32 b	32,02 a
2,5	618,70 a	643,49 a	7,65 b	25,41 a
5,0	1050,03 b	1192,63 a	10,77 b	34,03 a
7,5	1028,87 b	1467,73 a	19,75 b	30,00 a

As médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

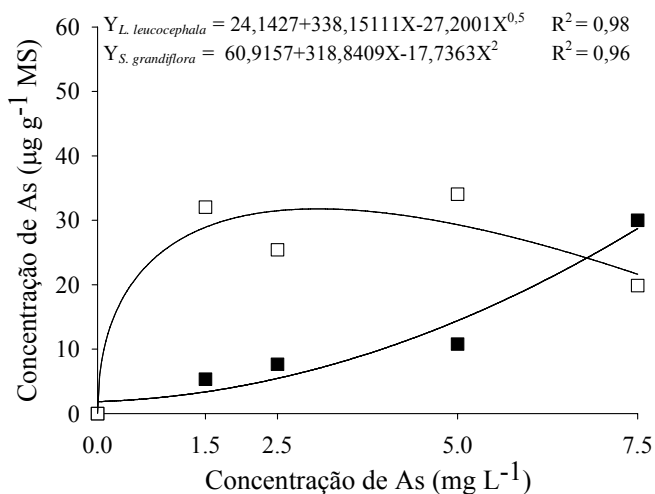
A concentração de As nas raízes de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* aumentou com o incremento da concentração deste elemento em solução, sendo de forma mais intensa em *S. grandiflora* (Figura 5).





**Figura 5.** Concentração de As em raízes de *L. leucocephala* (■) e de *S. grandiflora* (□) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

A concentração de As na parte aérea de *L. leucocephala* aumentou com o incremento da concentração de As em solução, enquanto que em *S. grandiflora* houve uma redução na concentração deste elemento em sua parte aérea nas maiores concentrações (Figura 6).



**Figura 6.** Concentração de As na parte aérea de *L. leucocephala* (■) e de *S. grandiflora* (□) submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

### 3.2 Efeito do As sobre as atividades enzimáticas

Nas espécies arbustivas, a atividade da SOD em folhas, foi maior na espécie *C. spectabilis* em todos os tratamentos e, mesmo quando expostas ao As, não sofreu alteração. Na espécie *C. cajan* exposta ao As, entretanto, a atividade da SOD teve redução de 60 %.

Em raízes, quando cultivadas em solução sem As, a espécie *C. cajan* teve maior atividade da SOD do que *C. spectabilis*. Entretanto, sob exposição ao As, observou-se incremento de 70 % na atividade desta enzima em *C. spectabilis*, enquanto que em *C. cajan* a atividade foi mantida sem alteração significativa (Tabela 5).

**Tabela 5.** Atividade da SOD em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Atividade da SOD (Unidades de SOD g <sup>-1</sup> MF)			
	Folhas		Raízes	
	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>
0,0	9,38 Ab	11,50 Aa	14,02 Aa	9,41Bb
1,5	3,87 Bb	10,32 Aa	11,98 Ab	16,18 Aa

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade para raízes e a 7 % de probabilidade para folhas.

A atividade da CAT em folhas de *C. cajan* foi maior do que em *C. spectabilis*, independente da concentração de As. Em raízes, entretanto, a exposição ao As ocasionou redução de 34 % na atividade da CAT em *C. cajan*, enquanto que em *C. spectabilis* houve incremento de 116 % (Tabela 6).

**Tabela 6.** Atividade da CAT em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Atividade da CAT (μmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> MF)					
	Folhas			Raízes		
	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	Média	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	Média
0,0	1841,66	545,43	1193,55 B	174,15 Aa	60,16 Bb	117,16
1,5	2171,98	685,26	1428,62 A	114,97 Ba	131,80 Aa	123,43
Média	2006,82 a	615,35 b	1311,08	144,56	96,02	120,29

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

A atividade da POX foi maior em folhas de *C. cajan* e não se observou alteração significativa quando as plantas, das duas espécies, foram expostas ao As. Em raízes, entretanto, a exposição ao As causou redução na atividade da POX em *C. cajan* e aumento na atividade desta enzima em *C. spectabilis* (Tabela 7).

**Tabela 7.** Atividade da POX em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Atividade da POX ( $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ )					
	Folhas			Raízes		
	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	Média	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	Média
0,0	247,80	86,03	166,91	688,50 Aa	698,84 Ba	693,67
1,5	272,87	108,72	190,79	485,71 Bb	804,40 Aa	645,06
Média	260,33 a	97,37 b	178,85	587,11	751,62	669,36

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

Em folhas da espécie *C. cajan* a atividade da APX foi maior do que em *C. spectabilis*, independente da concentração de As. Maiores atividades foram, também, observadas em raízes das plantas cultivadas em solução sem As. Entretanto, quando *C. cajan* foi exposta ao As, essa atividade reduziu intensamente, assim como ocorreu para a atividade da CAT e da POX. Em *C. spectabilis*, assim como ocorreu com as atividades da SOD, da CAT e da POX, a exposição ao As resultou em aumento na atividade da APX, superando os valores apresentados por *C. cajan* (Tabela 8).

**Tabela 8.** Atividade da APX em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Atividade da APX ( $\mu\text{mol de ascorbato min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ )					
	Folhas			Raízes		
	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	Média	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	Média
0,0	20,88	6,18	13,53 B	8,46 Aa	1,19 Bb	4,82
1,5	26,95	7,51	17,23 A	0,94 Bb	3,65 Aa	2,29
Média	23,91 a	6,84 b	15,38	4,70	2,42	3,56

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

A atividade da GR, em folhas, foi maior em *C. cajan*, independente da concentração de As. Em raízes, com a exposição das plantas ao As, verificou-se incremento na atividade da GR em ambas as espécies (Tabela 9).

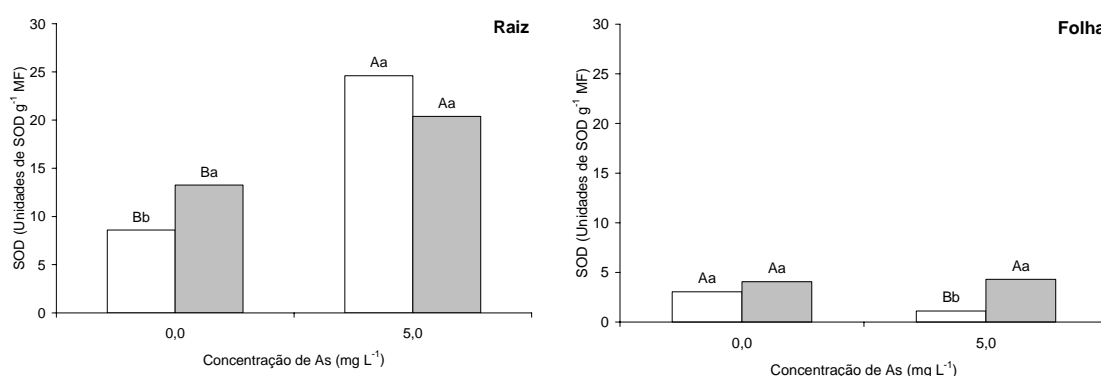
**Tabela 9.** Atividade das GR em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Atividade da GR (μmol de glutatona oxidada min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> MF)					
	Folhas			Raízes		
	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	Média	<i>C. cajan</i>	<i>C. spectabilis</i>	Média
0,0	5,53	2,51	4,02 B	0,88	0,95	0,91 B
1,5	7,27	3,71	5,49 A	1,87	2,63	2,25 A
Média	6,40 a	3,11 b	4,76	1,37	1,79	1,58

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

Das espécies arbustivas, *L. leucocephala* apresentou redução de 66 % na atividade da SOD em folhas, enquanto que em *S. grandiflora* não ocorreu alteração significativa, quando expostas ao As em solução.

*S. grandiflora* apresentou maior atividade da SOD, em raízes do que *L. leucocephala*, quando cultivadas em solução sem adição de As. Ao serem tratadas com As, as duas espécies apresentaram incremento na atividade desta enzima, com aumento de 200 % em *L. leucocephala* e de 54 % em *S. grandiflora* (Figura 7).

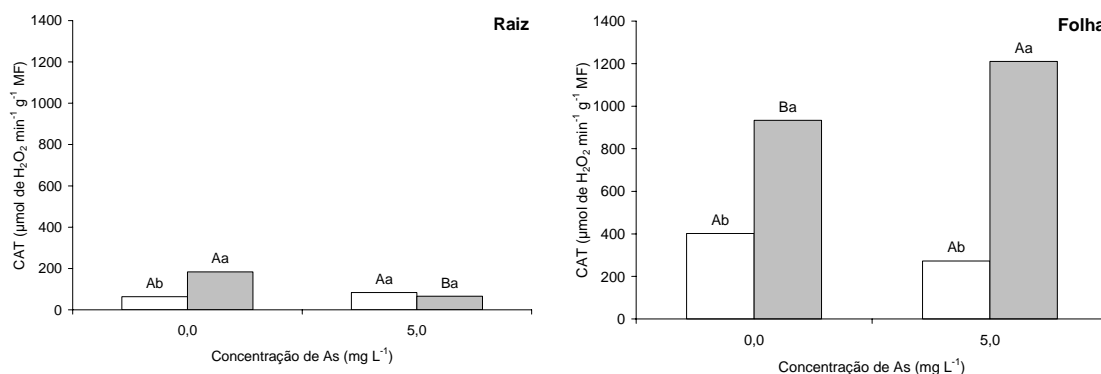


**Figura 7.** Atividade da SOD em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula, entre as concentrações de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para a mesma concentração de As, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

*S. grandiflora* apresentou maior atividade da CAT em folhas do que *L. leucocephala*, quando cultivadas em solução sem adição de As. Quanto submetidas ao As, *S. grandiflora* apresentou incremento de 30 %, na atividade da CAT, enquanto que em *L. leucocephala* a atividade desta enzima não sofreu variação.

Em raízes, *S. grandiflora* também apresentou maior atividade da CAT do que *L. leucocephala*, quando cultivadas em solução sem adição de As. Entretanto, quando exposta ao As, a atividade desta enzima em *S. grandiflora* sofreu redução de 64 %,

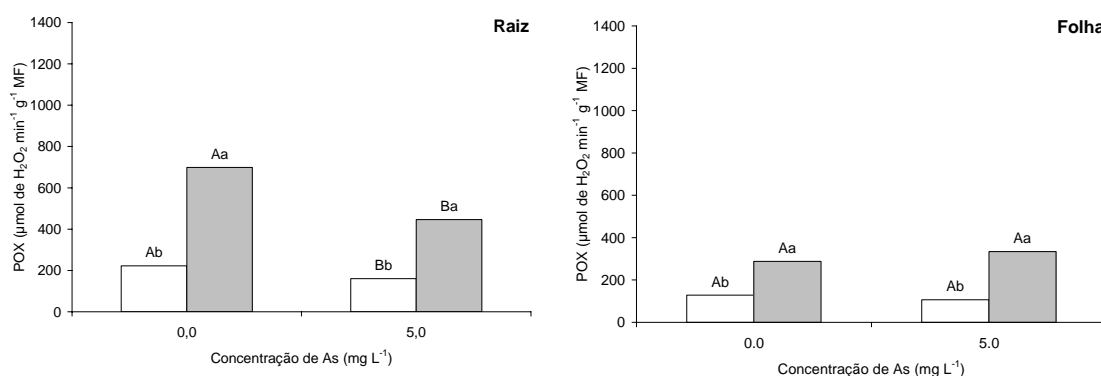
enquanto que em *L. leucocephala* não foi observada alteração significativa, quando expostas ao As (Figura 8).



**Figura 8.** Atividade da CAT em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula, entre as concentrações de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para a mesma concentração de As, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

A atividade da POX, em folhas de *L. leucocephala* e de *S. grandiflora* não sofreu alteração pela presença do As em solução, sendo as maiores atividades observadas em *S. grandiflora* (Figura 9).

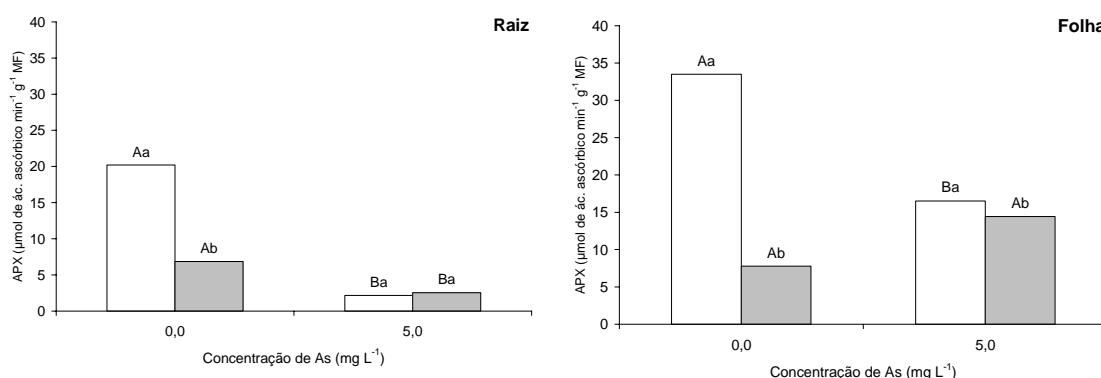
*S. grandiflora* também apresentou maior atividade desta enzima em raízes, independentemente do tratamento. Nas duas espécies observou-se redução na atividade das POX nas raízes quando as plantas foram expostas ao As. Essa redução foi de 28 % em *L. leucocephala* e de 33 % em *S. grandiflora*, mas, ainda assim, *S. grandiflora* permaneceu com as maiores atividade das POX do que *L. leucocephala* (Figura 9).



**Figura 9.** Atividade da POX em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula, entre as concentrações de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para a mesma concentração de As, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

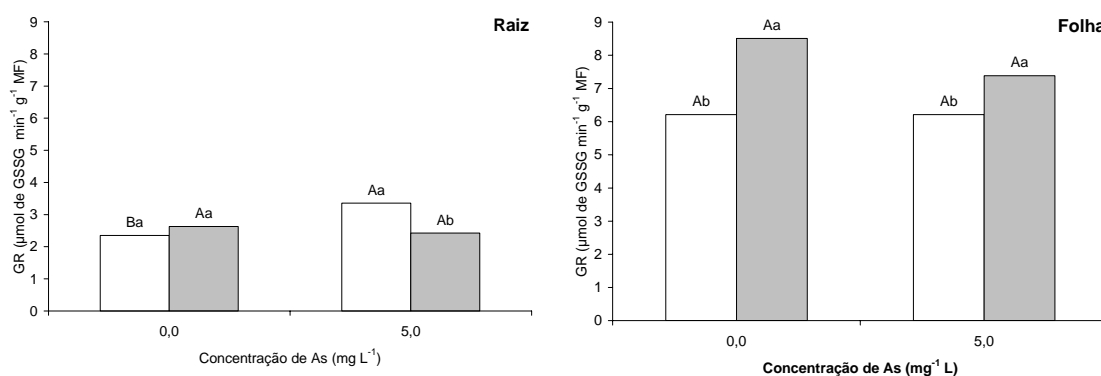
Em solução nutritiva sem adição de As, *L. leucocephala*, tanto em folhas como em raízes, apresentou maior atividade da APX do *S. grandiflora*. Ao serem expostas ao As, observou-se decréscimo de 51 % na atividade da APX em folhas de *L. leucocephala* e em *S. grandiflora*, por outro lado, a atividade desta enzima não apresentou alteração significativa.

Nas raízes das duas espécies houve decréscimo na atividade da APX quando expostas ao As, alcançando redução de 90 % em *L. leucocephala* e de 66 % em *S. grandiflora* (Figura 10).



**Figura 10.** Atividade da APX em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula, entre as concentrações de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para a mesma concentração de As, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade.

A atividade da GR em folhas de *L. leucocephala* e de *S. grandiflora* não sofreu alteração pela presença do As em solução e *S. grandiflora* apresentou maior atividade desta enzima em folhas (Figura 11).



**Figura 11.** Atividade da GR em raízes e em folhas de *L. leucocephala* (□) e *S. grandiflora* (■) submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula, entre as concentrações de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para a mesma concentração de As, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Em raízes, *L. leucocephala* apresentou incremento de 42 % na atividade da GR, enquanto que *S. grandiflora* não sofreu alteração na atividade desta enzima, quando expostas ao As. (Figura 11).

#### 4. DISCUSSÃO

A menor ação tóxica do As na espécies *C. spectabilis* (arbustiva) e *S. grandiflora* (arbórea), demonstrada pela menor redução na taxa de crescimento, mesmo sob elevadas concentrações As em seus tecidos, indica a maior tolerância destas espécies ao As e seu potencial para utilização em revegetação de áreas contaminadas com As, uma vez que a tolerância é uma das principais características para seleção de espécies potencialmente úteis para revegetação de áreas contaminadas (Sahi *et al.*, 2007).

A maioria das espécies vegetais estudadas retém o As absorvido, predominantemente, em suas raízes, como observado nas espécies *C. cajan*, *C. spectabilis*, *L. leucocephala* e *S. grandiflora*, no presente trabalho. Isto pode ocorrer devido à capacidade de compartimentação do As, principalmente no vacúolo dos tecidos radiculares, resultando em menor translocação para a parte aérea (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1997) e, conseqüentemente, redução dos efeitos tóxicos do As. Isso pode estar relacionado à maior tolerância apresentada por *C. spectabilis* ao As, com retenção de 97 % do As absorvido em suas raízes, enquanto que *C. cajan* reteve cerca de 75 % (espécies arbustivas). As espécies arbóreas, *C. spectabilis*, *L. leucocephala* reteram 98 % do As absorvido em suas raízes. Adicionalmente, a maior retenção do elemento absorvido nas raízes é de grande importância em programas de revegetação de áreas contaminadas, pois diminui o risco de dispersão do contaminante no ambiente (Boularbah *et al.*, 2006; Madejón e Lepp, 2007) e sua entrada na cadeia alimentar (French *et al.*, 2006).

*C. cajan* (arbustiva) e *L. leucocephala* (arbórea) demonstraram elevada sensibilidade ao As, com intensa redução na taxa de crescimento relativo, mesmo acumulando menores concentrações de As. A redução na produção de biomassa pode ocorrer por restrições no transporte radicular, prejudicando a absorção de água e nutrientes (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1997) ou devido ao aumento na produção de ROIs, causando vários danos celulares, como a peroxidação de lipídeos (Bhattacharya e Bhattacharya, 2005). A atuação de agentes antioxidantes, como a SOD, a CAT, a POX,

a APX e a GR podem evitar a ação tóxica dos ROIs e, assim, conferir maior tolerância a este elemento tóxico (Cao *et al.*, 2004; Santos, 2006).

A atividade da enzima dismutase do superóxido na espécie arbustiva *C. cajan*, aparentemente, não foi capaz de atenuar os danos causados pelo aumento do  $O_2^{\bullet -}$ . Embora, nas raízes, não tenha ocorrido alteração na atividade desta enzima, nas folhas verificou-se decréscimo, o que pode resultar em acúmulo de  $O_2^{\bullet -}$  e, conseqüentemente, de outros ROIs, aumentando os danos oxidativos celulares. *L. leucocephala* também apresentou redução na atividade desta enzima em suas folhas, o que sugere que também nesta espécie maiores danos possam ter ocorrido. Verifica-se que, para outros elementos de menor potencial tóxico, essa redução ocorre apenas em elevadas concentrações do elemento, conforme observado na espécie *C. cajan* submetida diferentes concentrações de Zn e Ni (Madhava Rao e Sresty, 2000).

Estudos com *Zea mays* (Mylona *et al.*, 1998), *Trifolium pratense* (Mascher *et al.*, 2002), *Pteris vittata* e *Pteris ensiformis* (Singh *et al.*, 2006), *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* (Santos, 2006) mostraram aumento na atividade da SOD após exposição ao As. No presente trabalho, esse aumento foi observado em raízes de *C. spectabilis*, *L. leucocephala* e *S. grandiflora* sugerindo que esta enzima faça parte do mecanismo de defesa antioxidante, podendo conferir, algumas vezes, maior tolerância ao As.

Os aumentos na atividade da CAT em folhas de *C. cajan*, de *S. grandiflora* e em folhas e em raízes de *C. spectabilis*, tratadas com As, indicam que houve incremento na produção de  $H_2O_2$ , conforme observado em condições de estresse oxidativo (Mittler, 2002), mas que esse aumento de  $H_2O_2$  pode não ter resultado em efeitos tóxicos, devido à ação antioxidante dessa enzima. Estudos com *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima*, submetidas a cinco diferentes concentrações de As, mostraram aumento na atividade da CAT nas menores concentrações e redução na atividade desta enzima, nas maiores concentrações de As (Santos, 2006). Essa redução foi observada em raízes de *C. cajan* e *S. grandiflora*, sugerindo que o excesso de ROIs possa ter provocado a oxidação da CAT (Ronsein *et al.*, 2006).

Algumas espécies vegetais, como o tomate, quando expostas ao As, apresentam redução na atividade da POX (Miteva *et al.*, 2005), assim como observado em raízes de *C. cajan*, *S. grandiflora* e *L. leucocephala* no presente trabalho. Em outras espécies, no entanto, observa-se incremento na atividade desta enzima (Mascher *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2004), assim como observado em raízes de *C. spectabilis*, sugerindo que, em



algumas espécies, a POX também faz parte do mecanismo de defesa antioxidante contra os danos oxidativos provocados pelo As.

Estudos indicam que a atividade da APX é importante componente do mecanismo antioxidante quando as espécies vegetais são expostas a concentrações menores de As (Santos, 2006; Cao *et al.*, 2004), mas quando expostas às maiores concentrações, ocorre significativa redução na sua eficiência e/ou na sua síntese (Roisen *et al.*, 2006). Possivelmente, isto pode ter ocorrido em *C. cajan*, que mesmo apresentando maior atividade da APX em folhas e em raízes, teve expressiva redução na atividade desta enzima em raízes, quando submetida ao As. *S. grandiflora* e *L. leucocephala* também apresentaram redução na atividade da APX, principalmente em suas raízes, local onde apresentou a maior concentração de As. Na espécie *C. spectabilis* exposta ao As, por sua vez, observou-se o incremento na atividade da APX em folhas e em raízes, demonstrando que esta enzima, juntamente com a POX, a SOD e a CAT são de grande importância nas respostas de defesa contra o estresse oxidativo provocado pelo As, nesta espécie.

O incremento na atividade da enzima GR é importante componente do mecanismo antioxidante das plantas expostas a elementos tóxicos, conforme observado em *Sesbania drummondii* exposta ao Hg (Israr *et al.*, 2006) e *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia mínima*, expostas ao As (Santos, 2006). No presente trabalho, o aumento na atividade da GR, em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* e em raízes de *L. leucocephala*, reforça a participação desta enzima como agente de proteção antioxidativa, através do aumento na razão glutatona reduzida/glutatona oxidada (GSH/GSSG). A GSH, por sua vez, além de fazer parte do ciclo ascorbato/glutatona, é capaz de consumir alguns ROIs.

As duas espécies arbustivas avaliadas, assim como as arbóreas, apresentaram comportamentos distintos com relação às atividades enzimáticas. *C. spectabilis* apresentou incremento na atividade de todas as enzimas analisadas (SOD, CAT, POX, APX e GR), principalmente em suas raízes, onde foi determinada a maior concentração do As absorvido. Já *C. cajan* apresentou redução na atividade da SOD, da CAT, da POX e da APX, principalmente em suas raízes, onde foi observada a maior concentração do As absorvido. *L. leucocephala* e *S. grandiflora* apresentaram comportamento semelhante com relação às atividades enzimáticas, onde as maiores alterações ocorreram, também, em suas raízes. *L. leucocephala* apresentou redução na atividade das enzimas POX e APX e incremento na atividade da SOD e da GR. *S. grandiflora* apresentou redução na atividade da CAT, da POX e da APX, incremento na

atividade da SOD e não sofreu alteração na atividade da GR. Embora *L. leucocephala* e *S. grandiflora* tenham apresentado comportamento semelhante quanto às atividades enzimáticas, *S. grandiflora* apresentou maior tolerância ao As do que *L. leucocephala*.

## 5. CONCLUSÃO

Das espécies arbustivas, *C. spectabilis* além de apresentar maior acúmulo de As, exibiu menor efeito deste elemento sobre sua TCR, indicando ser mais tolerante ao As do que *C. cajan*.

A maior tolerância de *C. spectabilis* aos efeitos do As, pode estar relacionada a mecanismos antioxidantes, pois, esta espécie apresentou aumento na atividade da SOD, da CAT, das POX, da APX, da GR, em raízes, quando submetida ao As.

Apesar de outros estudos serem necessários para conhecer melhor estes e outros mecanismos de tolerância ao As, *C. spectabilis* parece ter maior potencial para utilização em programas de revegetação de áreas contaminadas com As.

Das espécies arbóreas *S. grandiflora*, além de apresentar maior acúmulo de As, sofreu menor efeito deste elemento sobre sua TCR, indicando ser mais tolerante a este elemento do que *L. leucocephala*.

A maior tolerância de *S. grandiflora* aos efeitos do As, pode estar relacionada aos mecanismos antioxidantes, principalmente em relação à atividade das enzimas SOD e GR.

Apesar de outros estudos serem necessários para conhecer melhor os mecanismos de tolerância ao As, *S. grandiflora* parece ter maior potencial para utilização em programas de revegetação de áreas contaminadas com As.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alder PR, Wilcox GE (1985) Rapid perchloric acid digest methods for analysis of major elements in plants tissue. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 16:1153-1163.
- Aldrich MV, Peralta-Videa JR, Parsons JG, Gardea-Torresdey JL (2007) Examination of arsenic (III) and (V) uptake by the desert plant species mesquite (*Prosopis* spp.) using X-ray absorption spectroscopy. *Science of the Total Environment* 379: 249–255.
- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiology* 109:1247-1257.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-99.
- Barreto AC, Fernandes MF (2001) Cultivo de *Gliricidia sepium* e *Leucaena leucocephala* em alamedas visando a melhoria dos solos dos tabuleiros costeiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36:1287-1293
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287.
- Bhattacharya A, Bhattacharya S (2005) Induction of stress by arsenic in *Clarus batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66:178-187.
- Boularbah A, Schuartz C, Bitton G, Abouddrar W, Ouhammou A, Movel JL (2006) Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere* 63:811-817.
- Cao X, Ma LQ, Tu C (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environmental Pollution* 128:317-325.
- Carbonell-Barrachina AA, Burló F, Burgos-Hernández A, López E & Mataix J (1997) The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. *Scientia Horticulturae* 71:167-176.
- Carlberg C, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. In: Meister, A. (ed.), *Methods in Enzymology*, pp.488-495. New York, Academic Press.
- Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymology* 2:764-775.
- Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal Agricultural Food Chemistry* 23:458-460.
- Clemens S (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology* 163:319-332.
- French CJ, Dickinson NM & Putwain PD (2006) Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environmental Pollution* 141:387-395.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases. *Plant Physiology* 59:309-314.

- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84:450-455.
- Hunt R (1978) *Plant growth analysis*. London: Edward Arnold Limited.
- Israr M, Sahi S, Datta R & Sakar D (2006) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* 65:591-598.
- Jemiola-Rzeminska M, Rivera C, Suwalsky M, Strzalka K (2007) Interaction of arsenic compounds with model phospholipid membranes. *Thermochimica Acta* 458:132-137.
- Kar M, Nishra D, (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.
- Kitchin KT, Ahmad S (2003) Oxidative stress as a possible mode of action of arsenic carcinogenesis. *Toxicology Letters* 137:3-13.
- Koshiha T (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiology* 34:713-721.
- Lins CEL, Cavalcante UMT, Sampaio EVSB, Messias AS, Maia LC (2006) Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in a copper contaminated soil. *Applied Soil Ecology* 31: 181-185.
- Madhava Rao KV, Sresty TVS (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn e Ni stresses. *Plant Science* 157:113-128.
- Madejón P, Lepp NW (2007) Arsenic in soils and plants of woodland regenerated on an arsenic-contaminated substrate: A sustainable natural remediation? *Science of the Total Environment*. 379:256-262.
- Mascher R, Lippmann B, Holzinger S, Bergmann H (2002) Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science* 163:961-969.
- Meharg AA, Hartley-Whitaker J (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist* 154:29-43.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.
- Miteva E, Hristova D, Nenova V, Maneva N (2005) Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. *Scientia Horticulturae* 105:343-358.
- Mylona PV, Polidoros AN, Scandalios JG (1998) Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. *Free Radical Biology & Medicine* 25:576-585.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22:867-880.
- Paivoke AEA, Simola LK (2001) Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49:111-121.
- Pawlik-Skowronska B, Pirszel J, Kalinowska R, Showronski T (2004) Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquatic Toxicology* 70:201-212.

- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim PR, Moreira MA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11:137-143.
- Ribeiro Júnior, JL (2001) *Análises Estatísticas no SAEG*. 1. ed. Editora Folha de Viçosa, Viçosa.
- Ronsein GE, Miyamoto S, Bechara E, Di Mascio P (2006) Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova* 29:563-568.
- Rosen BP (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters* 529:86-92.
- Ruley AT, Sharma NC, Sahi S, Singh SR & Sajwan KS (2006) Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grow in soil. *Environmental Pollution* 144:11-18.
- Sahi SV, Israr M, Srivastava AK, Gardea-Torresdey JL & Parsons JG (2007) Accumulation, speciation and cellular localization of copper in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* 67:2257-2266.
- Santos GA (2006) Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao arsênio. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Mestrado.
- Schmöger MEV, Oven M, Grill E (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology* 122:793-802.
- Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science* 170:274-282.
- Tapio S, Grosche B (2006) Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutation Research* 612:215-246.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160:1-40.
- Wong MH (2003) Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50: 775-780.
- Zhang ZQ, Shu WS, Lan CY, Wong MH (2001) Soil seed bank as an input of seed source in revegetation of lead/zinc mine tailings. *Restoration Ecology* 9:378-385.

## APÊNDICE

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância da TCR e da concentração de As em raízes de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		TCR	Concentração de As
Bloco	2	21,3930798 <sup>ns</sup>	35141,411028 <sup>**</sup>
Espécie	1	5009,542296 <sup>**</sup>	153204,064535 <sup>**</sup>
Concentração de As	4	3775,023595 <sup>**</sup>	1465993,087801 <sup>**</sup>
Espécie x concentração de As	4	529,503032 <sup>**</sup>	46183,189213 <sup>**</sup>
Resíduo	18	79,263447	4813,624360
CV (%)		9,43	9,59

\*\* (P< 0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância da atividade da SOD em folhas e em raízes de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas <sup>1</sup>	Raízes <sup>1</sup>
Espécie	1	0,214640 <sup>**</sup>	0,001907 <sup>ns</sup>
Concentração de As	4	0,089831 <sup>**</sup>	0,027116 <sup>**</sup>
Espécie x concentração de As	4	0,109924 <sup>**</sup>	0,005117 <sup>**</sup>
Resíduo	18	0,002306	0,000352
CV (%)		7,65	7,18

\*\* (P< 0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

1. Dados transformados em  $1/\sqrt{x}$ .

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância da atividade da CAT em folhas e em raízes de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas	Raízes <sup>1</sup>
Espécie	1	1620625,574567 <sup>**</sup>	14,98126 <sup>**</sup>
Concentração de As	1	16454,818917 <sup>**</sup>	13,517560 <sup>**</sup>
Espécie x concentração de As	1	123806,814936 <sup>**</sup>	32,454073 <sup>**</sup>
Resíduo	8	6114,286378	0,604154
CV (%)		11,10	8,04

\*\* (P< 0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

<sup>1</sup>. Dados transformados em  $\sqrt{x}$ .

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância da atividade da POX em folhas e em raízes de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas	Raízes
Espécie	1	112897,163032 **	436970,604108 **
Concentração de As	1	407,074305 ns	74508,032643 **
Espécie x concentração de As	1	3398,986059 ns	27371,153040 **
Resíduo	8	2788,568990	825,769838
CV (%)		24,64	7,18

\*\* (P < 0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

**Tabela 5.** Resumo da análise de variância da atividade da APX em folhas e em raízes de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas	Raízes
Espécie	1	579,940053 **	126,079686 **
Concentração de As	1	79,705637 ns	374,228849 **
Espécie x concentração de As	1	418,670853 **	141,622895 **
Resíduo	8	23,971016	0,789131
CV (%)		27,13	11,18

\*\* (P < 0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

**Tabela 6.** Resumo da análise de variância da atividade da GR em folhas e em raízes de *L. leucocephala* e *S. grandiflora* submetidas a 0,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas	Raízes <sup>1</sup>
Espécie	1	9,049233 **	0,025404 ns
Concentração de As	1	0,947499 ns	0,041610 ns
Espécie x concentração de As	1	0,948521 ns	0,098587 **
Resíduo	8	0,486254	0,010668
CV (%)		9,85	6,32

\*\* (P < 0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

<sup>1</sup>. Dados transformados em  $\sqrt{x}$

**Tabela 7.** Resumo da análise de variância da TCR e da concentração de As em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a diferentes concentrações de As, em solução nutritiva, durante sete dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		TCR	Concentração de As <sup>1</sup>
Bloco	2	41.381146 ns	3885.451542 <sup>ns</sup>
Espécie	1	12793.745105 **	3235920.290774 **
Concentração de As	4	12169.756126 **	477318.602940 **
Espécie x concentração de As	4	981.754000 **	267529.529121 **
Resíduo	18	83.707267	5443.043839
CV (%)		14,95	16,52

\*\* (P<0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

<sup>1</sup>. Dados transformados em log (x+50).

**Tabela 8.** Resumo da análise de variância da atividade da SOD em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas	Raízes
Espécie	1	55,033471 **	0,123222 <sup>ns</sup>
Concentração de As	4	33,528936 **	16,828152 **
Espécie x concentração de As	4	14,091054 <sup>o</sup>	58,215092 **
Resíduo	18	3,254791	1,951343
CV (%)		20,58	10,83

\*\* (P<0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

<sup>o</sup> (P<0,07) Significativo a 7 % de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.

**Tabela 9.** Resumo da análise de variância da atividade da CAT em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas	Raízes
Espécie	1	5808607,161378 **	7069,874182 **
Concentração de As	4	165780,877830 *	118,021039 <sup>ns</sup>
Espécie x concentração de As	4	27217,072188 <sup>ns</sup>	12851,957579 **
Resíduo	18	20436,851032	343,569231
CV (%)		11,90	15,41

\*\* (P<0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

\* (P<0,05) Significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste F.

ns Não-significativo.



**Tabela 10.** Resumo da análise de variância da atividade da POX em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas <sup>1</sup>	Raízes
Espécie	1	116,385988 **	81194,315401 **
Concentração de As	4	2,588029 <sup>ns</sup>	7089,806987 <sup>ns</sup>
Espécie x concentração de As	4	0,148321 <sup>ns</sup>	71310,910727 **
Resíduo	18	1,090406	3043,598306
CV (%)		8,04	8,24

\*\* (P< 0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não-significativo.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ .

**Tabela 11.** Resumo da análise de variância da atividade da APX em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas <sup>1</sup>	Raízes
Espécie	1	0,870445 **	15,593793 **
Concentração de As	4	0,027033 *	19,236002 **
Espécie x concentração de As	4	0,00247 <sup>ns</sup>	74,816707 **
Resíduo	18	0,003750	0,464733
CV (%)		5,56	19,16

\*\* (P< 0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

\* (P< 0,05) Significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não-significativo.

<sup>1</sup> Dados transformados em log (x).

**Tabela 12.** Resumo da análise de variância da atividade da GR em folhas e em raízes de *C. cajan* e *C. spectabilis* submetidas a 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em solução nutritiva, durante três dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Folhas <sup>1</sup>	Raízes
Espécie	1	1,579968 **	0,520746 <sup>ns</sup>
Concentração de As	4	0,319812 **	5,387183 **
Espécie x concentração de As	4	0,000242 <sup>ns</sup>	0,353414 <sup>ns</sup>
Resíduo	18	0,008451	0,188016
CV (%)		4,07	27,41

\*\* (P< 0,01) Significativo a 1 % de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não-significativo.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ .