

LARISSE DE FREITAS SILVA

**RESPOSTAS MORFOLÓGICAS EM ESPÉCIES DE *BRASSICACEAE* EXPOSTAS A
DIFERENTES DOSES DE ARSÊNIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

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

T

S586r
2011

Silva, Larisse de Freitas, 1987-
Respostas morfológicas em espécies de *Brassicaceae*
expostas a diferentes doses de arsênio / Larisse de Freitas
Silva. – Viçosa, MG, 2011.
ix, 33f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: João Marcos de Araujo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 21-23.

1. *Brassicaceae*. 2. Arsênio. 3. Poluição. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 583.64

LARISSE DE FREITAS SILVA

**RESPOSTAS MORFOLÓGICAS EM ESPÉCIES DE *BRASSICACEAE* EXPOSTAS A
DIFERENTES DOSES DE ARSÊNIO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 08 de dezembro de 2011.

Prof^a. Dr^a. Luzimar Campos da Silva

Prof. Dr. José Francisco de Souza

Prof. Dr. João Marcos de Araujo
(Orientador)

Aos meus queridos pais, por acreditarem na minha educação e me apoiarem em todos os momentos de minha vida.

DEDICO.

“A vida nunca é fácil para aqueles que sonham”

(Robert James Waller)

“Na vida, as coisas são como tem de ser. Nem sempre acontece o que se quer. Tudo é possível, dentro da relatividade das possibilidades e das percepções. Na natureza, nada é fixo; tudo vibra, tudo muda. A flexibilidade é a grande firmeza. Quando o vento vier, seja como o bambu novinho: balance, mas não caia! Quebrar, para quê?”

(Wagner Borges)

AGRADECIMENTOS

A Deus, presença constante em minha vida, pelas inúmeras provas de todo seu amor e por me sustentar ao longo dessa caminhada, permitindo mais uma vitória.

A Universidade Federal de Viçosa, por me acolher durante mais uma etapa da minha vida profissional e a FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu orientador, professor João Marcos de Araujo, por todos os ensinamentos transmitidos durante a execução desse trabalho, pela paciência e carinho, muito obrigada!

A professora Luzimar Campos da Silva (Luzis, Tia Lú, Luzi-má), pelas preciosas dicas, pela atenção despendida a mim, por estar sempre presente, me acolher com muita prestatividade, pela amizade e as boas gargalhadas, muito obrigada. Sem você, seria mais difícil.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira, por toda sua competência e disponibilidade.

Ao Departamento de Biologia Geral, especificamente a todos do Laboratório de Ultraestrutura Celular, obrigada por compartilharem boas e longas horas comigo.

Ao Departamento de Biologia Vegetal, aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, obrigada por abrirem as portas para mim, por serem tão agradáveis, prestativos, acolhedores e dedicados, por me fazerem sentir como se estivesse em meu próprio laboratório, possibilitando o intercâmbio de ensinamentos e aprendizagem que muito contribuíram para meu desenvolvimento profissional e pessoal, determinantes para escolha dos próximos passos.

A Nívea, pessoa que surgiu em minha vida em 2005 e agora, anos depois, me atormenta como técnica e alegre como amiga. Obrigada pelas gargalhadas, pelos pratos deliciosos que você faz pra gente, pela companhia nas festas, por estar sempre ligada no 220 V e claro, por ser chata demais no laboratório.

Aos técnicos Monteiro, Carlos e Alex, por me ajudarem na rotina do laboratório e estarem sempre disponíveis, tornando o meu dia-a-dia mais agradável.

A Naiara, obrigada por ter me permitido aprender um pouco mais sobre *Borreria verticillata*, arsênio, hidroponia e condicionar-me a viver com emoção “eu gosto de emoção.” Extrema satisfação eu sinto em ter compartilhado com você uma fase tão importante de ambas vidas e aprendido, acima de tudo que “tudo é possível àquele que crê”. Quanta competência, menina!

As amigas de república: Márcia e Maria Fernanda, obrigada pela convivência harmoniosa e as boas cervejas com risos. As longas conversas e os planos as vezes incertos dessa vida de pós graduandas faz-me crer que tudo valerá muito a pena!

A Pensão, obrigada por ter existido e se transformado em meu lar, onde eu conheci as melhores companhias, pessoas que estarão sempre comigo, mesmo com a distância, as quais eu sou eternamente grata por toda ajuda prestada: Talita (Tatá), Wellington (Pé) e Jaqueline (Jaques) e vivi os melhores e piores momentos destes anos. Nunca me esquecerei de vocês.

A Talita, a pequena nordestina que chegou ao mais apurado estilo mineiro e aos poucos se tornou uma grande amiga! Obrigada Tatá por tudo que fizemos e ainda faremos juntas, por confiar a mim coisas tão importantes, por me ajudar à hora e local que fossem, por ser minha dupla! Com você tudo ficou mais leve, mais fácil.

Ao Pé, obrigada pela presença tão intensa, sendo personificação de superação e determinismo. Foi difícil gostar de você viu, menino. Mas depois também, que grude. Quanta saudade da sua presença em meu cotidiano. Obrigada por cada segundo que vivi ao seu lado, por tudo que aprendi.

Ao Bruno, amigo e exemplo, obrigada pelas imprescindíveis dicas nos nossos cafés filosóficos, pelos longos e-mails respondidos. O senhor Sant’Anna-

Santos que um dia foi quase meu co-orientador, hoje é Bubú e por ter entrado e permanecido em minha vida, eu nutro por você os mais belos sentimentos.

A Daiane e Di (Môr), um agradecimento todo especial pela amizade tão consistente e pela ajuda “sem noção” nas análises estatísticas. Vocês são um casal exemplo de que é possível aliar bom humor, diversão e muita competência!

Aos amigos de perto, aos amigos de longe, aos novos e velhos amigos: Débora, Laila, Paula, Lorena, Juliana, Daniela, Adriano, Josimar e Cristiano, muito obrigada por cada momento compartilhado.

Aos meus pais, pessoas pelas quais eu tenho amor imensurável, minha eterna gratidão por todos os ensinamentos transmitidos durante minha vida. Obrigada por eu ter nascido na melhor família do mundo.

A toda minha família, meu irmão (nosso engenheiro calouro) e minhas tias, especialmente a Tia Nó, por ser a minha segunda mãe e a tia Mônica que possibilitou desde cedo a minha educação em bases sólida.

A cidade de Viçosa, por hora, o meu melhor lugar do mundo.

Muito obrigada!

Sumário

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	8
3.2. Avaliação visual e de crescimento das plântulas.....	8
3.3. Concentração de arsênio na matéria seca.....	9
3.4. Análise morfológica.....	9
3.5. Análises estatísticas.....	10
4. RESULTADOS.....	11
4.1. Morfologia visual e análise do crescimento.....	11
4.2. Teor de arsênio nos órgãos.....	11
4.3. Alterações morfológicas.....	12
5. DISCUSSÃO.....	13
6. CONCLUSÕES.....	17
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

RESUMO

SILVA, Larisse de Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2011. **Respostas morfológicas em espécies de *Brassicaceae* expostas a diferentes doses de arsênio.** Orientador: João Marcos de Araujo. Coorientador: Juraci Alves de Oliveira.

O arsênio (As) é um contaminante ambiental e representa um grave problema em diversas regiões do mundo. Com o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos do arsênio em plântulas da família *Brassicaceae*, sementes de *Brassica oleraceae*, *Raphanus sativus*, *Brassica oleraceae* var. capitata, *Brassica oleraceae* var. itálica e *Brassica juncea* foram postas para germinar na presença do metalóide. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos: controle, 250 μMol , 350 μMol e 450 μMol de As na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e seis repetições. Foram avaliados: o crescimento das plântulas, o acúmulo de As nas raízes e na parte aérea, as alterações morfológicas nas raízes e folíolos, além das análises morfométricas dos folíolos e raízes de *B. oleraceae* e *B. juncea*. Houve absorção do poluente pela raiz e baixa translocação para a parte aérea em quatro das cinco espécies estudadas. As plântulas das cinco espécies apresentaram redução do crescimento e algumas apresentaram acúmulo de antocianinas nos folíolos e no caule. Anatomicamente, não houve alteração nos folíolos de quatro das cinco espécies estudadas, sendo *B. juncea* a única espécie que apresentou danos no limbo. O sistema radicular das cinco espécies, por sua vez, apresentou alterações morfológicas em virtude da presença do metalóide. As análises micromorfométricas revelaram que o arsênio alterou a espessura e a proporção dos tecidos, sendo os resultados mais expressivos foram observados nas concentrações mais elevadas. Esses dados tornam-se relevantes, principalmente, do ponto de vista anatômico, já que são escassas estas informações para a grande maioria das espécies vegetais quando expostas ao arsênio.

ABSTRACT

SILVA, Larisse de Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2011. **Morphological responses in Brassicaceae species exposed to different doses of arsenic.** Adviser: João Marcos de Araujo. Co-adviser: Juraci Alves de Oliveira.

Arsenic (As) is an environmental contaminant and represents a serious problem in several regions in world. To evaluate the toxic effects of As in *Brassicaceae* family, seeds of *Brassica oleraceae* L., *Raphanus sativus*, *Brassica oleraceae* var. capitata, *Brassica oleraceae* var. itálica and *Brassica juncea* L. (Czern.) were germinated in metalloids presence. The experimental design was completely randomized with four treatments: control, 250 μmol , 350 μmol , and 450 μmol of arsenic ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), six repetitions. Were evaluated: growth of plants, the accumulation of As in roots and shoots, the morphological changes in roots and leaves and morphometric analyzes in roots and leaves of *B. Oleraceae* L. And *B. juncea*. There was uptake of the pollutant by the roots and low translocation to shoots in four of the five species. All species showed reduced growth and some showed accumulation of anthocyanins in leaves and stem. Anatomically, there was no change in the leaves of four of the five species studied, *B. juncea* the only species that showed damage. The root system of the five species showed morphological changes due to the presence metalloids. The morphometric analysis revealed the arsenic change the thickness and the proportions of tissues. The most dramatic results were observed at higher concentrations. These data are relevant, specially in anatomical study.

INTRODUÇÃO

Quimicamente, metal pesado é definido como um grupo de elementos situados entre o cobre e o chumbo na tabela periódica tendo pesos atômicos entre 63,546 e 200,590 e densidade superior a $4,0 \text{ g/cm}^3$. São altamente reativos e bioacumuláveis, ou seja, os organismos não são capazes de eliminá-los. Metalóide é uma designação dos elementos químicos que apresentam algumas, mas não todas, as propriedades físicas de um metal, como o arsênio (Alloway, 1993; Corrêa, 2006).

O arsênio é um poluente que ocorre naturalmente no ambiente, mas a sua disponibilidade é aumentada em virtude de várias atividades antrópicas, tendo a mineração alta relevância nesse cenário (Rai et al., 2011). No Brasil, o Quadrilátero Ferrífero, situado no estado de Minas Gerais, constitui uma das fontes naturais de contaminação por As. Isto se deve ao intenso extrativismo de ouro e outros metais, desde o final do século XVII e que perpetua até os dias atuais. As origens do As nos sedimentos e nas águas superficiais na região se devem à oxidação natural das rochas e à atividade antrópica, que se deu por meio do lançamento dos rejeitos da mineração nas drenagens. Segundo estimativas de Borba et al. (2000), a atividade antrópica provocou o lançamento nos rios do Quadrilátero Ferrífero de pelo menos 390.000 t de As ao longo de 300 anos de mineração.

O As é fitotóxico provocando, de forma geral, sintomas como: redução no crescimento da raiz e no acúmulo da biomassa, necrose foliar, degradação da clorofila com conseqüente diminuição da taxa fotossintética (Panda et al., 2010; Rai et al., 2011). Dentre os efeitos do As na estrutura das diferentes células dos vegetais, pode-se citar: hipertrofia das células epidérmicas, alteração no formato dos tricomas, obliteração de elementos de vaso do xilema secundário, colapso celular no ápice radicular com retração do protoplasto, desorganização do mesofilo, colapso das células epidérmicas, além do acúmulo de compostos fenólicos no feixe vascular (Campos, 2011; Rai et al., 2011; Silva, 2008).

Diversos autores investigaram essas alterações em diferentes espécies vegetais, tanto de forma macroscópica quanto microscópica, sendo que as mesmas podem ser utilizadas como parâmetros em estudos com poluição (Campos et al., 2010; Sant'Anna-Santos et al., 2005; Silva et al.; 2005; Silva et al., 2000).

A família Brassicaceae é uma das maiores famílias das Angiospermas. Seu centro de origem e diversificação é a região mediterrânea e sul da Europa (Gisbert et al., 2006) e é constituída por cerca de 380 gêneros e 3.700 espécies. Diversas espécies desta família são utilizadas na alimentação humana. O cultivo das espécies em solo contaminado com arsênio pode levar à absorção e a acumulação deste nas partes comestíveis, fazendo com que ele se insira na cadeia alimentar, apresentando um potencial risco à saúde humana e informações sobre os danos morfológicos nestas espécies podem contribuir para a melhor compreensão dos efeitos provocados por este poluente nestes vegetais.

Desta forma, objetivou-se verificar o efeito do arsênio no crescimento e no desenvolvimento de plântulas de couve, rabanete, brócolis, mostarda e repolho, avaliando o acúmulo de biomassa, a concentração do mesmo nos órgãos e as alterações morfológicas induzidas, tanto na parte aérea quanto na raiz; além das análises morfométricas dos folíolos e raízes de couve e mostarda. Este trabalho também objetivou encontrar características que possam contribuir para a recomendação de alguma espécie para ser utilizada como bioindicadora de ambientes contaminados por este metalóide.

2. Referencial Teórico

Desde o início da civilização, a poluição tem sido parte da história humana. No entanto, a revolução industrial rapidamente intensificou este processo (Khan et al., 2009; Yadav, 2010). Dentre os diversos poluentes, o arsênio tem causado grande preocupação.

O arsênio é um metalóide de número atômico 33, sólido, cristalino e de cor acinzentada e que ocorre naturalmente no ambiente, sendo o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre (Lage et al., 2006; Rezanika & Sigler, 2008;

Sharma & Sohn, 2009). Existe, tanto na forma orgânica quanto inorgânica, mas não em seu estado elementar (Ali et al., 2009; Hossain, 2006). Apresenta-se em quatro estados de oxidação: As (V), As (III), As (0) e As (-III). As formas inorgânicas arsenato, As (V) e arsenito, As (III) são as principais disponíveis no solo e nas águas (Mathews et al., 2010; Panda et al., 2010).

Cerca de 200 minerais possuem As em sua constituição. Frequentemente, ele está associado a enxofre em minerais como Arsenopirita (FeAsS) (Daus et al., 2005; Matschullat et al., 2000; Zhao et al., 2010). A arsenopirita é um dos principais minerais associados ao ouro, fazendo da mineração aurífera a principal atividade antrópica de liberação deste poluente no ambiente. A atividade agrícola, a emissão veicular e o descarte de resíduos industriais também contribuem para dispersão do poluente, contaminando áreas onde não há ocorrência natural ou intensificando sua presença onde ele ocorre naturalmente (Ali et al., 2009; Dho et al., 2010; Guala et al., 2010; Zhao et al., 2010).

No Brasil, o Quadrilátero Ferrífero, situado no estado de Minas Gerais, constitui uma das fontes naturais de contaminação por As. Isto se deve ao intenso extrativismo de ouro e outros metais, desde o final do século XVII e que perpetua até os dias atuais. As origens do As nos sedimentos e nas águas superficiais na região se devem à oxidação natural das rochas e à atividade antrópica, que se deu por meio do lançamento dos rejeitos da mineração nas drenagens. Segundo estimativas de Borba et al. (2000), a atividade antrópica provocou o lançamento nos rios do Quadrilátero Ferrífero de, pelo menos 390.000 t de As ao longo de 300 anos de mineração.

A disponibilidade e o potencial tóxico deste metalóide no meio são influenciados por vários fatores que irão interferir na migração deste como: o potencial redox, o pH, o teor de matéria orgânica, a presença de outros elementos como o ferro e o fósforo (Clemente et al., 2008; Guala et al., 2010; Huang et al., 2006; Pfeifer et al., 2007).

A poluição por As tem recebido muita atenção nos últimos anos em virtude dos seus efeitos na saúde (Liu et al., 2010). A exposição crônica está associada

ao aparecimento de numerosas doenças incluindo hiperqueratose, hipertensão, alterações neurológicas, disfunção renal, aumento na incidência da perda auditiva, retardo mental e desordens no sistema cardiovascular (Caldwell et al., 2009; Hossain et al., 2006; Kile et al., 2007; Sharma & Sohn, 2009; States et al., 2009; Vahter, 2009; Zhang et al., 2003).

A Organização Mundial de Saúde classifica o As como um elemento carcinogênico do grupo A, conhecido por causar câncer de pele, pulmão, bexiga, podendo levar a morte (Hossain et al., 2006; Kile et al., 2007; Vahter, 2009; WHO, 2004). Há evidências que o elemento pode interromper a expressão de diversos genes, particularmente os envolvidos nas vias de transdução de sinal, interferir na divisão celular, provocar disfunções imunológicas e inibir os mecanismos de reparo do DNA (Andrew et al., 2006; Avani & Rao, 2007). Durante a embriogênese, provoca o atraso na maturação das células de Purkinje, além de migração celular desordenada (Vahter, 2009).

Na Hungria, um alto número de abortos espontâneos e natimortos foram relatados em cidades com altas concentrações de arsênio na água (Borzsonyi et al., 1992). No norte do Chile, o índice de aborto espontâneo e a taxa de mortalidade neonatal aumentaram durante o mesmo período em que a concentração de arsênio na água subiu de 90 para 800 $\mu\text{g/l}$ (Hopenhayn-Rich et al., 2000).

A principal via de contaminação humana por arsênio é através da água que é um problema ocorrente em diversas regiões do mundo (Liu et al., 2010; Pokhrel & Viraraghavan, 2009; Wang et al., 2007). A Organização Mundial de Saúde, define como limite de segurança um valor máximo de 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ de arsênio na água, mas em vários lugares os valores ultrapassam o recomendado, fazendo com que mais de cem milhões de pessoas no mundo estejam expostas aos riscos provocados por este agente (Vahter, 2009). Neste cenário, inclui-se Argentina, Austrália, Bangladesh, China, Estados Unidos, Índia e Itália (WHO, 2004).

Os solos e águas contaminados com arsênio podem ser remediados através de técnicas físico-químicas e biológicas. Os tratamentos físico-químicos

tradicionais como: escavação e lavagem alteram as propriedades do solo algumas vezes de forma irreversível, destruindo a biodiversidade e são dispendiosas.

Dentre as técnicas de remediação biológica, a utilização de plantas constitui uma alternativa viável. Consiste no uso de plantas que, naturalmente ou através da manipulação genética, têm habilidade de remover, transferir, estabilizar e/ou degradarem os contaminantes de substratos sólidos, líquidos ou gasosos (Khan, 2009; Padmavathiamma e Li, 2007; Pilon-Smits, 2005; Singh, 2007). As vantagens consistem no fato do tratamento do local contaminado ocorrer *in situ*, apresentando baixo custo, um menor impacto ambiental, além de diminuir a exposição de humanos e outras formas de vida ao poluente (Khan et al., 2009; Pilon-Smits, 2005; Singh, 2007).

Os resultados da fitorremediação são mais lentos que os métodos físico-químicos existentes (Pilon-Smits, 2005), por isso é ideal que as espécies utilizadas nessa técnica apresentem características como o rápido crescimento, um ciclo de vida curto e grande acúmulo de biomassa, fatores estes que podem maximizar o processo.

Segundo Padmavathiamma e Li, (2007); a fitorremediação pode ser classificada em cinco categorias: fitoestabilização (uso de plantas para estabilizar o poluente no solo, seja por diminuir a erosão deste ou por converter o contaminante em suas formas menos disponíveis, mantendo-o associado a outros elementos presentes junto do sistema radicular do vegetal). A fitoextração (extração do poluente do substrato, acumulando-o nos tecidos vegetais). A fitoestimulação (degradação de poluentes orgânicos por organismos simbióticos do sistema radicular do vegetal). A fitodegradação (degradação dos poluentes orgânicos através de atividade enzimática da planta) e, por fim, a fitovolatilização (consiste na extração do poluente do substrato e a posterior liberação deste na atmosfera pela volatilização).

Algumas espécies vegetais possuem habilidade de desenvolverem-se em locais contaminados sem que os efeitos tóxicos do As sejam visíveis, conseguindo acumular consideráveis concentrações do elemento em sua constituição. Essas plantas são classificadas como hiperacumuladoras, como ocorre principalmente com as monilófitas (Guala et al., 2010). Por definição, uma espécie é considerada

hiperacumuladora, quando é capaz de acumular um ou mais elemento inorgânico cerca de cem vezes mais que outras espécies que se desenvolvem nas mesmas condições. Isto significa que cerca de 1% da massa seca do vegetal é constituída pelo poluente (Pilon-Smits, 2005).

Pteris vittata L. é uma monilófita hiperacumuladora de arsênio. Ela tem capacidade de armazenar e metabolizar o metalóide, tolerando seus efeitos negativos. Estudos indicam que a espécie retira o arsenito (As III) e o arsenato (As V) do solo pela raiz, os translocam até a parte aérea. Neste órgão o As (V) é reduzido em As (III) e transportado para o vacúolo, onde é armazenado (Daus et al., 2005; Feng et al., 2010; Mathews et al., 2010).

Em solos com elevado nível de As, a forma arsenato é a que se encontra mais disponível (Smith et al., 2008). O arsenato comporta-se quimicamente de forma análoga ao fósforo, fazendo com que ele seja incorporado pelas plantas através de transportadores deste elemento. Uma vez dentro do citosol, ele substitui o fosfato em diversas moléculas, como o ATP, formando um complexo instável ADP-As que altera o metabolismo celular (Panda et al., 2010).

Quando a disponibilidade de fósforo no meio aumenta, as plantas tornam-se mais resistentes ao arsenato (Panda et al., 2010). Isso porque o fosfato é mais eficientemente absorvido quando comparado ao arsenato. Levando em consideração que os transportadores são os mesmos para ambos os elementos, conseqüentemente, a concentração de arsenato dentro da célula tende a diminuir (Pigna et al., 2009).

A primeira resposta das plantas à exposição ao arsênio é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais em excesso, causam estresse oxidativo, provocando oxidação e modificação dos aminoácidos, nas proteínas, nas membranas e no DNA, comprometendo a viabilidade das células (Khan et al., 2009; Rai et al., 2011; Yadav, 2010). Diversas adaptações são desenvolvidas pelas plantas que minimizam os danos provocados pelo metalóide, possibilitando a sobrevivência do organismo sob essas condições, como a síntese de antioxidantes, que neutralizam as ROS e de fitoquelatinas, que formam complexos com íons tóxicos do citosol e os transportam para o vacúolo (Yadav, 2010).

As espécies vegetais sensíveis ao As sofrem alterações quando expostos ao metalóide, apresentando sintomas como: redução da taxa fotossintética, em virtude de danos ocorridos nos estômatos e no mesofilo, diminuição do crescimento radicular, surgimento de áreas necróticas, redução da biomassa e senescência foliar (Gisbert et al., 2006; Panda et al., 2010; Pigna et al., 2009).

Em *Borreria verticillata* cultivadas em hidroponia, a exposição ao arsênio, provocou necrose no ápice radicular e inibição do crescimento de raízes laterais. Morfologicamente, observou-se obliteração de elementos de vaso do xilema secundário e colapso celular no ápice radicular (Campos, 2011). Nas folhas, houve retração do protoplasto, além de desorganização do mesofilo e colapso das células epidérmicas (Silva, 2008). Em *Cajanus cajan*, regiões cloróticas e necróticas foram observadas nas folhas, além de alterações morfológicas nas raízes como formato atípico das células do felogênio, formato assimétrico do câmbio e obliteração de elementos de vaso (Barbosa, 2009).

Em milho, a fixação de carbono em plantas tratadas com As diminuiu em 20% e a atividade do fotossistema II também reduziu significativamente (Stoeva et al., 2005). Stoeva et al., (2003/4) observaram a redução na taxa fotossintética e diminuição no nível de transpiração em aveia, provavelmente por causa das alterações na absorção e no transporte de água causados por alterações no sistema radicular.

Khan e colaboradores (2009), avaliando os efeitos da exposição de *Brassica juncea* ao arsênio, verificaram que essa espécie, como mecanismo de defesa, aumentou a produção de enzimas antioxidativas, o que garantiu a tolerância desta em solo contaminado com o poluente.

Brassicaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas. Originária da região mediterrânea e sul da Europa (Gisbert et al., 2006). Com cerca de 380 gêneros e 3.700 espécies, apresenta máxima diversidade nessa área, tendo a maioria dos membros concentrados em regiões temperadas (Marzouk et al., 2010). Várias espécies são utilizadas na alimentação humana e, também, algumas espécies são utilizadas na fitoextração de metais pesados em substratos contaminados (Gisbert et al., 2006; Lim et al., 2004; Quartacci et al., 2006). No que diz respeito ao arsênio, há estudos que indicam que as *Brassicaceas*

apresentam potencial para acumular e metabolizá-lo, em particular *B. juncea* e *B. carinata* (Karimi et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Plântulas de cinco espécies: *Brassica oleraceae* L. (couve); *Raphanus sativus* (rabanete); *Brassica oleraceae* var. capitata (repolho); *Brassica oleraceae* var. itálica (brócolis) e *Brassica juncea* (L.) Czern. (mostarda) foram utilizadas no presente estudo. As sementes foram desinfetadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 5%, durante 1 minuto e posteriormente lavadas em água destilada. Três sementes foram postas para germinar em tubos de ensaio, contendo 28 ml de meio de cultura sólido, contendo 10ml/l de solução de macronutrientes, 1ml/l de solução de micronutrientes e 1ml/l de cloreto férrico, sendo que a composição da solução estoque está descrita na Tabela 1. O pH do meio foi ajustado para 7,0. As plântulas foram cultivadas por doze dias em ambiente apropriado com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, luminosidade de $230 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^2$ e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, sendo: controle, 250 μMol , 350 μMol e 450 μMol de As na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e seis repetições. O experimento foi conduzido no Laboratório de Biofísica do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (figura 1).

3.2. Avaliação visual e de crescimento das plântulas

Para avaliar as possíveis alterações visuais, tanto a parte aérea como as raízes das plântulas foram observadas diariamente. Após o período experimental, as plântulas foram retiradas do meio de cultura, as raízes foram lavadas com água destilada e procedeu-se a última análise visual, quando então as mesmas foram fotografadas (máquina fotográfica digital modelo Cyber-Shot DSC-W310, Sony Corporation, Japão) A parte aérea e raiz principal de cada plântula foram medidas, sendo que a parte aérea foi definida como sendo do início do caule até a inserção dos folíolos.

3.3. Concentração de As na matéria seca

Para a quantificação do teor de arsênio na matéria seca, raízes e parte aérea das plântulas foram previamente separadas e secas em estufa com ventilação forçada a 65⁰C até peso constante. Posteriormente, as amostras foram adicionadas em erlemeyers contendo 3 ml de solução nitroperclórica 2:1 e mantidas em pré-digestão à temperatura ambiente, por um período de 24 horas (Tedesco et al., 1995). Em seguida, foram transferidas para placa digestora com temperatura controlada, 30 minutos a 50⁰C, a seguir por 30 minutos a 100⁰C e, finalmente, a 150⁰C até a completa digestão da matéria orgânica. Amostras contendo apenas a solução nitroperclórica foram utilizadas como controle no processo de digestão. Após o resfriamento, o conteúdo foi diluído para 25 ml com água deionizada e a solução final foi utilizada para estimar a concentração de As por espectrofotometria de absorção atômica (modelo Spectr AA220, Varian Medical Systems, Inc., USA). O conteúdo de arsênio foi expresso em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco.

3.4. Análise morfológica

Amostras da região mediana e da margem dos folíolos cotiledonares e amostras das raízes principais das plântulas dos diferentes tratamentos foram coletados e processadas para análise morfológica. Os materiais biológicos foram fixados em solução contendo 4% paraformaldeído 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato, pH 7,0 (Karnovsky 1965, modificado). Após 24 horas, as amostras foram lavadas em solução tampão, água destilada e a seguir desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments Heidelberg, Alemanha). Os blocos foram submetidos a microtomia (Micrótomo Modelo RM2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e foram obtidos cortes transversais com 5 μm de espessura. As lâminas com os cortes foram colocadas em placa aquecedora a 40⁰C por cerca de uma hora e a seguir foram corados com azul de toluidina a 0.05%, pH 4,7 (O'Brien e McCully, 1981). Após secagem ao ar, as lâminas foram montadas em Eukitt (Eukitt Mounting Medium, Sigma-Aldrich Corporation, USA) e fotografadas em microscópio de luz (modelo AX70RF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado com sistema fotográfico U-Photo,

câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments inc. New York, USA), do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

As análises micromorfométricas foram realizadas em duas das cinco espécies estudadas, sendo estas couve e mostarda. Os cortes foram analisados em microscópio de luz e fotografados em microscópio de luz (modelo AX70RF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), equipado com sistema fotográfico U-Photo, câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments inc. New York, USA) do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Os seguintes parâmetros foram considerados para esta análise: espessura do limbo, do mesofilo e a altura das células epidérmicas das faces abaxial e adaxial dos folíolos. Na raiz foram considerados os seguintes parâmetros: o volume ocupado pelo cilindro vascular, o volume do córtex e da epiderme e o volume final do órgão. Para cada parâmetro avaliado de cada tratamento, foram obtidas 108 medições.

3.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com base no delineamento inteiramente casualizado, considerando o esquema fatorial 5X4, ou seja, cinco espécies e quatro tratamentos, sendo cada tratamento repetido seis vezes. A parcela experimental foi representada por um tubo de ensaio contendo três indivíduos.

Para as análises morfométricas foi utilizado o programa de análise de imagens AnatiQuanti (Aguiar et al., 2007)

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (Euclides, 1983), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia visual e análise do crescimento

Pela análise visual, verifica-se que houve comprometimento no crescimento das plântulas das diferentes espécies estudadas, com redução do comprimento, principalmente da raiz (Tabela 2, figura 2). Na parte aérea, não foi possível

identificar alterações visuais no comprimento das mesmas (Tabela 2). Não foi observada áreas necrosadas ou de manchas nos folíolos que pudessem indicar um dano direto da presença do arsênio, bem como para as raízes. As raízes encontravam-se brancas, com textura rígida e os folíolos totalmente expandidos e com coloração normal. Nos folíolos e caule de couve, rabanete e repolho foi possível observar acúmulo de antocianinas, evidenciado pela coloração arroxeada típica da presença deste pigmento.

As plântulas de couve, rabanete, brócolis, repolho comportaram-se de forma muito semelhante, ou seja, todas tiveram o crescimento das raízes comprometido proporcionalmente às concentrações de As utilizadas (Figura 2).

4.2. Teor de arsênio nos órgãos

A concentração de As nas raízes e na parte aérea das plântulas aumentou com o incremento do nível de arsênio no meio de cultura (Figuras 6 e 7). Das cinco espécies estudadas, couve, brócolis e mostarda, houve um maior acúmulo de arsênio nas raízes do que as espécies repolho e rabanete, criando com isto dois grupos distintos. Com relação à concentração de As na parte aérea, os resultados são bem distintos dos verificados para as raízes, sendo que as que apresentaram maiores teores do metalóide foram couve e repolho, demonstrando que houve uma maior translocação nestas duas espécies.

Brassica oleraceae L. (couve) foi a espécie que mais acumulou arsênio nas raízes e a que mais translocou para a parte aérea em relação as demais espécies estudadas. Também apresentou comprometimento no crescimento das raízes a medida que aumentou a concentração do poluente (Figuras 6 e 7).

4.3. Alterações morfológicas

As espécies avaliadas neste experimento apresentam características morfológicas bastante similares. Os folíolos possuem epiderme unisseriada e com estômatos presentes em ambas as faces sendo, portanto, anfiestomáticos. O mesofilo é homogêneo, com oito a dez camadas de células justapostas. Em algumas espécies, houve o desenvolvimento de meatos. As raízes apresentam

anatomia típica de eudicotiledôneas com epiderme, córtex e cilindro vascular bem delimitado, sendo que a endoderme e o periciclo são bem visíveis.

Das cinco espécies avaliadas, *Brassica juncea* (mostarda) foi a única que apresentou alterações morfológicas nos folíolos. As células epidérmicas sofreram hipertrofia (Figuras 3C 3D e 3E), ou ficaram colapsadas (Figura 3B). O mesofilo também apresentou células colapsadas (Figura 3D). Houve uma redução da espessura do limbo (Figura 3B).

O sistema radicular de todas as espécies apresentou alterações após o período de tratamento. Em rabanete, as células da epiderme apresentaram-se colapsadas em algumas regiões (Figura 4J) e em outras, ocorreram achatamentos que formaram invaginações no tecido (Figura 5F). Além disso, no córtex, houve retração do protoplasto e plasmólise das células, ficando, em algumas regiões, diversas camadas inteiramente colapsadas (Figura 4J).

Na raiz de mostarda e repolho a epiderme sofreu alterações devido a presença do metalóide. Em repolho, houve hipertrofia (Figura 5D) e em mostarda, foi possível observar retração do protoplasto (Figura 5E)

Embora não tenha sido notada plasmólise ou hipertrofia celular, como nas espécies anteriores, nas plântulas de brócolis, as células do córtex apresentaram-se com morfologia alterada na presença do arsênio, o que favoreceu o aparecimento de meatos, além de retração do protoplasto (Figuras 4H e 4I).

Na endoderme de couve e repolho houve plasmólise (Figuras 4F e 4G). Em brócolis, as células da endoderme apresentaram-se fortemente coradas pelo azul de toluidina e com uma conformação diferente do controle (Figura 4I).

No cilindro vascular de couve, rabanete, repolho e brócolis foi possível observar alterações na morfologia do floema. Em algumas regiões, as células encontraram-se totalmente colapsadas (Figuras 4F, 4J, 4G e 4I).

As análises micromorfológicas realizadas nos órgãos das plântulas de couve indicaram que na raiz a maior concentração de arsênio, promoveu o aumento do volume do córtex. Nos folíolos, as duas faces da epiderme reduziram seus volumes, o mesofilo aumentou de tamanho, o que favoreceu o aumento da espessura final do limbo (Tabelas 3 e tabela 4).

Na raiz de mostarda, a epiderme apresentou-se mais espessa na maior dose de arsênio utilizada, enquanto o córtex e cilindro vascular retraíram, favorecendo a diminuição do volume final do órgão (Tabela 5). Nos folíolos, o mesofilo diminuiu de tamanho o que contribuiu para redução da espessura do limbo foliar (Tabela 6).

5. DISCUSSÃO

Para o estabelecimento das diferentes concentrações de arsênio, bem como o tempo de condução do experimento utilizados no presente trabalho, foram tomados por base os conhecimentos acumulados na literatura, de resultados obtidos em experimentos anteriores por Dornelas, 2002 e dados obtidos com experimentos preliminares. A escolha destas espécies se justifica pela fácil obtenção de sementes, rápido crescimento e principalmente, pelo fato de serem plantas amplamente utilizadas na alimentação humana, além de serem escassos os dados sobre alterações morfológicas nas mesmas.

As cinco espécies por pertencerem à mesma família e estarem em estágio inicial de desenvolvimento, apresentam uma morfologia muito semelhante. As alterações decorrentes dos tratamentos também são similares entre elas.

A sensibilidade de vegetais a metais pesados e metalóides está relacionada não só a concentração utilizada e ao tempo de exposição, mas também ao estágio de desenvolvimento, de forma que organismos em fase inicial de desenvolvimento estão mais susceptíveis aos efeitos tóxicos, por não apresentarem seus mecanismos de defesa completamente desenvolvidos (Chaves et al., 2002; Liu et al., 2005), além de outras variáveis como características do solo e ritmo de crescimento das plantas, conforme apontado por Silva et al., 2000.

Com base nos dados obtidos no presente trabalho é possível afirmar que as espécies estudadas são sensíveis às concentrações crescentes de arsênio, considerando as condições experimentais empregadas.

O crescimento das plântulas foi afetado pela presença do metaloide, sendo que todas as espécies responderam as concentrações crescentes de As, exceto mostarda. As demais, quanto maior a dose de arsênio aplicada, menor foi o crescimento, o que condiz com experimentos anteriores que afirmam que o

poluente atua sobre o crescimento das plântulas, sendo este um dos sintomas de toxicidade (Kile et al., 2007).

Os resultados obtidos revelam que a injúria causada por arsênio não se restringe apenas a sintomas visuais, mas também induzindo alterações estruturais nas células, afetando os tecidos dos diferentes órgãos dos vegetais, reforçando a importância de estudos anatômicos para a compreensão dos mecanismos de toxicidade deste metalóide.

Visualmente, na parte aérea o que se verificou foi redução no crescimento e acúmulo de antocianina em algumas espécies. É possível que um tempo maior de exposição possa resultar em outros danos, além do que foi detectado na estrutura dos tecidos dos diferentes órgãos.

Das cinco espécies estudadas, a couve foi a que mais se destacou dentre elas. Além de uma acumulação elevada nas raízes, também translocou grande quantidade de As para a parte aérea. Este resultado é bastante significativo, não só do ponto de vista científico, mas prático, pois se trata de uma planta amplamente cultivada na grande maioria dos quintais e o consumo de alimentos contaminados insere o As na cadeia alimentar, colocando os organismos expostos aos malefícios que ele oferece.

Como indicadora de ambiente contaminado por arsênio, esta espécie, quando comparada com as demais estudadas, apresenta uma superioridade, pois além dos danos visuais como alterações no crescimento, acumulam quantidade expressiva de antocianina, tanto nos folíolos quanto no caule. Esta última característica poderia ser um indicativo para ser utilizado em bioensaios.

Os danos anatômicos encontrados nos folíolos de mostarda foram causados indiretamente pelo arsênio, isso porque essa espécie, como as demais, translocou concentrações muito baixas do poluente para parte aérea, ficando este retido principalmente nas raízes, o que condiz com a ausência de alterações nos folíolos de couve, rabanete, brócolis e repolho. As alterações no sistema radicular de mostarda provavelmente foram suficientes para alterar a absorção e a translocação de água pelo corpo do vegetal, fazendo com que os folíolos apresentassem, anatomicamente, sintomas de déficit hídrico, como exemplo, a

perda de turgor das células do mesofilo, fazendo com que elas adquirissem um aspecto plasmolizado.

Dados semelhantes são descritos na literatura como Campos (2011), que correlacionou o sintoma de murcha obtido em uma das populações de *Borreria verticillata* analisada frente à exposição ao arsênio como dano indireto, possivelmente causado por déficit hídrico, em virtude dos danos radiculares. Silva (2008) associou este sintoma com a redução da condutância estomática e da taxa fotossintética nessas plantas.

O fosfato é facilmente substituído pelo arsenato em vários processos bioquímicos, comprometendo diversas funções celulares, podendo se associar ao ADP, o qual se torna instável na forma ADP-As (Panda et al., 2010). Em caso de um comprometimento na síntese de ATP, a entrada de água via raiz pode ficar comprometida, visto que a absorção de água pela raiz se dá em virtude de um potencial osmótico negativo, dependente da entrada de diversos íons de forma ativa para as células, ou seja, com gastos elevados de ATP, direta ou indiretamente (Alberts, 2010), o que pode explicar o aspecto plasmolizado das células córtex das plântulas estudadas.

O arsênio acumula-se majoritariamente em folhas mais velhas (Chaves et al., 2002; Kabata-Pendias & Pendias, 2001), seguindo uma ordem preferencial de raiz, folha velha, folha jovem, caule, sementes e frutos (Hartley e Lepp, 2008). Como o ciclo de vida destas plantas foi muito curto, em razão das condições experimentais, pouco se pode inferir quanto ao comportamento referente à acumulação de As em folhas velhas. Estudos futuros com todo o ciclo de vida do vegetal são essenciais para o entendimento do comportamento do metalóide especialmente nas folhas mais velhas visto que elas são utilizadas na alimentação humana.

A retração do protoplasto antecede o colapso celular (Sant'Anna-Santos et al., 2007). A retração do protoplasto não foi observada em repolho, sendo que as células apresentaram-se com formato alterado, com completo colapso no córtex e da endoderme, o que sugere que tempo de exposição ao poluente foi suficiente para induzir alterações de forma mais rápida nesta espécie em relação as demais.

As alterações encontradas na anatomia radicular das cinco espécies podem ser consideradas severas. Provavelmente, se o tempo de exposição fosse maior, com as concentrações utilizadas, os danos seriam ainda mais severos o que poderia ocasionar maiores disfunções para o vegetal.

A sensibilidade ao As pode ainda está relacionada a fatores genéticos, através dos quais cada espécie desenvolveu mecanismos adaptativos (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002; Zhao et al., 2010), fazendo com que cada espécie desse experimento apresentassem alterações semelhantes mas com diferentes intensidades.

As análises morfométricas realizadas nos folíolos e raízes de couve e mostarda, mostrou-se pouco elucidativa. Embora não tenha ocorrido diferença significativa na maioria dos parâmetros analisados, é possível inferir, em relação a couve que o arsênio proporcionou na raiz, um aumento nas células epidérmicas, não significativo, no córtex e no feixe vascular e no folíolo, houve aumento da espessura do limbo, em virtude da altura das células do mesofilo, ao passo que as células de ambas as faces da epiderme reduziram de tamanho.

O aumento do volume final do córtex em couve pode ser explicado pela hipertrofia observado em algumas células, as quais alteraram a conformação do córtex, além de proporcionar o aparecimento de inúmeros meatos.

Nas raízes de mostarda por sua vez, houve aumento, não significativo da epiderme entre as doses intermediárias e controle e significativo entre o controle e a concentração de 450 μMol . No córtex e no feixe vascular, por sua vez o que se observou foi uma redução destes tecidos, apresentando diferença significativa mais uma vez entre o controle e a concentração mais elevada (450 μMol). Nos folíolos desta espécie, na face adaxial da epiderme, houve aumento das células, entretanto, na abaxial houve redução. No caso do mesofilo, o mesmo se tornou mais compacto.

Isto pode não ter relevância do ponto de vista estatístico, porém ao nível celular, possivelmente deve acarretar grandes alterações fisiológicas, dados estes que não foram objetos de estudo no presente trabalho.

Resultados mais conclusivos a cerca da sensibilidade dessas espécies ao arsênio poderão ser obtidos no futuro com ensaios considerando o ciclo de vida

completo destas espécies, além de dados fisiológicos e bioquímicos, levando a uma melhor compreensão dos mecanismos de respostas ao arsênio.

Em termos agrícolas, os resultados são relevantes, já que todas as espécies são cultivadas comercialmente em larga escala ou em pequenas áreas, no caso de agricultura urbana.

Das espécies estudadas, quatro tem a parte aérea comestível e uma a raiz. De posse do conhecimento da presença de arsênio na parte aérea e na raiz das plântulas, o presente trabalho serve de alerta, pois o arsênio tem efeito acumulativo, significando que uma ingestão prolongada, mesmo que em pequenas quantidades, pode resultar em danos importantes nos consumidores destas espécies ao longo da vida.

6. CONCLUSOES

- O arsênio, mesmo em concentrações baixas e num curto período de exposição, induz alterações no crescimento e na morfologia das raízes e da parte aérea das plântulas das cinco espécies.
- Ocorreu uma retenção de As nas raízes das cinco espécies, ocorrendo uma baixa translocação para a parte aérea, porém na couve, as concentrações foram maiores nos dois órgãos quando comparada com as demais.
- A raiz foi o órgão mais afetado pelas concentrações crescentes de As em todas as espécies, sendo que quanto maior a presença do poluente, maior o dano, tanto no crescimento quanto na morfologia.
- Não foi detectada uma alteração anatômica específica que pudesse ser empregada como um marcador para estudos com este poluente em ambientes contaminados.
- Os dados obtidos com as análises micromorfométricas não foram suficientes para uma conclusão mais específica sobre as duas espécies nestas condições experimentais.

- A couve, potencialmente, apresenta características que podem contribuir para a indicação desta espécie para o uso em indicação de ambientes contaminados por As, considerando o crescimento, o acúmulo de antocianina e o acúmulo deste metalóide na parte aérea.
- Estudos futuros são necessários com a contribuição da fisiologia e da bioquímica para uma melhor compreensão do comportamento destas plantas submetidas ao estresse provocado pelo As.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, T.V., Sant'anna-Santos, B.F., Azevedo, A.A., Ferreira, R.S. 2007. Anati Quanti software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**. 25, 649-659.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2010. Molecular Biology of the cell. 5 ed. Artmed.1396p.

Alloway, B.J., 1993. **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley, 339p.

Barbosa, A.P., 2009. **Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae)**. Dissertação de Mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 50p.

Borba, R.P., Figueiredo, B.R., Rawllins, B.G., Matchullat, J., 2000. Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais state, Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**. 30, 554-557.

Campos, N. V., 2011. **Respostas morfofisiológicas em plantas de *Borreria verticillata* (Rubiaceae) expostas a diferentes doses de arsênio e fósforo**. Dissertação de mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 48p.

Chaves, A. L. F., Silva, E. A. M., Azevedo, A. A., Cano, M. A. O., Matsuoka, K. 2002. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* kunth. (capim-rhodes)–Poaceae. **Acta Botânica Brasilica**. 16, 395-406.

Corrêa, T.L., 2006. **Bioacumulação de metais pesados em plantas nativas a partir de suas disponibilidades em rochas e sedimentos: o efeito na cadeia trófica**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Minas. 140p.

Dornelas, F.L., 2002. **Avaliação do potencial de três espécies da família Brassicaceae como bioindicadoras de ambientes poluídos por arsênio.** Monografia. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 36p.

Euclides, R. F., 1983. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas das UFV (SAEG) – Manual.** CPD/UFV, Divisão de Pesquisas e Desenvolvimento. Viçosa, Minas Gerais. 74p.

Gisbert, C., Clemente, R., Navarro-Avinó, J., Baixauli, C., Ginér, A., Serrano, R., Walker, D.J., Bernal, M.P., 2006. Tolerance and accumulation of heavy metals by Brassicaceae species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. **Environmental and Experimental Botany**.56, 19–27.

Hartley, W., Lepp, N.W., 2008. Remediation of arsenic contaminated soils by iron-oxide application, evaluated in terms of plant productivity, arsenic and phytotoxic metal uptake. **Science of the Total Environment**. 390, 35-44.

Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux cultivés in vitro. **Ann. Sci. Nat.** Paris, 14, 1-223.

Kabata-Pendias, A. & Pendias, H., 2001. **Trace elements in soils and plants.** CRC Press, Boca Raton, USA. 3^a ed.

Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. 27, 137-138.

Kile, M.L., Houseman, E.A., Breton, C.V., Smith, T., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., Mahiuddin, G., Christiani, D.C., 2007. Dietary arsenic exposure in Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**.115, 889-893.

Liu, X., Zhang, S., Shan, X., Zhu, Y.G., 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination seedling growth and amyolytic activity of wheat. **Chemosphere** 61, 293-301.

Meharg, A. A., Hartley-Whitaker, J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**. 154, 29-43.

O'Brian, P.P., McCully, M.E., 1981. **The study of plants structure principles and select methods.** Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltda. 45p.

Rai, R., Pandey, S., Rai, S.P., 2011. Arsenic-induced changes in morphological, physiological, and biochemical attributes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*, an antimalarial plant. **Ecotoxicology**. 20, 1-14.

Sant'Anna-Santos, B. F., Duque-Brasil, R., Azevedo, A. A., Silveira, A. S., Araujo, J. M., Aguiar, R., 2007. Utilização de parâmetros morfoanatômicos na análise da fitotoxidez do flúor em folhas de *Magnolia ovata* (A. St.-Hil.) Spreng. (Magnoliaceae). **Revista Árvore**. 31, 761-771.

Sant'Anna-Santos, B. F., Silva, L. C., Azevedo, A. A., Araujo, J. M., Alves, E. F., Silva, E. A. M., Aguiar, R., 2005. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and experimental Botany**. 58, 158- 168.

Silva, K.L.F., 2008. **Avaliação de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio**. Tese de doutorado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 97p.

Silva, L. C., Azevedo, A. A., Silva, E. A. M., Oliva, M. A., 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica**. 23, 385-393.

Silva, L. C., Oliva, M. A., Azevedo, A. A., Araujo, J. M., Aguiar, R. M., 2005. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in resting plants: *Eugenia Uniflora* and *Clusia Hilariana*. **Water Air and Soil Pollution**. 168, 129-143.

Tedesco, M.J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H., Volkweiss, S.J., 1995. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre, UFRGS. 174p.

Zhao, F.J., Mcgrath, S.P., Meharg, A.A., 2010. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. **Annual Review of Plant Biology**. 61, 535-559.

Tabela 1. Composição das soluções estoque de macro e micronutrientes utilizadas para a preparação do meio de cultura sólido para o cultivo das plântulas (HELLER, 1953).

Solução estoque de macronutrientes	
Composto	Concentração (g/l)
Cloreto de potássio	75
Nitrato de sódio	60
Sulfato de magnésio	25
Fosfato diácido de sódio	12,5
Cloreto de cálcio	7,5
Solução estoque de micronutrientes	
Composto	Concentração (mg/l)
Sulfato de zinco hepta-hidratado	1.000
Ácido bórico	1.000
Sulfato de manganês II monohidratado	7,6
Cloreto de alumínio	30
Cloreto de níquel II hexahidratado	30
Iodeto de potássio	10
Cloreto de ferro heptahidratado	2.000
Ágar	1.200

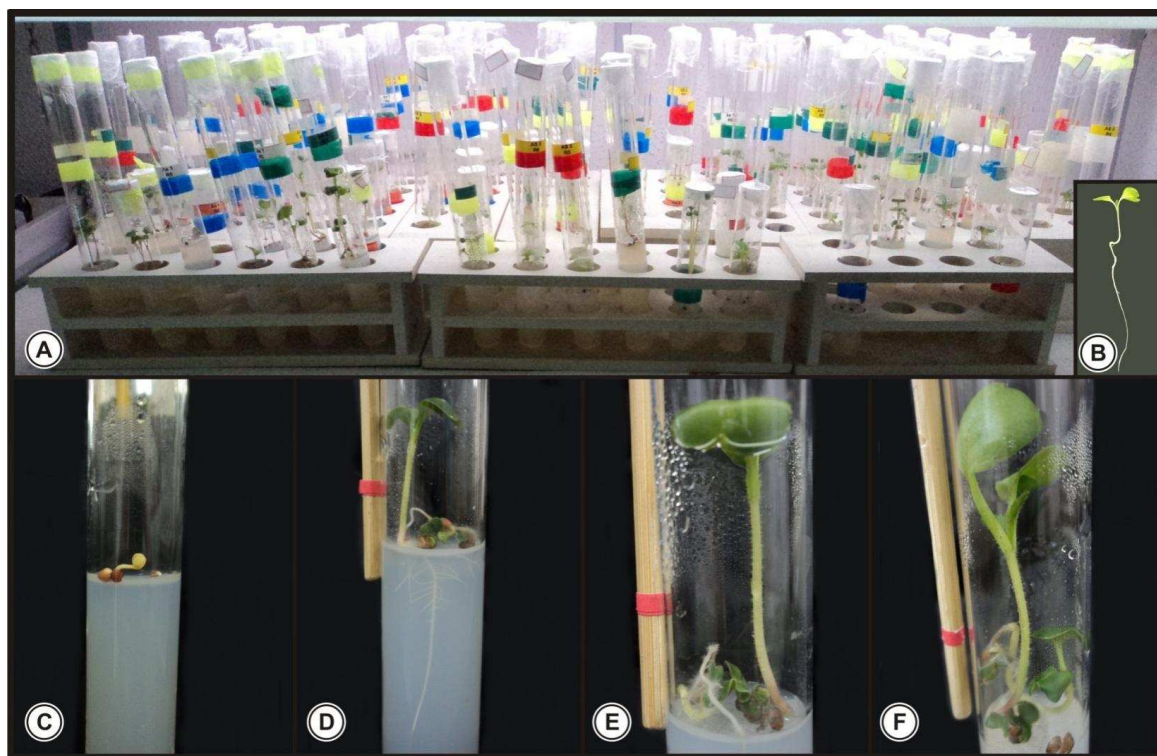


Figura 1. Aspecto geral do experimento. **A:** Visão dos tubos de ensaio na sala de crescimento. **B:** Detalhe de uma plântula de *Raphanus sativus* - rabanete (controle). **C, D, E e F:** parcelas experimentais mostrando as plântulas de *Raphanus sativus* no 1^o, 4^o, 8^o e 12^o dia, respectivamente. Marcação vermelha corresponde a 5 cm.

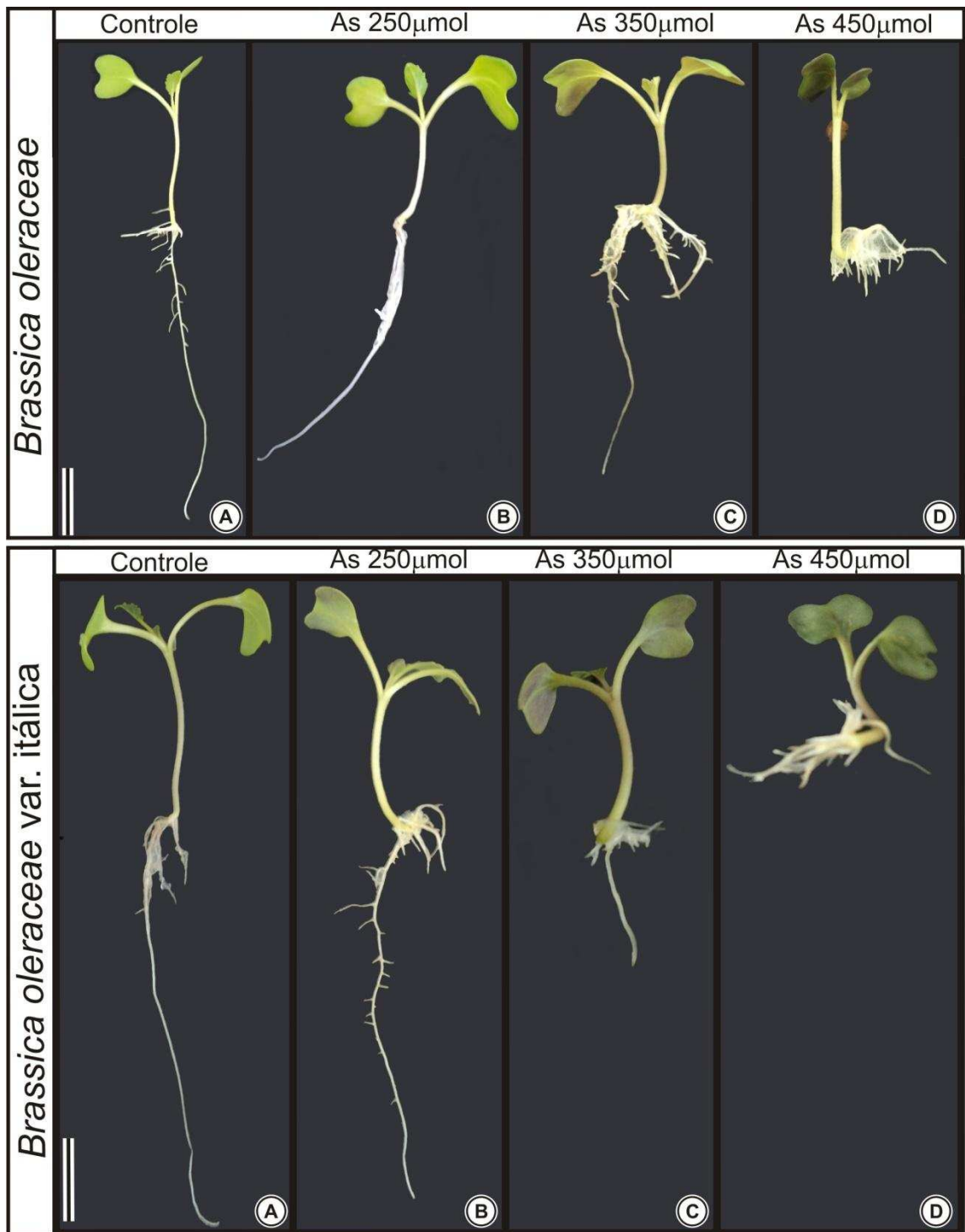


Figura 2. Aspecto das plântulas de *Brassica oleraceae* e *Brassica oleraceae* var. *itálica* no 12^o dia. **A** - Controle; **B** - 250 μ mol; **C** - 350 μ mol e **D** - 450 μ mol de As.

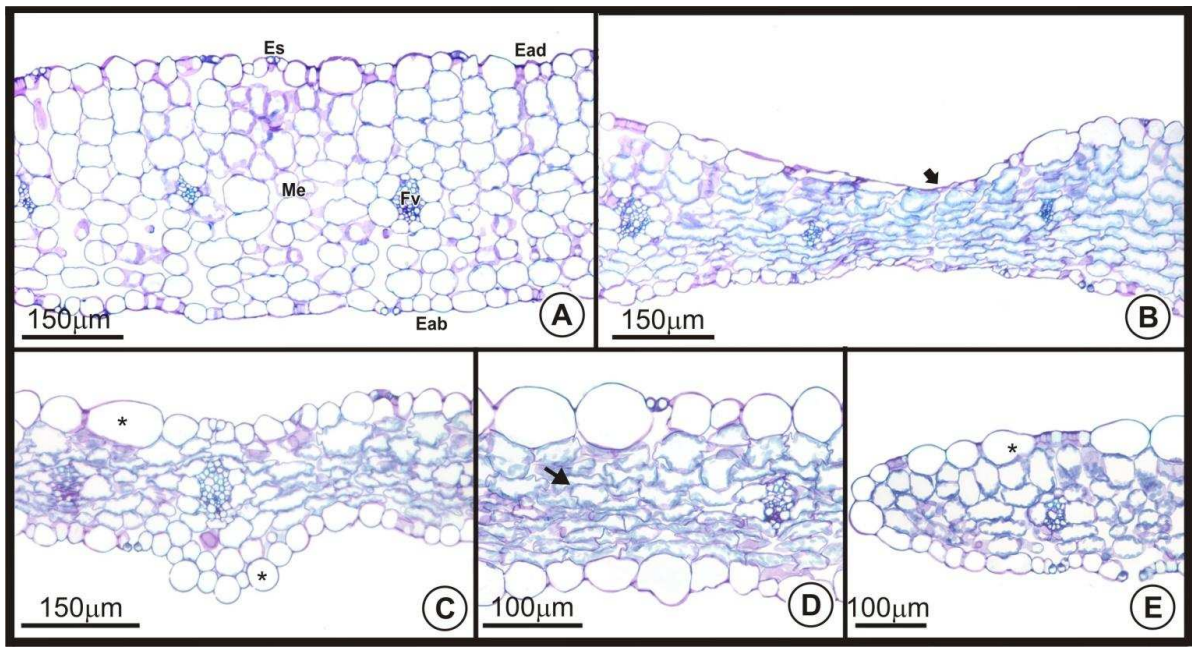


Figura 3. Cortes transversais de folíolos de *B. juncea*. **A:** controle. **B a E:** 450 μM de arsênio. **B:** seta grossa indica redução da espessura do limbo foliar **C:** (*) destacam células da epiderme hipertrofiadas na região da nervura principal. **D:** seta fina indica completa deformação das células do mesófilo. **E:** (*) destaca células da epiderme hipertrofiadas na margem foliar. **Es:** estômato. **Ead:** superfície adaxial da epiderme, **Eab:** superfície abaxial da epiderme, **Me:** mesófilo. **Fv:** feixe vascular.

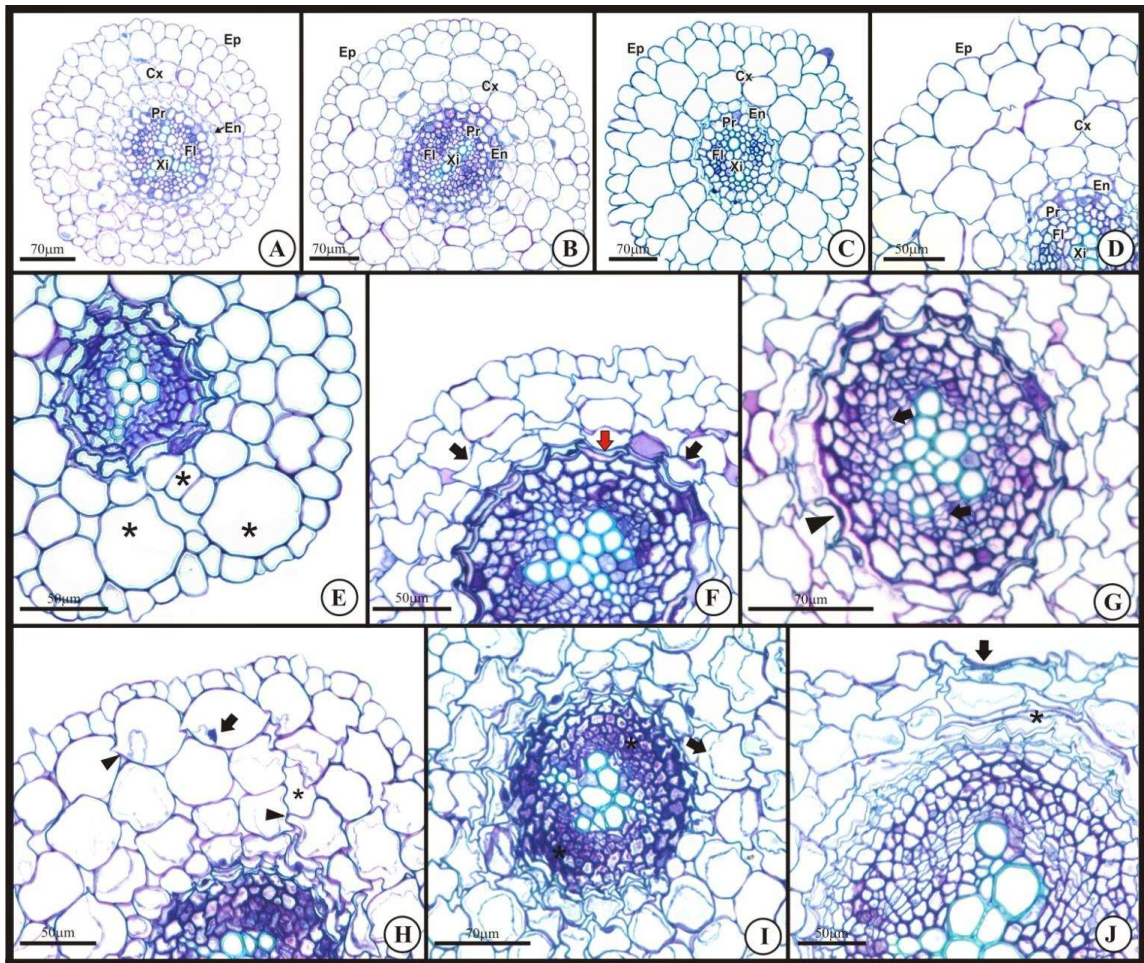


Figura 4. Raiz principal de plântulas de *B. oleraceae* L., *B. oleraceae* var. *capitata*, *B. oleraceae* var. *itálica* e *R. sativus*. **A:** *B. oleraceae* L. controle e **E** e **F** submetidas a 450 μ Mol de arsênio. **B:** *B. oleraceae* var. *capitata* controle e **G** submetida a 450 μ Mol de arsênio. **C:** *B. oleraceae* var. *itálica* controle e **H** e **I** submetida a 450 μ Mol de arsênio. **D:** *R. sativus* controle e **J** submetidas a 350 μ Mol de arsênio. Em **E** (*) indicam hipertrofia das células do córtex, **F** setas pretas destacam alteração no formato das células do córtex e vermelha da endoderme. Em **G** setas pretas indicam alteração no formato do floema e cabeça de seta indica plasmólise da célula da endoderme. **H** cabeça de seta indica alteração no formato das células, (*) meatos e seta preta indica retração do protoplasto. **I** seta preta indica retração do protoplasto e (*) indica células do floema fortemente coradas pelo azul de toluidina. **J** Seta preta indica colapso das células da epiderme e (*) colapso das células do córtex.

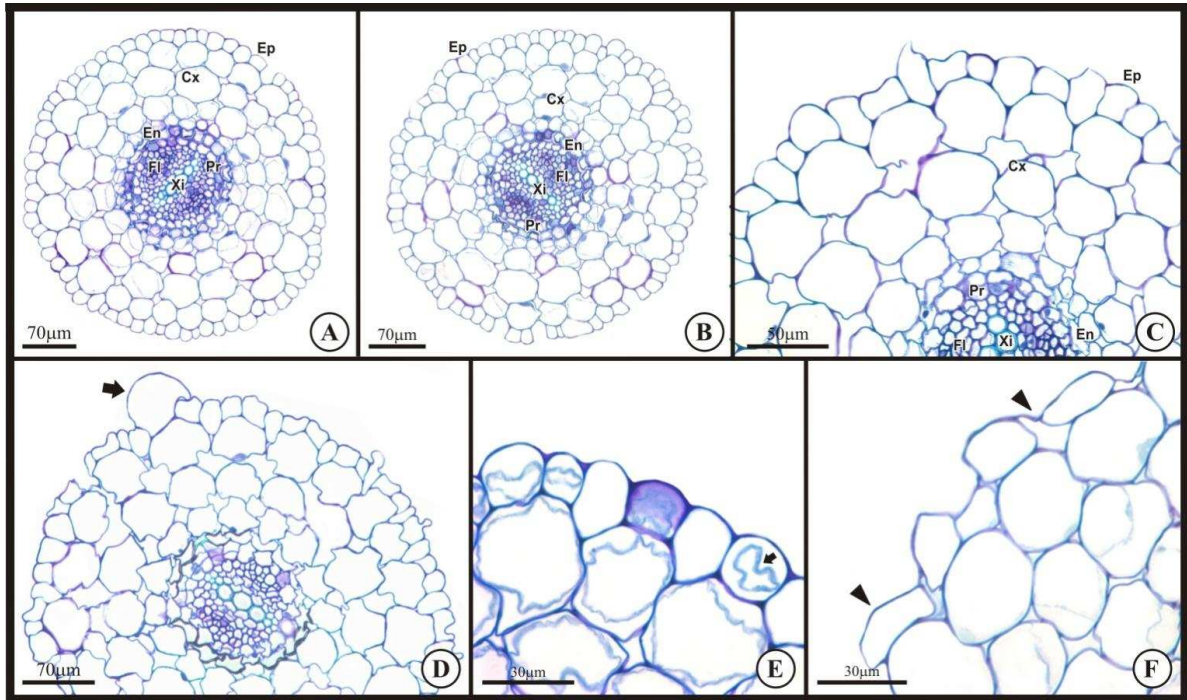


Figura 5. Raiz principal de plântulas de *B. oleraceae* var. *capitata*, *B. juncea*, e *R. sativus*. **A:** *B. oleraceae* var. *capitata* controle e **D** submetida a 450 μ Mol de arsênio. **B:** *B. juncea* controle e **E:** submetida a submetida a 450 μ Mol de arsênio. **C:** *R. sativus* controle e **F** submetida a 450 μ Mol de arsênio. Em **D** seta preta indica hipertrofia da célula epidérmica; em **E** seta preta indica retração do protoplasto e em **F** cabeça de seta indica alteração das células epidérmicas.

Tabela 2. Médias de altura em centímetros das plântulas de *Brassica oleracea*, *Raphanus sativus*, *Brassica oleracea* var. capitata, *Brassica oleracea* var. Itálica e *Brassica juncea*, controle e nas concentrações crescentes de arsênio.

Espécie	Tratamento							
	Raiz				Parte aérea			
	Controle	250	350	450	Controle	250	350	450
<i>B. oleraceae</i>	7.55a	4.65ab	4.63ab	2.98b	3.11a	2.56a	1.74a	1.56a ^{1/}
<i>R. sativus</i>	9.61a	6.91b	5.70b	3.80c	5.61a	4.46a	3.13b	4.55ab
<i>B. oleraceae</i> var. capitata	4.60a	2.97c	4.20b	1.20d	2.47ab	1.90b	2.30ab	2.60a
<i>B. oleraceae</i> var. itálica	6.02a	3.20b	1.61c	3.17b	2.85a	1.79b	1.10b	1.58b
<i>B. juncea</i>	2.97a	2.79a	3.32a	2.98a	2.30a	2.35a	1.97a	1.65a

^{1/}Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem entre si quando comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Figura 7. Teor de As na matéria seca (mg g^{-1}) na parte aérea das plântulas no 12º dia.

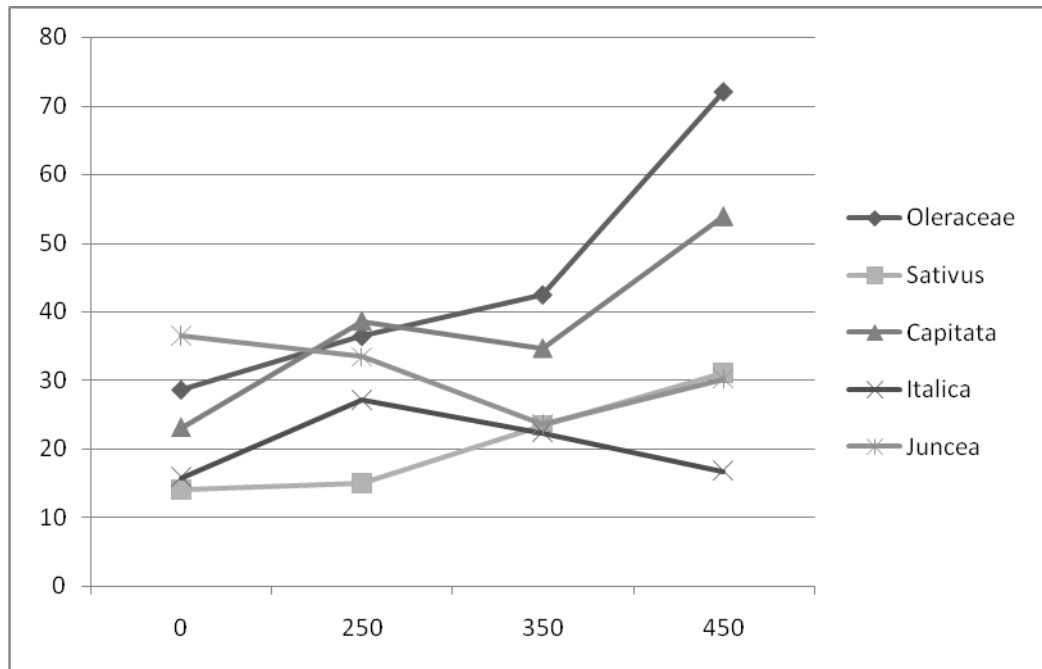


Figura 6. Teor de As na matéria seca (mg g^{-1}) na raiz das plântulas no 12º dia.

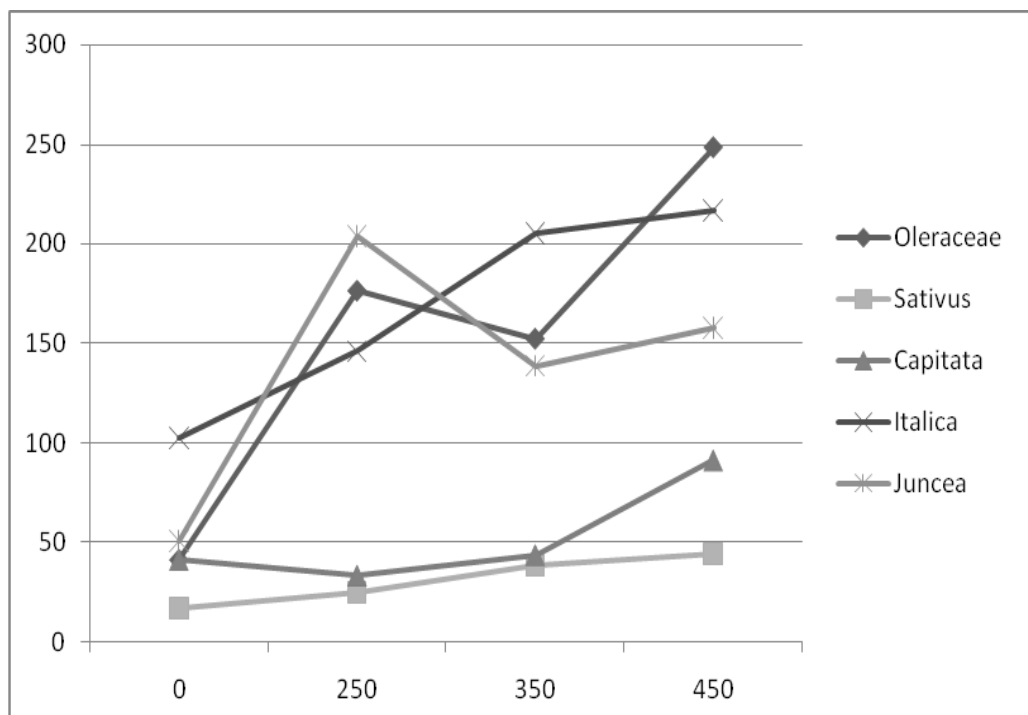


Tabela 3. Parâmetros micromorfométricos, expressos em μm , da raiz de plântulas de *Brassica oleraceae* L.

Raiz	Doses de arsênio em μMol			
	Controle	250	350	450
Epiderme	19.60a	18.38a	19.56a	19.64 ^{a1/}
Córtex	68.66b	60.29c	64.64bc	85.72a
Cilindro vascular	110.69a	98.41b	104.88ab	114.62a
Diâmetro total	269.09a	244.36b	253.80ab	287.61a

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si, quando comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Parâmetros micromorfométricos, expressos em μm , do folíolo de plântulas de *Brassica oleraceae* L.

Folíolo	Doses de arsênio em μMol			
	Controle	250	350	450
Epiderme adaxial	28.56a	22.12b	28.51a	23.66b ^{1/}
Mesofilo	318.27bc	295.25c	362.21a	343.18ab
Epiderme abaxial	36.08a	26.51c	31.53b	27.19c
Espessura do limbo	366.98bc	335.95c	411.97a	387.46ab

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si, quando comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Parâmetros micromorfométricos, expressos em μm , da raiz de plântulas de *Brassica juncea*

Raiz	Doses de arsênio em μMol			
	Controle	250	350	450
Epiderme	23.48b	22.32b	23.14b	26.17a ^{1/}
Córtex	135.00a	102.08c	92.84c	117.15b
Cilindro vascular	93.23a	66.61b	58.34c	69.66b
Diâmetro total	317.14a	271.07b	244.95c	292.66ab

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si, quando comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Parâmetros micromorfométricos, expressos em μm , do folíolo de plântulas de *Brassica juncea*

Folíolo	Doses de arsênio em μMol			
	Controle	250	350	450
Epiderme adaxial	33.95a	34.96a	31.89a	34.88a ^{1/}
Mesofilo	282.01a	251.91bc	266.16ab	228.23c
Epiderme abaxial	58.42a	65.92a	40.77a	42.31a
Espessura do limbo	350.22a	271.07b	327.26ab	293.61c

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si, quando comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.