

KELLEN LAGARES FERREIRA SILVA

**AVALIAÇÕES DE BIOMARCADORES ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS EM
PLANTAS EXPOSTAS AO ARSÊNIO**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

KELLEN LAGARES FERREIRA SILVA

**AVALIAÇÕES DE BIOMARCADORES ANATÔMICOS E FISIOLÓGICOS EM
PLANTAS EXPOSTAS AO ARSÊNIO**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para obtenção do título
de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 02 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. Alan Carlos Costa

Prof^a. Dr^a. Luzimar Campos da Silva
(Co-orientadora)

Prof Dr. Marco Antonio Oliva Cano
(Co-orientador)

Prof. Dr. Wagner Campos Otoni

Prof^a. Dr^a. Aristéa Alves Azevedo
(Orientadora)

**Existem pessoas que fazem parte da vida da gente e sem elas
nada seria significativo....**

**A MEUS PAIS, MEU MARIDO E MEUS FILHOS,
*DEDICO.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder força, saúde e perseverança em todos os momentos da minha vida, permitindo-me chegar até aqui.

A Universidade Federal de Viçosa por ter sediado minhas conquistas profissionais e pessoais e à CAPES pela bolsa concedida.

A minha orientadora Aristéa Alves Azevedo, pelo seu exemplo de profissional, pela amizade e pelo grande apoio dado em todas as situações, profissionais e pessoais.

A professora Luzimar Campos da Silva, por ser muito mais que minha co-orientadora, por ser também minha amiga e por não ter medido esforços em me ajudar.

Ao professor Marco Antonio Oliva Cano pelo aconselhamento e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira pelo aconselhamento e sugestões.

A professora Renata Maria Strozi, por ter cedido seu apartamento, no ano em que residi em Viçosa, durante seu pós-doutoramento.

Ao professor Raimundo Santos Barros pelo auxílio na tradução dos resumos.

A todos os professores da Botânica que contribuíram para minha formação profissional.

Ao Gilmar Valente, pelo auxílio nas coletas de Nova Lima e no envio dos espécimes, para especialistas.

A Dr^a Zefa Valdivina Pereira pela identificação da espécie de *Borreria*.

Ao Eduardinho pelas leituras dos parâmetros fisiológicos.

Ao Dr. Rogério F. Ribas, pelo auxílio durante a condução dos experimentos, leituras e interpretação dos parâmetros fisiológicos.

Ao Dudu, bolsista PIBIC, pelo auxílio durante a execução dos experimentos.

A Alice Godoy pela ajuda e parceria durante os experimentos.

Ao Rogério Gomide pelo auxílio na montagem dos experimentos.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, local de realização das análises de microscopia eletrônica de varredura e a Dr^a Cláudia Alencar Vanetti por seu apoio técnico.

Ao Dr. Leonardo Tuffi Santos e ao Marcelo Reis, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Carlinhos, pelo auxílio das leituras no plasma.

Aos funcionários da botânica por todo apoio concedido.

Aos estagiários: Fernando e Marcela, pelo auxílio na montagem do laminário.

A Jaqueline Dias pela agradável convivência, não só como colega de doutorado, mas como colega de sala dos “substitutos”.

Ao Bruno pela convivência e pelo auxílio na primeira coleta.

A Dona Edite pela ajuda e agradável convivência.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Botânica Adriana, Advânio, Alice Pitta, Ana Cláudia, Bittencourt, Cláudio, Cléber, Cristina, Dayana, Flávia, Juliana Lanna, Marina, Virgínia, pelas constantes trocas de experiências.

Aos meus pais, pelo amor incondicional. Meu pai, Joaquim, por me ensinar a cada dia, que não há vitória sem luta e minha mãe, Eutália, pelo apoio incansável, inclusive com as crianças. Só cheguei até aqui porque tenho vocês ao meu lado.

Ao meus filhos Gabriel e Letícia... Por terem tido paciência (às vezes...). Pelos momentos de ausência peço desculpa. Tudo foi feito pensando em vocês. Amo muito vocês!

Ao meu marido, Luiz Adriano. Por ter sido muitas vezes pai e mãe, nos meus momentos de ausência. Seu companheirismo e o seu apoio foram fundamentais para esta conquista.

As minhas irmãs Michelle e Vanessa, pela amizade, por acreditarem em mim e incentivarem meu trabalho.

A minha sogra Valda, pelo apoio e ajuda com as crianças.

Aos meus cunhados e cunhadas pelo apoio.

Às Meninas da estrada: Andréa, Tati, Nilma, Iara, Gláucia, Michelle e ao Mauro, o único homem, que fez parte deste grupo. Sem vocês nossas viagens não seriam as mesmas.

A Andréa Badaró pela sua amizade e pelo grande incentivo dado durante o decorrer do curso.

A todos que contribuíram para concretização deste trabalho, meu MUITO
OBRIGADA!

BIOGRAFIA

KELLEN LAGARES FERREIRA SILVA, filha de Joaquim Dias Ferreira e Eutália Lagares Ferreira, nasceu em Coronel Fabriciano, Estado de Minas Gerais, em 26 de janeiro de 1974.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - Minas Gerais, em março de 1993 e graduou-se em julho de 1997. Foi bolsista de Aperfeiçoamento no Departamento de Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - Minas Gerais, de agosto de 1997 a fevereiro de 1998.

Em março de 1998, iniciou o Programa de Mestrado em Botânica na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, concluído em fevereiro de 2000. Neste mesmo mês, ingressou no Centro Universitário do Leste de Minas Gerais (UnilesteMG), onde permaneceu como docente até março de 2008.

Em 2006, foi aprovada em concurso para cargo de professor substituto na Universidade Federal de Viçosa tendo seu contrato findado em 2007.

Em fevereiro de 2005 ingressou no programa de doutoramento em Botânica, tendo concluído em dezembro de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
2 - JUSTIFICATIVA	5
3 - OBJETIVOS GERAIS.....	5
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
 CAPÍTULO I.....	8
Influência do arsênio no crescimento e na capacidade de acúmulo deste poluente em plantas	8
1 – INTRODUÇÃO.....	10
2 - MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 - Material vegetal	12
2.2 – Condições de cultivo e parâmetros avaliados.....	13
2.3 – Determinação de acúmulo de arsênio (As) e fósforo (P) nos tecidos	14
2.4 - Análises estatísticas	15
3 - RESULTADOS	16
3.1 - Acúmulo de biomassa	16
3.2 - Acúmulo e distribuição de arsênio e fósforo.....	17
3.3 - Fator de translocação (FT) e fator de bioacumulação (FBA).....	18
4 - DISCUSSÃO.....	19
5 - CONCLUSÕES.....	24
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
 CAPÍTULO II.....	39
Efeitos do arsênio na anatomia de raízes e folhas de <i>Schinus</i> <i>terebinthifolius</i> (Anacardiaceae), <i>Borreria verticillata</i> (Rubiaceae) e <i>Cajanus cajan</i> (Leguminosae).....	39
1 - INTRODUÇÃO.....	42
2 - MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 - Material vegetal e condições de cultivo	43
2.2 – Caracterização anatômica de raízes e folhas.....	44
3 - RESULTADOS	46
3.1 - Caracterização anatômica	46

3.1.1 - <i>Borreria verticillata</i>	46
3.1.2 - <i>Schinus terebinthifolius</i>	47
3.1.3 - <i>Cajanus cajan</i>	49
3.2 - Histoquímica	50
3.2.1 - <i>Borreria verticillata</i>	50
3.2.2 - <i>Schinus terebinthifolius</i>	51
3.2.3 - <i>Cajanus cajan</i>	52
4 - DISCUSSÃO	53
5 - CONCLUSÕES	58
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
 CAPÍTULO III	 78
Avaliação de parâmetros fisiológicos de plantas expostas ao arsênio	78
1 – INTRODUÇÃO	80
2 - MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1 - Material vegetal e condições de cultivo	81
2.2 – Trocas gasosas	81
2.3 – Parâmetros de fluorescência da clorofila a.....	82
3 - RESULTADOS	83
3.1 – Efeito de arsênio sobre a fotossíntese	83
3.2 – Efeito do arsênio sobre a fluorescência da clorofila a.....	84
4 - DISCUSSÃO	85
5 - CONCLUSÕES	88
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CONCLUSÕES GERAIS	96

RESUMO

SILVA, Kellen Lagares Ferreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2008. **Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio.** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo. Co-orientadores: Luzimar Campos da Silva; Marco Antonio Oliva Cano e Juraci Alves de Oliveira

Avaliações anatômicas e fisiológicas de plantas de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) e *Cajanus cajan* (Leguminosae) foram realizadas após exposição ao arsênio. As avaliações anatômicas incluíram: a caracterização em microscopia de luz e eletrônica de varredura; a histolocalização de um possível sítio de acúmulo do arsênio nas raízes e folhas e a análise morfométrica dos tecidos foliares. Os parâmetros fisiológicos avaliados foram as trocas gasosas e emissão de fluorescência da clorofila *a*. A influência do arsênio no crescimento foi analisada e o fator de transferência (FT) e o fator de acumulação (FBA) foram calculados a partir do teor deste elemento acumulado nas folhas, caules e raízes. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas da Universidade Federal de Viçosa. As plantas foram mantidas em solução de Hoagland e o arsênio foi adicionado na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); *S. terebinthifolius* e *B. verticillata* foram submetidas a concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10,0 mg L^{-1} As e *C. cajan* a 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,5 mg L^{-1} As. O tempo de exposição das plantas ao arsênio variou entre as espécies: *S. terebinthifolius*, 47 dias, *C. cajan*, 27 dias e *B. verticillata*, 10 dias. As alterações anatômicas nas folhas das três espécies foram evidentes, mas apenas *B. verticillata* translocou o arsênio para parte aérea da planta, com FT e $\text{FBA} > 1$, mostrando que os danos observados, pelo menos nas outras duas espécies, ocorreram em função de efeitos indiretos do arsênio. A raiz, nas três espécies, sofreu alterações anatômicas pouco expressivas, se compararmos com a quantidade de arsênio presente neste órgão, pois todas apresentaram $\text{FBA} > 1$, talvez pela compartimentalização deste elemento no vacúolo das células. O teste histoquímico para detecção de arsênio não foi conclusivo, necessitando de outras análises para sua interpretação e não sendo localizado

um sítio de acúmulo de arsênio nas raízes e folhas das espécies estudadas. Não foi possível observar um marcador estrutural específico ao arsênio, uma vez que as alterações observadas foram também descritas em resposta a outros poluentes. Os parâmetros fisiológicos de *C. cajan* mostram a sensibilidade desta espécie ao arsênio pois, a menor dose deste elemento, afetou tanto as trocas gasosas, como os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*. Em *S. terebinthifolius* e *B. verticillata*, os danos causados na fotossíntese foram provavelmente em função da redução na condutância estomática, sendo a primeira mais sensível, pois os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* não foram alterados em *B. verticillata* e sofreram alterações características de uma fotoinibição reversível em *S. terebinthifolius*.

ABSTRACT

SILVA, Kellen Lagares Ferreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2008. **Evaluations of anatomical and physiological biomarkers in plants exposed to arsenic.** Adviser: Aristéa Alves Azevedo. Co-advisers: Luzimar Campos Silva, Marco Antonio Oliva Cano and Juraci Alves de Oliveira

Anatomical and physiological evaluations of the plants species *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) and *Cajanus cajan* (Leguminosae) were carried out following their exposure to arsenic. Anatomical evaluations included: light and scanning electron microscopy characterization; histolocalization of a putative site of arsenic accumulation in roots and leaves and morphometric analysis of leaf tissues. The physiological parameters evaluated were gaseous exchanges and emission of chlorophyll fluorescence. The influence of arsenic on growth was analyzed and the factor of transfer (FT) and the accumulation factor (FBA) were estimated from the content of the element accumulated in leaves, stems and roots. The experiments were conducted in a greenhouse, in the Plant Growth Unity of the Federal University of Viçosa. The plants were cultivated in Hoagland solution and arsenic was added as sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); *S. terebinthifolius* and *B. verticillata* were subjected to concentrations of 0; 2,5; 5,0; 7,5; and 10,0 mg L^{-1} As and *C. cajan* 0; 0,5; 1,0; 1,5; and 2,5 mg L^{-1} As. The exposure time to arsenic plants varied among the species: *S. terebinthifolius*, 47 days, *C. cajan*, 27 days and *B. verticillata*, 10 days. The anatomical changes in leaves of the three species were evident, but arsenic was translocated to the shoots only in *B. verticillata*, with FT and $\text{FBA} > 1$, showing that the damage, in the other two species, were due to indirect effects of arsenic. In the roots of the three species, anatomical changes were little expressive, when compared with the amount of accumulated arsenic, because all species showed an $\text{FBA} > 1$, perhaps due to the compartmentalization of this element in the vacuoles. The histochemical test for arsenic detection was not conclusive, and thus further analysis is required for the interpretation of the results. A site of accumulation of arsenic could not be detected in roots and leaves of the species studied. It was not possible to observe a specific structural marker to arsenic toxicity, since the changes observed were also ascribed in response to other pollutants. Physiological

parameters of *C. cajan* showed an arsenic sensitivity of this species, the lowest dose of this element affected gaseous exchanges and chlorophyll fluorescence. In *S. terebinthifolius* and *B. verticillata*, damages on photosynthesis were probably due to the stomatal conductance reduction. *S. terebinthifolius* was more sensitive because the parameters of chlorophyll fluorescence did not change in *B. verticillata* and evidencing a typical characteristic of a reversible photoinhibition in *S. terebinthifolius*.

INTRODUÇÃO GERAL

O arsênio (As) é um metalóide que ocorre no meio ambiente principalmente na forma de arsenito (AsIII), arsenato (AsV), ácidos arsenosos (H_3AsO_3 , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-}), ácidos arsênicos (H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-}), formas metiladas mais simplificadas como, por exemplo, monometilarsenato (MMA), dimetilarsenato (DMA), arsenobetaina (AB) e arsenocolina (AC), de acordo com os vários estados de oxidação deste elemento (-III, 0, III, V) (Kumaresan e Riyazuddin, 2001).

A contaminação por arsênio pode ser natural (solo, água, ar e organismos) ou antropogênica. Em condições naturais, as concentrações deste elemento estão em torno de 10 mg Kg^{-1} , mas variam consideravelmente em diferentes regiões do mundo. Por exemplo: nos EUA está em torno de $1\text{-}20 \text{ mg Kg}^{-1}$, em Bangladesh $9\text{-}20 \text{ mg Kg}^{-1}$, na Índia $10\text{-}196 \text{ mg Kg}^{-1}$ e na China $0,01\text{-}626 \text{ mg Kg}^{-1}$ (Mandal e Suzuki, 2002). No solo, o arsênio está presente, principalmente, nas formas inorgânicas mas também pode se ligar a materiais orgânicos e originar formas metiladas de arsênio. Dentre as formas inorgânicas, o arsenato é predominante em condições aeróbicas enquanto, o arsenito, predomina sob condições de redução. Na água do mar, as concentrações de arsênio podem variar entre $1 \text{ a } 100 \mu\text{g L}^{-1}$, mas a maioria dos oceanos do mundo está entre $1\text{-}2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Francesconi, 2005).

Apesar da ocorrência natural na biosfera, diferentes atividades antrópicas podem resultar na contaminação ambiental por arsênio, entre elas destacam-se: as explorações de minérios; uso de defensivos agrícolas, tais como, herbicidas (arsenito de sódio) e inseticidas (arseniato de chumbo); processos siderúrgicos, como a fabricação de ligas metálicas de chumbo e latão; manufaturas de vidros (trióxido de arsênio), esmaltes e tintas (dissulfeto de arsênio); conservante da madeira (arseniato de Cu e Cr) (Gontijo e Bittencourt, 2005).

O potencial tóxico e a disponibilidade de arsênio no meio ambiente dependem de vários fatores, incluindo, o potencial redox e o pH. Os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos que as formas metiladas (Barra et al.,

2000). A ordem decrescente de toxicidade dos compostos de arsênio são arsenito > arsenato > monometilarsenato (MMA) > dimetilarsenato (DMA) (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002; Jain e Ali, 2000).

No Brasil, a mineração é uma das atividades econômicas mais importantes e os minerais sulfetados são dominantes na maioria dos estados (Mello et al., 2006). O arsênio ocorre naturalmente em mais de duzentas formas de minerais, sendo o mais comum a arsenopirita (FeAsS) (Mandal e Suzuki, 2002). Estes minérios, oriundos de uma matriz de sulfetos, quando expostos à água e ao ar, podem solubilizar o arsênio associado a esta matriz. Uma vez solubilizado, o arsênio pode atingir corpos de água e tornar-se passível de incorporação à cadeia trófica (Mello et al., 2006).

Na região Amazônica Brasileira, a ICOMI (Indústria e Comércio de Minérios S/A) explorou manganês no município Serra do Navio, no Estado do Amapá, entre 1957 e 1997, e os rejeitos gerados, contendo arsênio, foram depositados inadequadamente oferecendo riscos à saúde humana (Santos et al., 2003). A exploração de minérios como ouro, zinco, urânio e níquel é uma atividade econômica importante em estados como Minas Gerais. Uma região que merece destaque e atenção é o Quadrilátero Ferrífero (QF), pois em Ouro Preto e Mariana foram encontradas concentrações de arsênio total, variando entre 2 a 2980 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de As^{+3} , que é a forma mais tóxica, entre 1 a 86 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Borba et al., 2004). Em Nova Lima, foram encontradas concentrações entre 0,4 - 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ de arsênio em amostras de água e em amostras de urina de crianças, em idade escolar, foram detectadas variações entre 2,2-106 $\mu\text{g L}^{-1}$ de arsênio (Matschullat et al., 2000), sendo que 20% deste grupo apresentavam concentrações superiores a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Em diversos países do mundo, o arsênio tem sido detectado nas análises de água utilizadas para o consumo humano, em níveis superiores a 0,05 mg L^{-1} , sendo que a concentração máxima permitida pelos órgãos governamentais é de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 2001). Neste cenário inclui-se a Argentina, Austrália, Bangladesh, Chile, China, Índia, México, Peru, Tailândia e Estados Unidos da América (EUA). Em Bangladesh, China, Índia e EUA foram documentados efeitos maléficos na saúde da população (WHO, 2001).

A água tem sido citada, como a forma mais comum de contaminação por arsênio no homem (Matschullat et al., 2000). Entretanto, dados referentes aos problemas ocasionados à saúde humana em consequência da exposição a este elemento raramente são disponibilizados.

Dentre os efeitos causados pelo arsênio em seres humanos podem ser citados: doenças de pele (hiperqueratose e hiperpigmentação), doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central, problemas gástricos e até mesmo câncer, no caso de exposições prolongadas (Barra et al., 2000; Woodward e Boffetta, 1997). Assim, é importante que sejam utilizadas estratégias que possam eliminar ou minimizar a exposição humana a este elemento. Neste sentido, a remediação de ambientes contaminados se faz necessária e, pode ser feita através de processos físico-químicos ou por biorremediação.

A remediação por processos físico-químicos pode ser feita através da escavação (remoção física do solo e depósito em aterros); capeamento (solo contaminado é coberto e isolado); estabilização (solo é misturado com estabilizantes que reduzem a mobilidade do arsênio); vitrificação (arsênio é quimicamente ligado formando silicoarsenatos); extração ácida (suspensão ou dissolução do arsênio em água e o contaminante é então concentrado); e fluxo de água (fluxo de água química ou orgânica para lavar o arsênio do solo). Entretanto, estes processos físico-químicos são inviáveis economicamente. Além de gerar resíduos secundários, podem afetar a saúde de quem estiver executando-os (Gonzaga et al., 2006).

A biorremediação é uma técnica de baixo custo, em relação às técnicas físico-químicas (Fitz e Wenzel, 2002) e utiliza organismos capazes de descontaminar diversos ambientes, como a água, o ar e o solo. Neste contexto, está inserida a fitorremediação, técnica de remediação de contaminantes tóxicos em água e solos que utiliza plantas, capazes de remover ou diminuir a disponibilidade destes elementos no ambiente (Salt et al., 1998). Desta forma, tem aumentado o interesse e o número de estudos visando esclarecer os processos envolvidos na fitorremediação e a identificação de espécies adequadas para esta finalidade (Francesconi, 2005).

Vários processos estão envolvidos na fitorremediação como: a remoção e translocação do poluente na biomassa (fitoextração); a imobilização do poluente na rizosfera, impedindo que ele seja lixiviado, podendo ser simplesmente uma barreira física ou por ação de microorganismos (fitoestabilização); a degradação de poluentes orgânicos na rizosfera devido à atividade microbiana (rizodegradação); a volatilização do poluente pela planta e, tem sido mostrada mais detalhadamente, para o selênio (fitovolatilização); a quebra dos poluentes por enzimas dentro da planta, também utilizada para poluentes orgânicos (fitodegradação). É importante ressaltar que estes processos não são excludentes e podem atuar simultaneamente. Assim, a identificação de plantas, que sejam capazes de realizar estes processos reveste-se de suma importância (Smith, 2005).

As características desejáveis às plantas com potencial para fitorremediação são: alta capacidade de absorção, concentração e ou metabolização do poluente; tolerância ao contaminante; retenção do contaminante nas raízes, no caso da fitoestabilização; sistema radicular profundo e denso; alta taxa de crescimento e produção de biomassa; capacidade transpiratória elevada; fácil colheita; resistência a pragas e doenças; fácil multiplicação; capacidade de desenvolver-se bem nos diversos ambientes e ocorrência natural em áreas poluídas (Pires et al., 2003). É muito difícil encontrar todas estas características numa única planta. Portanto, é importante identificar e conhecer plantas capazes de deter o maior número de características citadas acima, no intuito de subsidiar as pesquisas em fitorremediação.

No Brasil, ainda são poucos os estudos sobre efeitos do arsênio em plantas. Além disso, estudos que integrem as respostas fisiológicas e anatômicas, em consequência da exposição ao arsênio, juntamente com a capacidade acumuladora deste elemento em plantas são escassos. Neste estudo, foram investigadas as respostas anatômicas e fisiológicas além da capacidade de acumular arsênio em plantas de *Schinus terebinthifolius*, *Borreria verticillata* e *Cajanus cajan*.

2 - JUSTIFICATIVA

Em Nova Lima, MG, funcionou por 35 anos uma fábrica de trióxido de arsênio e 20 anos após o encerramento das atividades da indústria, a vegetação existente no entorno era apenas de gramíneas. Em 1995 foi realizado, pela EMATER, um projeto de recuperação da área com o plantio de 34000 mudas de 80 espécies arbóreas e arbustivas. Em levantamento florístico realizado em 2007, pôde-se constatar que das 80 espécies introduzidas, pouco menos de 20 espécies foram encontradas no local e, dentre estas, a espécie predominante era *Schinus terebinthifolius* (Camargo, 2007 - dados não publicados). Foi observada, ainda, uma extensa área coberta por *Borreria verticillata* (Rubiaceae), uma herbácea invasora. Estudos preliminares constataram que o solo desta região possuía grande quantidade de arsênio ($137\text{-}733\text{ mg dm}^{-3}\text{ As}$) e que, tanto em *S. terebinthifolius* quanto em *B. verticillata*, foi detectada a presença deste metalóide na parte aérea (Ribas et al., 2007 - dados não publicados).

A escolha das espécies *S. terebinthifolius* e *B. verticillata* se justifica em função de terem sido encontradas em áreas contaminadas pelo arsênio e, de *Cajanus cajan*, por ser sensível a este poluente (Melo, 2006; Felipe, 2007). A caracterização anatômica e fisiológica das espécies observadas em área contaminada com arsênio (*S. terebinthifolius* e *B. verticillata*) e de espécie sensível a este elemento (*C. cajan*) se reveste de extrema relevância pois contribui para o conhecimento das respostas de espécies tropicais ao arsênio.

3 - OBJETIVOS GERAIS

Avaliar as respostas de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) e *Cajanus cajan* (Fabaceae) ao arsênio, determinando o teor deste elemento acumulado pelas espécies, bem como os possíveis efeitos sobre o crescimento, a estrutura anatômica de raízes e folhas, as trocas gasosas e emissão de fluorescência da clorofila *a* e a identificação de um possível biomarcador relacionado ao arsênio.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; GUARDIA, M. 2000. Especiação de arsênio - uma revisão. **Química Nova**, 23(1): 58-70.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTI, J. A. 2004. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **Revista Escola de Minas**, 57(1):45-51.

FELIPE, R. T. A. 2007. **Crescimento e respostas antioxidativas em espécies leguminosas submetidas ao arsênio**. Tese de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 29p.

FITZ, W. J.; WENZEL, W. W., 2002. Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. **Journal of Biotechnology**, 99(1): 259-278.

FRANCESCONI, K. A. 2005. Current perspectives in arsenic environmental and biological research. **Environmental Chemistry**, 2(1): 141-145.

GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. 2005. Arsênio: uma revisão histórica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 80(1): 91-95.

GONZAGA, M. I. S.; SANTOS, J. A. G.; MA, L. Q. 2006. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. **Scientia Agricola**, 63(1): 90-101.

JAIN, C. K.; ALI, I. 2000. Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. **Water Resources**, 34(17): 4304-4312.

KUMARESAN, M.; RIYAZUDDIN, P. 2001. Overview of speciation chemistry of arsenic. **Current Science**, 80(7): 837-846.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. 2002. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, 58(1): 201-235.

MATSCHULLAT, J.; BORBA, R. P.; DESCHAMPS, E.; FIGUEIREDO, B. R.; GABRIO, T.; SCHWENK, M. 2000. Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. **Applied Geochemistry**, 15(1): 181-190.

MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, 154(1): 29-43.

MELO, R. F. 2006. **Seleção de espécies indicadores e fitorremediadoras de solos contaminados por arsênio**. Tese de doutoramento do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da Universidade Federal de Viçosa. 107p.

MELLO, J. W. V.; DIAS, L. E.; DANIEL, A. M.; ABRAHÃO, W. A. P.; DESCHAMPS, E.; SHAEFER, C. E. G. R. 2006. Avaliação preliminar de drenagem ácida no estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 30(2): 365-375.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; PROCOPIO, S. O.; FERREIRA, L. R. 2003 Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, 21(2): 335-341.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. 1998. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49(1): 643-668.

SANTOS, E. C. O.; JESUS, I. M.; BRABO, E. S.; FAYAL, K. F.; FILHO, G. C.; LIMA, M. O.; MIRANDA, A. M.; MASCARENHAS, A. S.; SÁ, L. L. C.; SILVA, A. P.; CÂMARA, V. M. 2003. Exposição ao mercúrio e ao arsênio em estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas/FUNASA. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 6(2): 171-185.

SMITH, E. P. 2005. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, 56(1):15-39.

WHO - World Health Organization. 2001. Arsenic in drinking water. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en>. Acesso em 26 de julho de 2007.

WOODWARD, A.; BOFFETTA, P. 1997. Environmental exposure, social class, and cancer risk. **International Agency for Research Cancer**, 138(1): 361-367.

CAPÍTULO I

Influência do arsênio no crescimento e na capacidade de acúmulo deste poluente em plantas

Resumo: Neste trabalho objetivou-se avaliar o teor de arsênio (As) acumulado nas folhas, caules e raízes e a influência do elemento no crescimento de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) e *Cajanus cajan* (Leguminosae). As plantas foram mantidas em solução de Hoagland (meia força iônica) e o arsênio foi aplicado na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). *S. terebinthifolius* e *B. verticillata* foram submetidas a concentrações 0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10,0 mg L^{-1} e *C. cajan* a 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,5 mg L^{-1} . *S. terebinthifolius* permaneceu durante 47 dias em exposição aos tratamentos, *C. cajan* 27 dias e *B. verticillata* 10 dias. No final do experimento, foi medida a área foliar total da planta e determinada a massa seca de raízes, caules e folhas. A determinação de arsênio (As) e fósforo (P) foi realizada em Espectrofotômetro de Emissão, com Plasma Indutivamente acoplado. A biomassa de raízes, caules e folhas de *B. verticillata* não foi afetada pelo arsênio, mas as folhas exibiram necroses marginais sob as doses mais elevadas, enquanto as raízes não apresentaram sintomas de toxicidade. Esta espécie apresentou alta capacidade de absorção do arsênio, com Fator de Translocação (FT) e Fator de Bioacumulação (FBA) > 1. *S. terebinthifolius* foi fortemente afetada pelo arsênio havendo redução de 78,4% na matéria seca total e 83,6% na área foliar sob dosagem de 10 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$. Entretanto, a parte aérea da planta não apresentou sintomas visíveis de toxicidade por As, como necroses ou cloroses. Nas raízes, foi possível observar, além da redução na biomassa, ausência das raízes laterais em relação ao controle. Em *C. cajan*, a menor dosagem já foi suficiente para reduzir 63,7% na biomassa total. Nesta espécie, foi observada alta taxa de abscisão foliar o que contribuiu para uma diminuição de 79,9% na biomassa deste órgão e redução de 79,9% na área foliar, na dose máxima de arsênio aplicada. Observou-se, também, um amarelecimento das folhas. Nas raízes também ocorreu redução de 75,3% na biomassa e redução acentuada no tamanho das raízes laterais. Essas raízes apresentaram aspecto gelatinoso e mudança na coloração. Foi possível concluir que *B. verticillata* apresentou-se como uma espécie resistente ao As, com FT e FBA>1. A sensibilidade de *C. cajan* foi ratificada, uma vez que a menor dose de As utilizada foi suficiente para influenciar negativamente o crescimento da espécie, mas apresentou FBA>1 em função de ter acumulado grande quantidade de arsênio em suas raízes. *S. terebinthifolius*, também apresentou FBA>1 e, apesar de ter o crescimento afetado, permaneceu por um longo período de exposição ao As, sem que suas folhas apresentassem cloroses ou necroses.

Palavras chave: efeitos do arsênio, *Schinus terebinthifolius*, *Borreria verticillata* e *Cajanus cajan*.

Summary: This study aimed to evaluate the level of arsenic (As) accumulated in the leaves, stems and roots and the influence of the element in the growth of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) and *Cajanus cajan* (Leguminosae). The plants were kept in Hoagland's solution (half strength) and arsenic was applied in the form of sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). *S. terebinthifolius* and *B. verticillata* were subjected to the concentrations 0, 2,5, 5,0, 7,5, and 10,0 mg L^{-1} , and *C. cajan* to 0, 0,5, 1,0, 1,5, and 2,5 mg L^{-1} . *S. terebinthifolius* exposed for 47 days treatment, *C. cajan*, for 27 days and *B. verticillata*, for 10 days. At the end of the experiment total leaf area of the plant was measures and dry mass of roots, stems and leaves was determined. The arsenic (As) and phosphorus (P) were determined by Emission Spectrophotometer with inductively coupled plasma. Biomass of roots, stems and leaves of *B. verticillata* was not affected by arsenic, but the leaves showed marginal necrosis under the higher doses, while the roots showed no symptom of the toxicity. That species showed a high capacity of arsenic absorption, with the translocation Factor (TF) and Factor Bioaccumulation (FBA) > 1. *S. terebinthifolius*, on the other hand, was strongly affected by arsenic showing a decrease of 78,4% in total dry mass and 83,6% in total leaf area at dosage of 10 mg L^{-1} As. Meanwhile, the shoots did not show visible symptom of toxicity (necrosis or chlorosis). In roots, it was possible to observe, in addition to the reduction in its biomass, a lack of lateral roots a compared with the control. In *C. cajan*, the smallest dose showed sufficient to reduce 63,7% of total biomass. This species exhibited a high rate of leaf abscission, which contributed to the decrease of 79,9% in its biomass and reduction of 79,9% in leaf area, at maximum dosage of arsenic applied. It was also shown a yellowing of their leaves. Roots was also reduced in 75,3% of its biomass and a sharp reduction in the size of lateral roots was also observed. These roots showed a gelatinous appearance, exhibiting also changes in color. It can be concluded that *B. verticillata* presented as resistant to As, with FT and FBA > 1. The sensitivity of *C. cajan* has been confirmed, since the lowest dose of As employed was able to affect negatively the growth of the species, presented however a FBA > 1 due to having accumulated large amounts of arsenic in their roots. *S. terebinthifolius*, also presented FBA > 1 and, although it affected growth, the plant remained for a long period of exposure to As, but their leaves did not show either chlorosis or necrosis.

Key-words: effects of arsenic, *Schinus terebinthifolius*, *Borreria verticillata* e *Cajanus cajan*.

1 – INTRODUÇÃO

O arsênio não é um elemento essencial, sendo incorporado aos organismos como arsenato (AsV) via transportadores de fosfato (Merharg e Macnair, 1992; Merharg e Hartley-Whitaker, 2002) ou como arsenito (AsIII) via aquagliceroporinas (Rosen, 2002; Liu et al., 2002; Merharg e Jardine, 2003).

A principal forma de acumulação de arsênio nas plantas é o arsenito (>85%; Lombi et al., 2002; Zhang et al., 2002). Uma vez dentro da célula, o arsenato (AsV) é reduzido a arsenito (AsIII), pois a maioria das plantas parece possuir altos níveis de atividade da arsenato redutase, a qual reduz o arsenato a arsenito (Merharg e Hartley-Whitaker, 2002; Salt et al., 2002). O arsenito é altamente reativo e mais tóxico do que o arsenato, ligando-se fortemente à resíduos de cisteína e histidina, perturbando o metabolismo e podendo levar à morte celular (Rosen, 2002). O arsenito pode ser ainda expulso da célula ou seqüestrado para compartimentos intracelulares, como arsenito livre ou conjugado com glutatona ou outros tióis (Hartley-Whitaker et al., 2001).

O arsenato também pode ser tóxico, provavelmente devido a sua interferência nos mecanismos de transporte e metabolismo do fosfato, como por exemplo, reações de fosforilação, atuando como um análogo não funcional (Merharg e Hartley-Whitaker, 2002).

Plantas de diferentes espécies têm a habilidade de sobreviver em ambientes com altos teores de arsênio (Hartley-Whitaker et al., 2001; Ma et al., 2001). Apesar de o arsênio ser tóxico para a maioria das plantas, algumas espécies vegetais têm a capacidade de acumular este elemento em quantidades consideráveis, principalmente as pteridófitas (Merharg, 2003). Plantas hiperacumuladoras de arsênio são aquelas capazes de concentrar, no mínimo, 0,1% do elemento em sua massa seca (Brooks, 1998). Este é um fenômeno raro; além desta capacidade, devem ainda ser levados em consideração o fator de translocação (FT), definido como a razão entre a concentração do metal na biomassa aérea da planta em relação à concentração na raiz (Fayiga e Ma, 2005; Huang et al., 2006); e o fator de

bioacumulação (FBA), definido como a razão entre a concentração do metal na planta em relação ao meio (Ma et al., 2001; Tu et al., 2002; Huang et al., 2006).

Uma espécie acumuladora de arsênio deve ter FBA e FT > 1 e a concentração total de arsênio deve ser superior a 1000 mg Kg⁻¹ na biomassa da planta. *Pteris vittata* foi a primeira espécie a ser descrita como hiperacumuladora, pois tem a capacidade de remover o arsênio do solo, podendo acumular acima de 22630 mg Kg⁻¹ As (Ma et al., 2001), concentrando 2,3% deste elemento em sua biomassa, e tem a capacidade de concentrar 100 vezes a quantidade de arsênio do solo. Depois de *P. vittata*, *Pityrogramma calomelanos* também foi classificada como hiperacumuladora por acumular 8350 mg Kg⁻¹ As em sua matéria seca (Francesconi et al., 2002). Outras espécies de *Pteris* foram descritas como sendo hiperacumuladoras de arsênio, dentre elas: *P. cretica*, *P. longifolia*, *P. umbrosa* (Zhao et al., 2002), *P. biaurita*, *P. quadriaurita*, *P. ryukyuensis* (Srivivastava et al., 2006). Mas, nem toda espécie de *Pteris* é acumuladora de arsênio, como *P. straminea*, *P. tremula* (Meharg, 2003), *P. ensiformis*, *P. semipinnata* e *P. setuloso-costulata* (Wang et al., 2007). Dos 450 táxons de plantas documentadas como hiperacumuladoras de metais ou metalóides, pouco menos de 0,2% são de angiospermas. No caso de arsênio, todas as espécies até agora identificadas como hiperacumuladoras são samambaias, principalmente do gênero *Pteris*, com exceção de *Pityrogramma calomelanos*, mas todas pertencem à família Pteridaceae (Meharg, 2002).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a tolerância ao arsênio em plantas. O primeiro mecanismo é apresentado por plantas que aumentam a produção de peptídeos ricos em tióis, os quais podem desempenhar importante papel na distribuição e processamento de nutrientes e metais tóxicos. Entre eles estão as fitoquelatinas e outros peptídeos de baixo peso molecular, como a γ -glutamilcisteína e a glutatona (Grill et al., 1989). O segundo mecanismo, encontrado na maioria das plantas tolerantes analisadas até o momento, está associado com a absorção reduzida de arsenato, através da supressão dos sistemas de transporte de fósforo de alta afinidade (Meharg et al., 1994; Hartley-Whitaker et al., 2002; Bleeker et al., 2003). O terceiro mecanismo envolve a maior atividade da enzima arsenato redutase, predominantemente ativa em raízes, que reduz o transporte de arsênio da raiz

para a parte aérea (Meharg e Macnair, 1992). Plantas de *Arabidopsis* sp. com reduzida expressão da arsenato redutase no sistema radicular apresentam hiperacumulação de arsênio na parte aérea (Dhankher et al., 2006) e em *Holcus lanatus* a tolerância ao arsênio está ligada ao maior nível de expressão desta enzima (Bleeker et al., 2006). Os mecanismos citados para explicar a tolerância ao As não são excludentes e podem coexistir, conferindo maiores níveis de tolerância (Dhankher et al., 2002).

O comportamento de plantas em relação à presença de As na região da rizosfera pode diferir em função de sua concentração, da presença de outros íons e de fatores intrínsecos da espécie no que se refere à sua capacidade de tolerar o elemento (Gonzaga et al., 2006).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar as respostas ao arsênio de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) e *Borreria verticillata* (Rubiaceae), por serem plantas ocorrentes em áreas contaminadas com este metalóide e, contrastar as respostas às de *Cajanus cajan* (Leguminosae), espécie comprovadamente sensível a este elemento. Objetivou-se, ainda, verificar a capacidade de acúmulo de arsênio e fósforo nas folhas, caules e raízes destas espécies.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material vegetal

As espécies utilizadas neste trabalho foram: *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae); *Borreria verticillata* (Rubiaceae); *Cajanus cajan* (Leguminosae).

Schinus terebinthifolius é uma planta de porte arbóreo, conhecida popularmente como aroeira-mansa ou aroeira-vermelha. Fornece madeira bastante resistente, cercas vivas e arborização para pastos, além de ser uma das espécies mais procuradas pela avifauna. Também é conhecida como pimenta rosa e seu fruto é utilizado na culinária brasileira. É considerada uma planta pioneira o que permite sua ocorrência em vários habitats, ocupando áreas degradadas e, muitas vezes, até se tornando invasora em áreas agrícolas (Corrêa 1926 *apud* Carmelo-Guerrero e Paoli, 2002). Apresenta

folhas alternas e compostas (Souza e Lorenzi, 2008). Esta espécie encontra-se dentre as plantas de grande uso popular como medicinal, por sua capacidade cicatrizante e antiinflamatória (Branco Neto et al., 2006; Melo Junior et al., 2002).

O gênero *Borreria* ocorre em todo território brasileiro e contém representantes, tais como *Borreria verticillata*, que são comumente usados como antipiréticos e analgésicos (Vieira et al., 1999). O extrato de raízes de *Borreria verticillata* possui atividade antibacteriana (Peixoto Neto et al., 2002). Estudos de efeitos de poluentes com este gênero têm demonstrado que plantas de *B. verticillata* quando expostas ao flúor, emitido por uma fábrica de alumínio, apresentam severas necroses e um baixo incremento deste poluente em suas folhas, não ultrapassando $120 \mu\text{g g}^{-1}$ (Divan Junior et al., 2008). Uma outra espécie do gênero, *Borreria scabiosoides*, tem a capacidade de remover cromo (CrIII) em solução hidropônica, e de acumular este poluente preferencialmente nas paredes e no vacúolo das células do córtex radicular (Mangabeira et al., 2006).

Cajanus cajan, conhecida popularmente como feijão guandu, é uma leguminosa de porte arbustivo e perene. Tem seu centro de origem na Índia e consiste de uma importante fonte de proteína para animais na África e Ásia (Provazi et al., 2007). Apresenta folhas alternas e compostas. Uma importante aplicação desta espécie é seu uso na adubação verde, principalmente considerando a associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (Souza e Lorenzi, 2008). A sensibilidade destas plantas ao arsênio foi demonstrada por Melo (2006) e Felipe (2007).

2.2 – Condições de cultivo e parâmetros avaliados

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais (20°45'S, 42°15'W, 650m de altitude).

As sementes foram colocadas para germinar diretamente em bandejas plásticas contendo areia. As plântulas foram selecionadas pela uniformidade de tamanho e, após expansão da folha do primeiro nó, acima do cotilédone, foram

transferidas para sistema hidropônico em caixas de isopor (2,5 L), protegidas para evitar entrada de luz externa. Foram colocadas duas plantas por caixa. As plantas foram mantidas em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1938), meia força iônica, sob aeração constante. O pH foi ajustado a cada dois dias, para 5,5, e a solução, renovada a cada cinco dias. Após o período de aclimação, emissão e expansão da folha do segundo nó acima do cotilédono, o arsênio foi aplicado na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). *S. terebinthifolius* e *B. verticillata* foram submetidas às concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10,0 mg L^{-1} As e *C. cajan* às concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,5 mg L^{-1} As.

A exposição ao arsênio foi feita progressivamente; cada planta permaneceu por 24 horas, nas concentrações mais baixas, até atingir a concentração determinada para cada tratamento.

Os experimentos foram conduzidos separadamente e o tempo de exposição das plantas ao arsênio variou entre as espécies em função da sensibilidade das mesmas ao arsênio, das características de cada espécie e da concentração de arsênio aplicada. *S. terebinthifolius* permaneceu durante 47 dias, *C. cajan*, 27 dias e *B. verticillata*, 10 dias.

Ao longo do experimento foi feita uma análise visual das plantas, com registro fotográfico. No final do experimento, foram avaliadas a área foliar do conjunto total de folhas da planta, no medidor de área foliar (Area Measurement System Delta-T Devices Ltd. Burwell, Cambridge, England), e a biomassa fresca de raízes, caules e folhas. Esta, após secagem em estufa a 70° C até peso constante, foi utilizada para determinação da massa seca destes órgãos. Antes de serem secas em estufa, as raízes foram lavadas em solução de ácido nítrico 10% e posteriormente em água destilada, para retirada do arsênio da superfície do órgão.

2.3 – Determinação de acúmulo de arsênio (As) e fósforo (P) nos tecidos

Para determinar os teores de arsênio (As) total amostras de 0,5 g de material seco, finamente triturado em moinho (TE048, Tecnal Marconi,

Piracicaba-SP), de raízes, caules e folhas foram adicionadas em tubos, contendo 10 ml de solução nitro-perclórica 3:1, e mantidas em pré-digestão à temperatura ambiente, por um período de 14 horas (Tedesco et al., 1995). Em seguida, os tubos foram transferidos para bloco digestor, com temperatura controlada. A temperatura foi aumentada gradativamente, para evitar a volatilização do arsênio, primeiro a 50 °C, por aproximadamente 30 min, 100 °C por mais 30 min e, finalmente, 150 °C até completar a digestão da matéria orgânica. Nesta etapa também foram levadas ao bloco digestor amostras “branco”, que continham apenas solução nitro-perclórica, para servir de parâmetro durante a digestão e também para preparo posterior da curva padrão contendo arsênio e fósforo. Após resfriamento, o conteúdo dos tubos foi completado para 25 ml com água ultra pura. A partir desta solução, os teores de arsênio e fósforo, foram determinados por espectrometria de emissão atômica em Espectrofotômetro de Emissão com Plasma Indutivamente Acoplado (MODELO-3300 DV, Perkin Elmer Optima, EUA), nos extratos de plantas.

Utilizando-se do teor de As acumulado por unidade de matéria seca, foi calculado o fator de transferência (FT) que é definido como a razão entre a concentração de arsênio na parte aérea da planta (caule e folhas) e a concentração de arsênio nas raízes (Fayiga e Ma, 2005; Huang et al., 2006) e o fator de bioacumulação (FBA) que é definido pela razão entre a concentração de arsênio na planta e a concentração de arsênio no meio de crescimento, podendo ser o solo ou a água (Ma et al., 2001; Tu et al., 2002; Huang et al., 2006).

2.4 - Análises estatísticas

O experimento foi montado num delineamento em blocos ao acaso, com cinco tratamentos e quatro repetições.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e apresentados como médias e desvio padrão. Para realização de todas as análises foi utilizado o software SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (Euclides, 1983). Para a realização da ANOVA alguns valores foram transformados em raiz quadrada e outros em função logarítmica.

3 - RESULTADOS

3.1 - Acúmulo de biomassa

Os efeitos do arsênio sobre os parâmetros de crescimento variaram muito entre as espécies estudadas. Nas plantas de *B. verticillata* observou-se uma murcha, em toda a parte aérea da planta, com o aumento da concentração de arsênio na solução (Figura 1A). Ao longo do dia esta murcha ficava mais acentuada, mas era recuperada no período da manhã, do dia seguinte. Entretanto, a biomassa de raízes, caule, folhas e conseqüentemente a biomassa total, nas plantas de *B. verticillata*, não foi afetada negativamente com a presença do arsênio (Figura 1B). É possível observar que, na menor dose de arsênio aplicada, houve um aumento sutil na biomassa (Figura 1B).

Plantas de *S. terebinthifolius*, entretanto, foram fortemente afetadas com a presença do arsênio (Figura 2A). A redução na matéria seca de raízes foi de 67,73%, em relação ao controle, na dose de 7,5 mg L⁻¹As (Figura 2B). Na porção aérea, tanto no caule, quanto nas folhas, a redução da biomassa teve diferença significativa, em relação ao controle, a partir de 2,5 mg L⁻¹As atingindo 84,5% para caule e 81,4% para folhas, na máxima dosagem aplicada (Figura 2B). A biomassa total foi afetada a partir de 5 mg L⁻¹As com redução de 78,39%, em relação ao controle, na dosagem máxima aplicada (Figura 2B).

Em contrapartida, em *C. cajan*, na menor dosagem já foi possível visualizar a sensibilidade desta espécie ao arsênio (Figura 3A). A dosagem de 0,5 mg L⁻¹As foi suficiente para uma redução de 63,7% na biomassa total, e esta tendência foi mantida, com o aumento da concentração do arsênio (Figura 3B). Nesta espécie, foi observada abscisão foliar o que contribuiu para uma diminuição de 79,88% na biomassa deste órgão (Figura 3B) na dosagem de 2,5 mg L⁻¹ de arsênio aplicada. A biomassa do caule também foi afetada em 71,15% e, conseqüentemente, a biomassa total sofreu uma redução, de 76,97%, na maior dose de As aplicada, em relação ao controle (Figura 3B).

A área foliar também variou bastante entre as espécies estudadas. Em *B. verticillata* este parâmetro não foi afetado significativamente, com a presença do arsênio (Figura 4A) seguindo a mesma tendência do resultado

obtido para os valores de biomassa. Em *S. terebinthifolius* a área foliar foi afetada a partir da dose de 2,5 mg L⁻¹As, chegando a uma redução de 83,6% na dosagem de 10 mg L⁻¹ As, quando comparada ao controle (Figura 4B). Em *C. cajan*, a dose máxima de arsênio aplicada (2,5 mg L⁻¹) provocou redução de 79,9% na área foliar (Figura 4C).

No sistema radicular, não foram observadas alterações macroscópicas em *B. verticillata* (Figura 5A-E). Em *S. terebinthifolius* foi possível observar, nas raízes, redução na biomassa e na emissão de raízes laterais, diferentemente do controle (Figura 5F-J). Em *C. cajan* houve redução no tamanho das raízes laterais e estas foram formadas bem próximas uma das outras (Figura 5K-O). Foram observados, ainda, aspecto gelatinoso e mudança na coloração destas raízes (Figura 5K-O).

Após observação macroscópica, as folhas de *B. verticillata* não apresentaram sintomas de toxicidade ao As, nas doses mais baixas de arsênio aplicadas, apresentando cloroses e necroses apenas nas doses mais elevadas de arsênio (Figura 6A-E). Os folíolos de *S. terebinthifolius* não apresentaram sintomas visíveis de toxicidade por arsênio, tais como necroses ou cloroses (Figura 6F-J). Em *C. cajan*, além de queda, pôde-se observar amarelecimento dos folíolos (Figura 6K-O).

3.2 - Acúmulo e distribuição de arsênio e fósforo

As plantas responderam diferentemente quanto à absorção de arsênio e fósforo. Em *B. verticillata*, o acúmulo de arsênio, na raiz, aumentou progressivamente, com o aumento da concentração do arsênio em solução (Figura 7A). O máximo teor de arsênio encontrado nas raízes foi de 378 mg KgMS⁻¹, na dosagem de 10 mg L⁻¹As. O arsênio absorvido, pelas raízes, foi translocado para o caule e folhas, chegando à concentração máxima de 218 e 172 mg KgMS⁻¹, respectivamente (Figura 7A). No caule, o teor do arsênio aumentou com o aumento da concentração deste elemento na solução até a dosagem de 7,5 mg L⁻¹ As. Nas folhas, não houve diferença estatística no teor de arsênio, entre as dosagens de arsênio aplicadas (Figura 7A). Altos teores de

fósforo foram mantidos em todos os órgãos desta espécie, com o acréscimo do arsênio em solução (Figura 7B).

O teor de arsênio presente nas raízes de *S. terebinthifolius* aumentou com a presença do arsênio na solução na concentração de 2,5 mg L⁻¹As e não variou nas outras concentrações. Na maior dosagem de As aplicada foi detectado 546 mg KgMS⁻¹ de arsênio nas raízes (Figura 7C). A capacidade de translocar este arsênio absorvido, para parte aérea da planta foi pequena, ficando quase todo o arsênio absorvido retido em suas raízes (Figura 7C). A partir de 5 mg L⁻¹As em solução, pouco arsênio foi translocado para o caule e folhas, sendo 11,65 mg KgMS⁻¹ a concentração máxima encontrada nas folhas, na maior concentração utilizada (Figura 7C). O acúmulo do fósforo, entretanto, diminuiu com o aumento de arsênio no meio em todos os órgãos (Figura 7D). Nas raízes e folhas foi observada redução significativa na menor dose de arsênio aplicada e esta redução foi mantida nas demais doses. Contudo, no caule, a redução foi gradativa até a dosagem de 5 mg L⁻¹As; a partir daí, esta redução foi mantida para as demais doses (Figura 7D).

C. cajan absorveu pouca quantidade de arsênio, quando comparado com as duas últimas espécies descritas anteriormente. A partir de 0,5 mg L⁻¹As houve acréscimo de arsênio nas raízes e não variou com o aumento da concentração de arsênio na solução. A concentração máxima de arsênio encontrada nas raízes foi de 171 mg KgMS⁻¹ (Figura 7E). Vale ressaltar, ainda, que em *C. cajan* pouco arsênio foi translocado para a parte aérea, pois o teor máximo encontrado nas folhas foi de 9 mg KgMS⁻¹. A absorção de fósforo desta espécie não foi influenciada nas raízes e no caule, pois os teores de fósforo foram mantidos com o aumento da concentração de arsênio na solução (Figura 7F). Nas folhas, entretanto, a absorção de fósforo diminuiu com o aumento da concentração de arsênio, na concentração de 1,5 mg L⁻¹ (Figura 7F).

3.3 - Fator de translocação (FT) e fator de bioacumulação (FBA)

O fator de translocação (FT) em *B. verticillata* foi expressivo na primeira dosagem de arsênio (2,5 mg L⁻¹), indicando que grande parte do arsênio absorvido pelas raízes foi transferido para parte aérea da planta. Nas demais

concentrações de arsênio utilizadas houve redução no FT, em relação à primeira concentração e não variou entre as dosagens de arsênio aplicadas (Figura 8A). Já o FBA foi superior a 1 em todas as dosagens de arsênio às quais as plantas desta espécie foram submetidas. E, não houve diferença no FBA entre as dosagens aplicadas (Figura 8C).

Em *S. terebinthifolius*, o FT foi baixo e não variou entre as diferentes concentrações de arsênio estudadas (Figura 8A), pois pouco arsênio foi direcionado para a parte aérea da planta; porém o FBA foi maior que 1, em todas as concentrações, em função de grande parte de o arsênio absorvido ter ficado retido na raiz (Figura 8C). O FBA foi maior na menor concentração de arsênio aplicada; a partir de 5 mg L⁻¹As houve uma diminuição neste índice, que foi mantida entre as demais concentrações de As aplicada (Figura 8C).

Em *C. cajan*, o FT foi menor que 1 em todas as concentrações de arsênio aplicadas e não houve variação entre elas (Figura 8B). O FBA foi maior que 1 em todas as concentrações de arsênio utilizadas. Na maior dose de arsênio houve redução neste índice (Figura 8D).

4 - DISCUSSÃO

As plantas respondem de maneiras diferentes quando expostas ao arsênio, podendo ser sensíveis ou tolerantes. No presente estudo, *B. verticillata*, *S. terebinthifolius* e *C. cajan* apresentaram comportamentos distintos na presença do arsênio.

B. verticillata apresentou tolerância ao As, uma vez que sua biomassa e área foliar não foram reduzidas pela presença deste elemento na solução de cultivo. Além disso, grande parte do arsênio absorvido por estas plantas foi translocado para a parte aérea, apresentando um FT e FBA>1. Poucas plantas têm apresentado esta capacidade de translocar arsênio para a parte aérea. A primeira espécie a ser descrita como hiperacumuladora de arsênio, por apresentar FT e FBA>1 e acumular mais que 1000 mg Kg⁻¹ de arsênio na biomassa da planta, foi *Pteris vittata* que chegou a acumular acima de 22630 mg Kg⁻¹ As em seus tecidos (Ma et al., 2001). Um número reduzido de

Angiospermas (0,2%) apresenta capacidade de acumular algum tipo de metal (Meharg, 2002). Dentre elas, pode-se citar *Viola principis* H., que pode hiperacumular chumbo, arsênio e cádmio. Nesta espécie, o arsênio apresenta-se, principalmente, na bainha do feixe vascular e no parênquima paliçádico, e as plantas parecem apresentar mecanismo de detoxificação destes poluentes, uma vez que estes elementos são acumulados nos tecidos que realizam fotossíntese (Lei et al., 2008). Ressalta-se, portanto, a importância do resultado obtido em *B. verticillata* no presente estudo. Entretanto, apesar das plantas de *B. verticillata* apresentarem FT e FBA>1, não é possível afirmar que são hiperacumuladoras de arsênio, pois a concentração de As total na sua biomassa não foi superior a 1000 mg Kg⁻¹. Contudo, deve-se levar em consideração o fato do tempo de exposição destas plantas ao arsênio ter sido pequeno.

As formas, a especiação e a distribuição de arsênio nas plantas podem fornecer importantes informações no entendimento de mecanismos de acumulação, de translocação e da transformação do As (Zhang, 2002). No presente trabalho, o arsênio foi aplicado na forma de arsenato, forma análoga ao fosfato, que compete pelos mesmos canais de absorção de fósforo (Meharg e Macnair, 1992). Contudo, apesar de as plantas de *B. verticillata* terem absorvido grandes concentrações de arsênio, o *status* do fósforo foi mantido em todos os órgãos, com aumento do As na solução. Em *P. vittata*, hiperacumuladora de As, o transporte de arsênio também não afetou as concentrações de fósforo (Kertulis et al., 2005). Entretanto, esta espécie apresentou uma especiação de As diferente das outras espécies de *Pteris* (Srivastava et al., 2006), pois 93% do arsênio nas frondes estavam na forma de arsenito, indicando que o arsenato foi convertido a arsenito, durante a translocação da raiz para frondes (Ma et al., 2001; Zhang, 2002; Tu, 2003). Trabalhos têm mostrado que, quando crescidas na presença de arsenato, as plantas incorporam arsênio e grande parte é transformada em arsenito (forma mais tóxica), pela ação da arsenato redutase, que é predominantemente ativa em raízes (Meharg e Macnair, 1992). Pickering et al. (2000) observaram este mecanismo em mustarda da Índia (*Brassica juncea*). O silenciamento da expressão de arsenato redutase na raiz de *Arabidopsis* sp. possibilitou que as plantas apresentassem 10 vezes mais acúmulo de As na parte aérea

(Dhankher et al., 2006). Portanto, será essencial um estudo de especiação do arsênio em *B. verticillata*, na tentativa de se investigar os mecanismos envolvidos na tolerância destas plantas a este elemento. Uma outra explicação estaria na expressão de canais de absorção de fósforo. Como os níveis de fósforo foram mantidos, pode ser que um canal diferenciado esteja sendo expresso, permitindo a entrada simultânea de arsênio e fósforo. Alterações no sistema de absorção de fósforo foram descritas em *Holcus lanatus* L. Nesta espécie, a supressão do sistema de alta afinidade de absorção de fósforo é consequência da perda de indução da síntese de canais de fósforo, tornando-a uma planta tolerante por exclusão de fosfato/arsenato (Meharg e Macnair, 1992).

Apesar da biomassa, das plantas de *B. verticillata*, não ter sido influenciada negativamente, com a presença do As, as plantas apresentaram uma murcha na parte aérea. Isto pode ter acontecido pelo fato do arsênio promover redução na absorção de água e nutrientes pelas raízes (Carbonell-Barrachina et al., 1997). O conteúdo relativo de água e o potencial hídrico de folhas de *Phaseolus vulgaris* foram diminuídos em presença do arsênio (Stoeva et al., 2003/04). *Mimosa caesalpinieaefolia* (Costa, 2007) e *Canavalia ensiformis* (Nascimento, 2007) apresentaram sintomas de murcha, após terem sido expostas a diferentes doses de arsênio. Em *B. verticillata*, além da murcha, foram observadas necroses marginais nas folhas. Necroses deste tipo têm sido observadas em algumas plantas após exposição ao arsênio (Melo, 2006; Costa, 2007), inclusive em *P. vittata*, uma hiperacumuladora de arsênio (Li et al., 2006), mas não foram observadas em *Canavalia ensiformis* (Nascimento, 2007).

A biomassa de raízes, caules e folhas de *S. terebinthifolius* foi afetada pela presença do As na solução. A redução na biomassa pela presença de arsênio tem sido reportada em outras espécies de plantas (Li et al., 2006; Singh e Ma, 2006; Nascimento, 2007; Costa, 2007; Liu et al., 2008). Em *Triticum aestivum*, além de ter ocorrido forte alteração na biomassa, houve diminuição na absorção de fósforo, quando na presença de As (Liu et al., 2008) fato que também foi observado em *S. terebinthifolius*. Apesar da forte influência negativa no crescimento, com o aumento da concentração de As na solução, *S. terebinthifolius* permaneceu em exposição ao arsênio durante 47 dias. A

interferência negativa no crescimento, no caso de *S. terebinthifolius*, parece ter ocorrido em função da competição entre o fósforo e o arsênio, pelos canais de fósforo na raiz, uma vez que houve diminuição na absorção de fósforo, com o aumento do arsênio em solução. Isto influenciou diretamente o crescimento desta espécie, pois o arsênio substitui o fósforo em processos essenciais na planta. Em *Pteris ensiformis*, a toxicidade ao arsênio foi manifestada com diminuição na biomassa da planta e com sintomas de cloroses e necroses (Singh e Ma, 2006). No presente estudo, *S. terebinthifolius* apresentou visível redução de biomassa, mas não foram observados sintomas visuais nas folhas.

Uma resposta observada em tomates (Miteva, 2002) e também em *S. terebinthifolius* (Costa, 2007) foi o fato de que quando o arsênio era ministrado em pequenas doses, ocorria estímulo ao crescimento nas plantas. No presente estudo, esta resposta foi observada apenas em *B. verticillata*.

A sensibilidade de *C. cajan* ao arsênio (Melo, 2006; Felipe, 2007) foi confirmada. A dose mais baixa aplicada ($0,5 \text{ mg L}^{-1}\text{As}$) foi suficiente para causar danos a esta espécie e influenciar negativamente seu metabolismo. Uma outra leguminosa (*Phaseolus aureus* Roxb.) também apresentou redução na biomassa, após exposição ao arsênio que foi atribuída à indução de estresse oxidativo nas raízes (Singh et al., 2007). Estudos envolvendo atividade de enzimas antioxidativas, realizados em plantas de *C. cajan*, mostraram uma queda significativa na ação destas enzimas na raiz, após exposição ao arsênio (Felipe, 2007). A queda destas enzimas pode estar relacionada aos danos sofridos por esta espécie, provocados pelo estresse oxidativo, em função de injúrias no sistema radicular, o que, conseqüentemente, levou à redução na biomassa. Estes danos podem ter influenciado a absorção de água e nutrientes implicando na diminuição do teor de fósforo nas folhas. No presente trabalho, foram observadas injúrias no sistema radicular das plantas de *C. cajan*, tais como escurecimento, diminuição na emissão de raízes laterais e aspecto gelatinoso nestas raízes. Esta mesma resposta foi encontrada em raízes de *Canavalia ensiformis* (Nascimento, 2007).

Pouco arsênio foi encontrado no caule e folhas de *C. cajan* e os níveis de fósforo permaneceram semelhantes ao controle, na raiz e no caule, com o aumento do arsênio na solução devido, provavelmente, à manutenção do sistema de baixa afinidade de absorção de fósforo. Relatos da literatura

afirmam que quando há aumento do fósforo na raiz, com o aumento As, pode ocorrer ativação do sistema de alta afinidade de absorção de fósforo (Meharg e Macnair, 1992; Bleeker et al., 2003; Meharg et al., 1994). Esta tendência de aumento foi observada apenas em *B. verticillata* sendo necessários mais estudos para investigar se, realmente, está acontecendo a ativação do sistema de alta afinidade de absorção de fósforo em *B. verticillata*.

O arsênio afetou negativamente a área foliar de *S. terebinthifolius* e *C. cajan*, como relatado em outros trabalhos (Miteva, 1992; Costa, 2007; Nascimento, 2007). No caso de *C. cajan*, a menor área foliar foi reforçada pela intensa abscisão das folhas, evento que não foi observado em *S. terebinthifolius*.

Plantas tolerantes, que acumulam o elemento em seus tecidos e apresentam grande biomassa, podem ser utilizadas em estratégias efetivas de fitorremediação (Fayiga et al., 2004). Neste sentido, são essenciais estudos que retratem a capacidade de diferentes espécies vegetais absorverem o arsênio, retendo este elemento nas raízes ou acumulando-o na parte aérea da planta. Esta capacidade, avaliada por meio dos fatores de bioacumulação - FBA (MA et al., 2001; Tu et al., 2002; Huang et al., 2006) e de transferência - TF (Fayiga e Ma, 2005; Huang et al., 2006), deve ser relacionada com o acúmulo de biomassa das plantas estudadas. Apesar de ter apresentado um FT e FBA > 1 e o arsênio não ter afetado a biomassa e área foliar, plantas de *B. verticillata* apresentam pouco incremento de biomassa, por ser uma espécie de porte herbáceo. Entretanto, poderia ser utilizada em recuperação de áreas degradadas, possivelmente em início de regeneração, pois além de translocar arsênio para parte aérea é uma planta de fácil germinação, crescimento rápido e ocorre naturalmente em ambientes contaminados por arsênio. O fato é que são necessários mais estudos, modificando o tempo de exposição ao arsênio, para afirmar o real potencial destas plantas em processos de fitorremediação.

S. terebinthifolius não demonstrou capacidade para translocação do arsênio, uma vez que apresentou um $FT < 1$, e elevado FBA, indicando que esta espécie poderia reter este elemento em suas raízes; mas, teve sua biomassa influenciada negativamente com a exposição ao arsênio. Entretanto, *S. terebinthifolius* é uma planta de porte arbóreo e acumula este elemento em

suas raízes o que poderia fazer destas plantas um fitoestabilizador deste poluente.

C. cajan apresentou um $FT < 1$, assim como demonstrado para *S. terebinthifolius*, e a concentração máxima de arsênio encontrada nas raízes desta espécie foi semelhante à máxima concentração de As encontrada nas folhas de *B. verticillata*. Contudo, *C. cajan* apresentou um FBA elevado, também por ter a capacidade de reter o arsênio em suas raízes. O fato do FBA de *C. cajan* ter sido o maior, dentre as três espécies estudadas, deve-se às baixas dosagens de arsênio, às quais estas plantas foram submetidas; ressalta-se que a maior dose utilizada para esta espécie foi a menor dose utilizada para as demais espécies deste trabalho. E ainda, a elevada sensibilidade destas plantas ao arsênio poderia ser útil em processos de monitoramento ambiental, uma vez que acumulam o arsênio em suas raízes e apresentam sintomas de toxicidade na parte aérea, tais como amarelecimento e abscisão foliar, em doses bem baixas.

5 - CONCLUSÕES

-As plantas responderam diferentemente após exposição ao arsênio. *B. verticillata* translocou arsênio para parte aérea e altos teores de fósforo foram mantidos em todos os órgãos desta espécie. *S. terebinthifolius* e *C. cajan* apresentaram capacidade de reter arsênio nas raízes e a absorção de fósforo diminuiu com o aumento da concentração de arsênio.

- A realização de um estudo de especiação do arsênio, na raiz e na parte aérea de *B. verticillata*, seria interessante para investigar os mecanismos de tolerância destas plantas ao arsênio, uma vez que a maior parte do arsênio absorvido foi translocado para a parte aérea.

- *B. verticillata* poderia ser utilizada em recuperação de áreas degradadas, possivelmente em início de regeneração, pois além de translocar

arsênio para parte aérea é uma planta de fácil germinação, crescimento rápido e ocorre naturalmente em ambientes contaminados por arsênio.

- *S. terebinthifolius*, apesar de ter o seu crescimento fortemente afetado, permaneceu por um longo período de exposição ao As, sem que suas folhas apresentassem cloroses ou necroses e apresentou capacidade de reter o arsênio em suas raízes, podendo ser um fitoestabilizador deste poluente.

- A sensibilidade de *C. cajan* foi confirmada, uma vez que a menor dose de arsênio utilizada foi suficiente para influenciar negativamente o metabolismo desta espécie o que poderia ser útil em processos de biomonitoramento ambiental.

- São necessários mais estudos para afirmar o real potencial destas plantas, em processos de fitorremediação.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLEEKER, P. M.; HENK, W. J.; HAKVOORT, H. W. J.; BLIEK, M.; SOUER, E.; SCHAT H. 2006. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. **Plant Journal**, 45(1): 917-929.

BLEEKER, P. M.; SCHAT, H.; VOOIJS, R.; VERKLEIJ, J. A. C.; ERNST, W. H. O. 2003. Mechanisms of arsenate tolerance in *Cytisus striatus*. **New Phytologist**, 157(1): 33-38.

BRANCO NETO, M. L. C.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECZKO, N. G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. 2006. Avaliação do extrato hidroalcolico de aroreira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 21(1): 17-22.

BROOKS, R. R. 1998. Plants that hyperaccumulate heavy metals. Cambridge Univ. Press. 384p. *apud* MACNAIR, M. R. Book reviews. **Annals of Botany**, 82(1): 267-271.

CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; BURLÓ, J. F.; BURGOS-HERNKDEZ, A.; LOPEZ, E.; MATAIAX, A. 1997. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Scientia Horticulturae**, 71(1): 167-176.

CARMELO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A. A. S. 2002. Ontogeny and structure the pericarp of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 45(1): 73-79.

COSTA, A. C. 2007. **Bases fisiológicas da ação do arsênio em algumas espécies de cerrado**. Tese de doutoramento do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 78p.

DHANKHER, O. P.; Li, Y.; ROSEN, B. P.; SHI, J.; SALT, D.; SENECHOFF, J. F.; SASHTI, N. A.; MEAGHER, R. B. 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. **Nature Biotechnology**, 20(1): 1140–1145.

DHANKHER, O. P.; ROSEN, B. P.; MCKINNEY, E. C.; MEAGHER, R. B. 2006. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). **Environmental Sciences**, 103(14): 5413-5418.

DIVAN JUNIOR, A. M.; OLIVA, M. A.; FERRERIA, F. A. 2008. Dispersal pattern of airborne emissions from an aluminium smelter in Ouro Preto, Brazil, as expressed by foliar fluoride accumulation in eight plant species. **Ecological Indicators**, 8(1): 454-461.

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

FAYIGA, A. O.; MA, L. Q.; CAO, X.; RATHINASABAPATHI, B. 2004. Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Environmental Pollution**, 132(1): 289-296.

FAYIGA, A. O.; MA, L. Q. 2005. Arsenic uptake by two hyperaccumulator ferns from four arsenic contaminated soils. **Water, Air and Soil Pollution**, 168(1): 71-89.

FELIPE, R. T. A. 2007. **Crescimento e respostas antioxidativas em espécies leguminosas submetidas ao arsênio**. Tese de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 29p.

FRANCESCONI, K.; VISOOTTIVISETH, P.; SRIDOKCHAN, W.; GOESSLER, W. 2002. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Ptyrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soil. **The Science of the Total Environment**, 284(1): 27-35.

GONZAGA, M. I. S.; SANTOS, J. A. G.; MA, L. Q. 2006. Arsenic chemistry in the rhizosphere of *Pteris vittata* L. and *Nephrolepis exaltata* L. **Environmental Pollution**, 143(1): 254-260.

GRILL, E.; LOFFLER, S.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gammaglutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 86(1): 6838-42.

HARTLEY-WHITAKER, J.; AINSWORTH, G.; VOOIJS, R.; TEN-BOOKUM, W.; SCHAT, H.; MEHARG, A. A. 2001. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Plant Physiology**, 126(1): 299-306.

HARTLEY-WHITAKER, J.; WOODS, C.; MEHARG, A. A. 2002. Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*? **New Phytologist**, 155(1): 219-225.

HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, 347(1): 1-39.

HUANG, R. Q.; GAO, S. F.; WANG, W. L.; STAUNTON, S.; WANG, G. 2006. Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, Southeast China. **Science of the Total Environment**, 368(1): 531-541.

- KERTULIS, G. M.; MA, L. Q.; MACDONALD, G. E.; CHEN, R.; WINEFORDNER, J. D.; CAI, Y. 2005 Arsenic speciation and transport in *Pteris vittata* L. and the effects on phosphorus in the xylem sap. **Environmental and Experimental Botany** 54(1): 239-247
- LEI, M.; CHEN, T. B.; HUANG, Z. C. WANG, Y. D.; HUANG, Y. Y. 2008. Simultaneous compartmentalization of lead and arsenic in co-hyperaccumulator *Viola principis* H. de Boiss.: An application of SRXRF microprobe. **Chemosphere**, 72(1): 1491–1496.
- LI, W. X.; CHEN, T. B.; HUANG, Z. C.; LEI, M.; LIAO, X. Y. 2006. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Chemosphere**, 62(1): 803-809.
- LIU, Q.; HU, C.; TAN, Q.; SUN, X.; SU, J.; LIANG, Y. 2008 Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions. **Journal of Environmental Sciences**, 20(1): 326-331.
- LIU, Z.; SHEN, J.; CARBREY, J. M.; MUKHOPADHYAY, R.; AGRE, P.; ROSEN, P. B. 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99(9): 6053-6058.
- LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; FUHRMANN, M.; MA, L. Q.; MCGRATH, S. P. 2002. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. **New Phytologist**, 156(1): 195-203.
- MA, L. Q.; KOMAR, K. M.; TU, C.; ZHANG, W.; CAI, Y.; KENNELLEY, E. D. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature**, 409(1): 579.
- MANGABEIRA, P. A.; MIELK, M. S.; ARANTES, I.; DUTRUCH, L.; SILVA, D. C.; BARBIER, F.; ALMEIDA, A. A. F.; OLIVEIRA, A. H.; SEVERO, M. I. G.; LABEJOF, L.; ROCA, D. C.; ROSA, T. S.; SANTANA, K. B.; GAVRILOV, K. L.; GALLE, P.; LEVI-SETTI, R.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. 2006. Bioaccumulation of chromium in aquatic macrophyte *Borreria scabiosoides* Cham. e Schltdl. **Applied Surface Science**, 252(1): 6816-6819.
- MEHARG, A. A. 2002. Arsenic and old plants. **New Phytologist**, 156(1):1-8.
- MEHARG, A. A. 2003. Variation in arsenic accumulation – hyperaccumulation in ferns and their allies. **New Phytologist**, 157(1): 25-31.
- MEHARG, A. A.; BAILEY, J.; BREADMORE, K.; MACNAIR, M. R. 1994. Biomass allocation, phosphorus nutrition and vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in clones of Yorkshire Fog, *Holcus lanatus* L. (Poaceae) that differ in their phosphate uptake kinetics and tolerance to arsenate. **Plant and Soil**, 160(1):11-20.

MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, 154(1): 29–43.

MEHARG, A. A.; JARDINE, L. 2003. Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. **New Phytologist**, 157(1): 39-44.

MEHARG, A. A.; MACNAIR, M. R. 1992. Suppression of the high affinity phosphate uptake system a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. **Journal of Experimental Botany**, 43(1): 519-524.

MELO, R. F. 2006. **Seleção de espécies indicadores e fitorremediadoras de solos contaminados por arsênio**. Tese de doutoramento do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da Universidade Federal de Viçosa. 107p.

MELO JUNIOR, E. J. M.; RAPOSO, M. J.; LISBOA NETO, J. A.; DINIZ, M. F. A.; MARCELINO JUNIOR, C. A. C.; SANT'ANA, A. E. G. 2002. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**, 9(1): 109-116.

MITEVA, E. 2002. Accumulation and effect of arsenic on tomatoes. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 33(11): 1917-1926.

NASCIMENTO, K. J. T. 2007. **Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio**. Tese de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 36p.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; SILVA, M. V.; CAMPOS, N. V. C.; PORFIRIO, Z.; CAETANO, L. C. 2002. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. **Fitoterapia**, 73(1): 529-531.

PICKERING, I. J.; PRINCE, R. C.; GEORGE, M. J.; SMITH, R. D., GEORGE, G. N.; SALT, D. E. 2000. Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. **Plant Physiology**, 122(1): 1171-1177.

PROVAZI, M.; CAMARGO, L. H. G.; SANTOS, P. M.; GODOY, R. 2007. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 36(2): 328-334.

ROSEN, B. P. 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, 529(1): 86-92.

SALT, D. E.; PRINCE, R. C.; PICKERING, I. J. 2002. Chemical speciation of accumulated metals in plants: evidence from x-ray absorption spectroscopy. **Microchemical Journal**, 71(1): 255-259.

SINGH, N.; MA, L. Q. 2006. Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and non-

hyperaccumulator *Pteris ensiformis* L. **Environmental Pollution**, 141(1): 238-246.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K.; ARORA, K. 2007. Arsenic induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, 53(1): 65-73.

SOUZA, V. C. e LORENZI, H. 2008. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII**. 2^a ed. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum. 704p.

SRIVASTAVA, M.; MA, L. Q.; SANTOS, J.A. G. 2006. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. **Science and Total Environment**, 364(1): 24-31.

STOEVA, N.; BEROVA, M.; ZLATEV, Z. 2003/4. Physiological response of maize to arsenic contamination. **Biologia Plantarum**, 47(3): 449-452.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. 1995. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. UFRGS, Porto Alegre. 174p.

TU, C.; MA, L. Q.; BONDADA, B. 2002. Plant and environmental interactions: Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. **Journal of Environmental Quality**, 31(1): 1671-1675.

VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. 1999. Iridoids from *Borreria verticillata*. **Organic Letters**, 1(8): 1169-1171.

WANG, H. B.; WONG, M. H.; LAN, C. Y.; BAKER, A. J. M.; QIN, Y. R.; SHU, W. S.; CHEN, G. Z.; YE, Z. H. 2007. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China. **Environmental Pollution**, 145(1): 225-233.

ZHANG, W. H.; CAI, Y.; TU, C.; MA, L. Q. 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. **Science of Total Environment**, 300(1): 167-177.

ZHAO, F. J.; DUNHAM, S. J.; MACGRATH, S.P. 2002. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. **New Phytologist**, 156(1): 27-31.

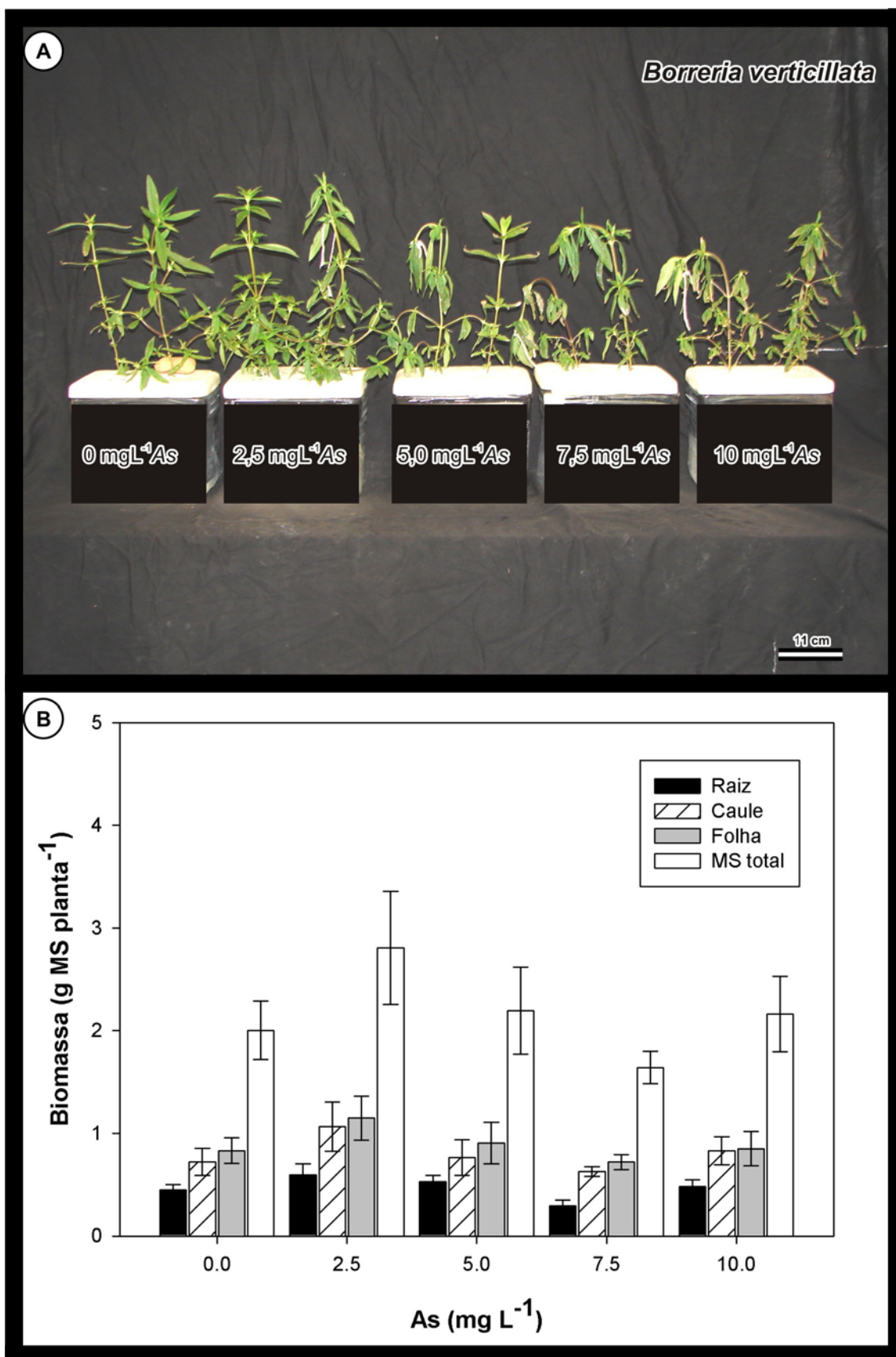


Figura 1. Efeitos do arsênio sobre plantas de *Borreria verticillata* cultivadas em solução nutritiva. **A:** Aspecto geral da planta 10 dias após cultivo. **B:** Variação na biomassa de raízes, caules, folhas e total. Os dados são médias e desvio padrão (n=4).

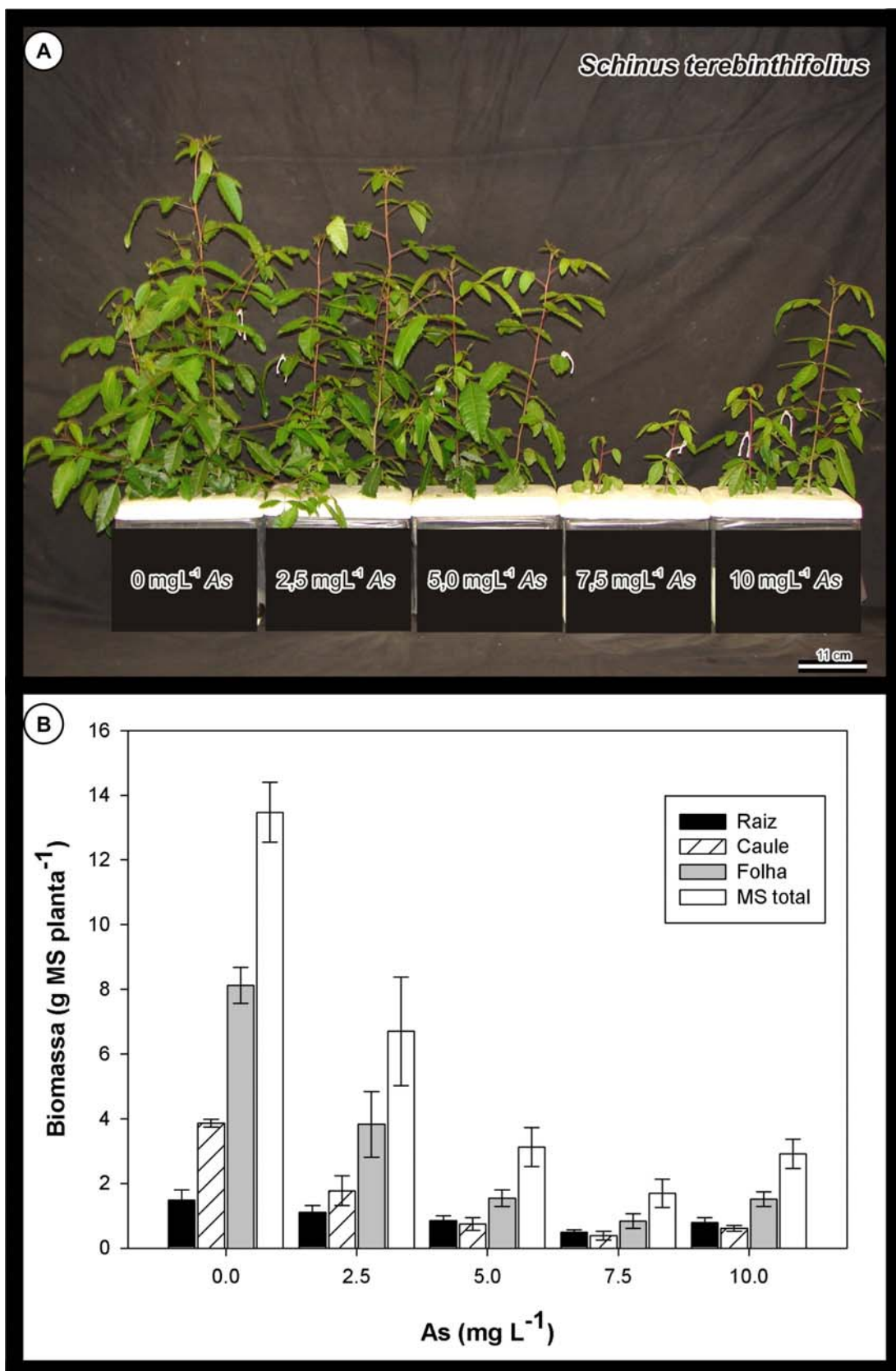


Figura 2. Efeitos do arsênio sobre plantas de *Schinus terebinthifolius* cultivadas em solução nutritiva. **A:** Aspecto geral da planta 47 dias após cultivo. **B:** Variação na biomassa de raízes, caules, folhas e total. Os dados são médias e desvio padrão (n=4).

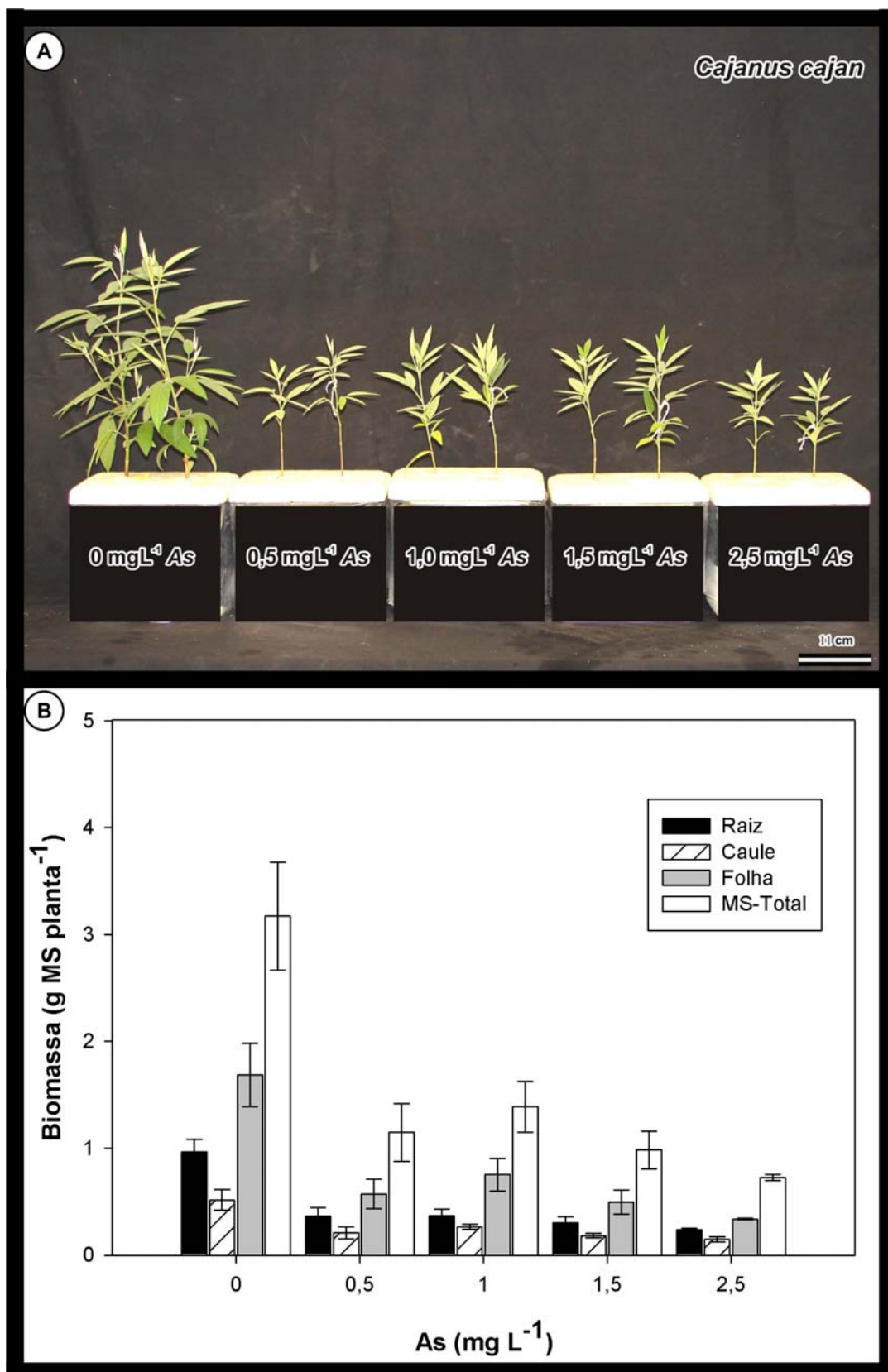


Figura 3. Efeitos do arsênio sobre plantas de *Cajanus cajan* cultivadas em solução nutritiva. **A:** Aspecto geral da planta 27 dias após cultivo. **B:** Variação na biomassa de raízes, caules, folhas e total. Os dados são médias e desvio padrão (n=4).

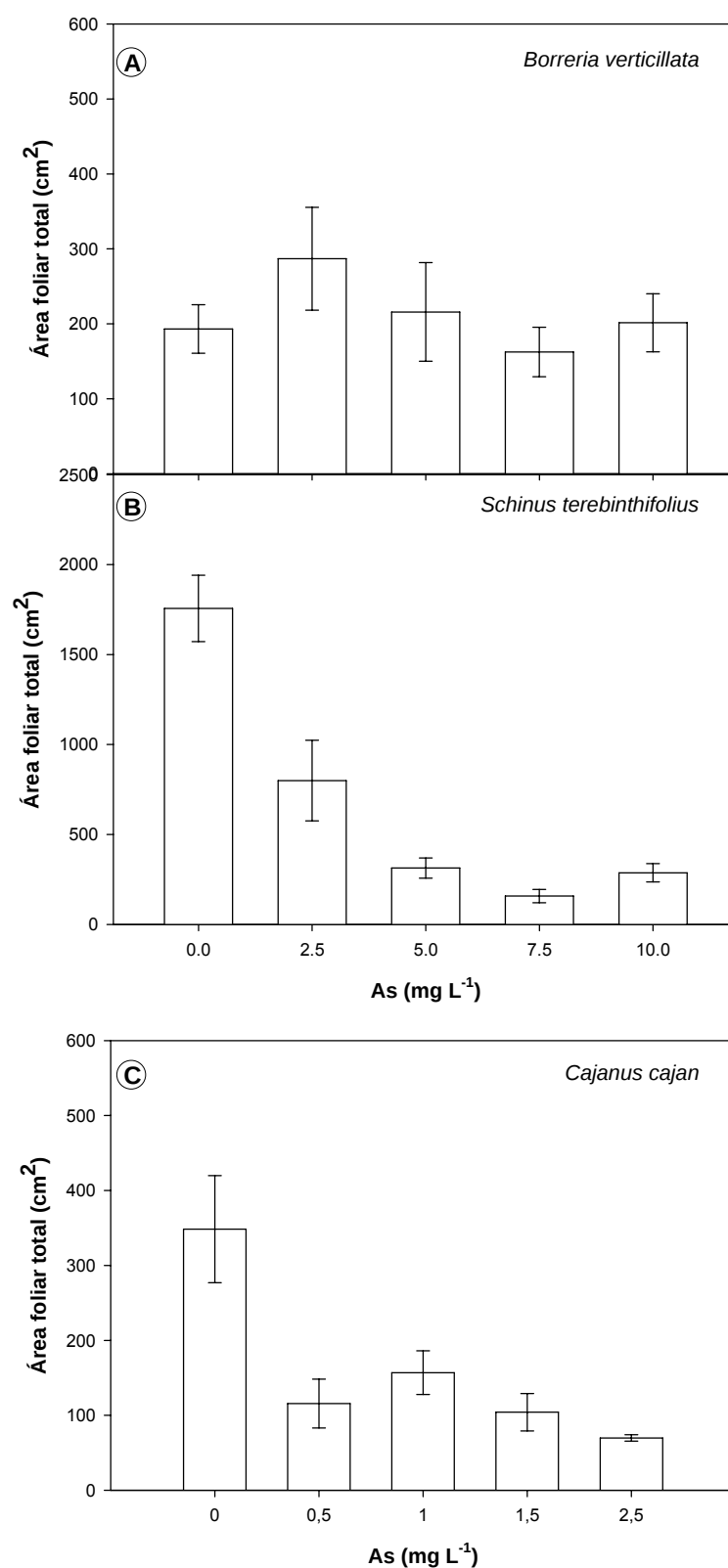


Figura 4. Efeitos do arsênio na área foliar total de plantas de *Borreria verticillata* (A); *Schinus terebinthifolius* (B) e *Cajanus cajan* (C) após cultivo em solução nutritiva. Os dados são médias e desvio padrão ($n=4$).

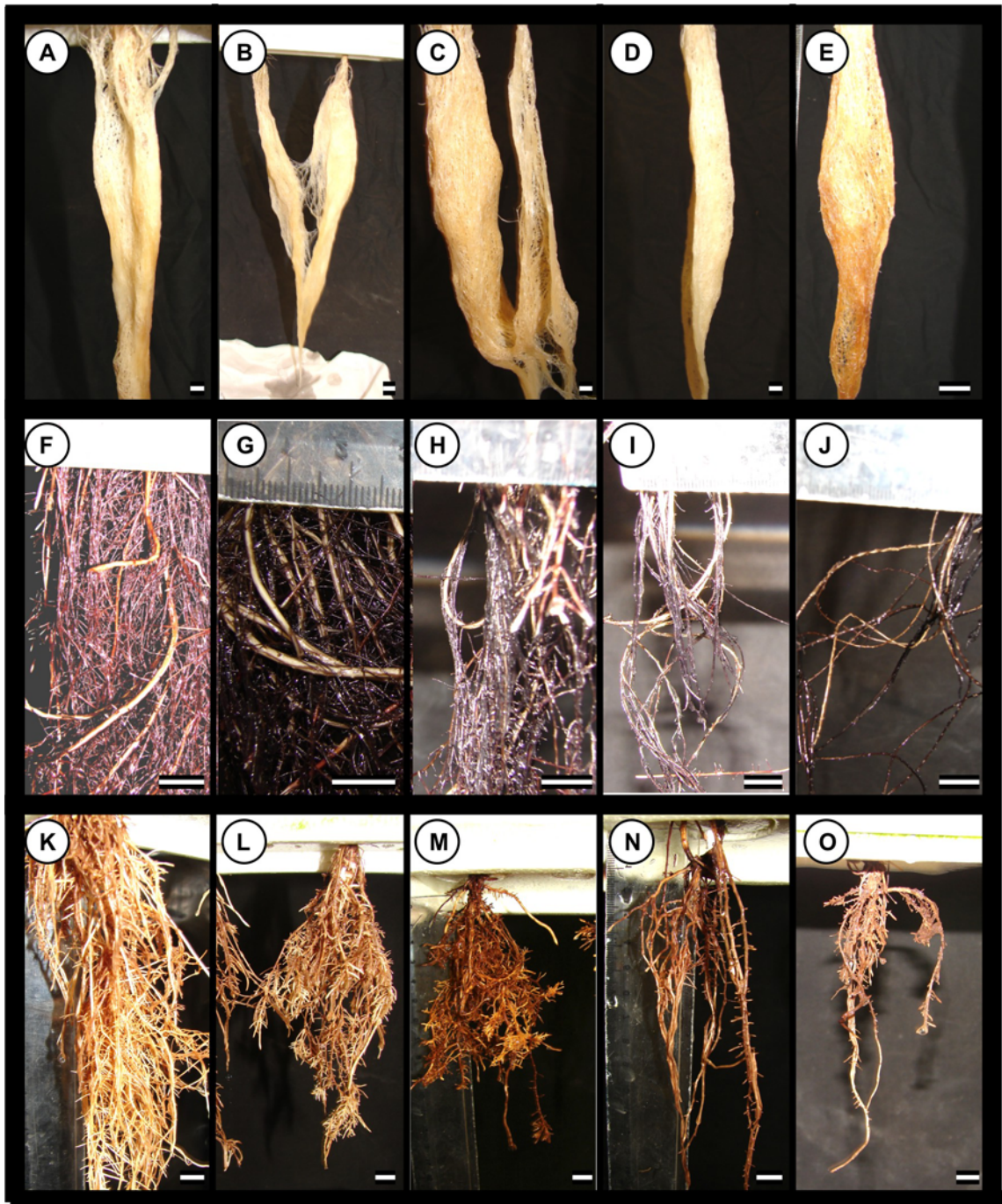


Figura 5. Efeitos do arsênio no sistema radicular de *Borreria verticillata* (A-E), *Schinus terebinthifolius* (F-J) e *Cajanus cajan* (K-O) após cultivo em solução nutritiva. A, F e K ($0 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); B e G ($2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); C e H ($5 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); D e I ($7,5 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); E e J ($10 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); L ($0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); M ($1 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); N ($1,5 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); O ($2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$). Barra=1cm

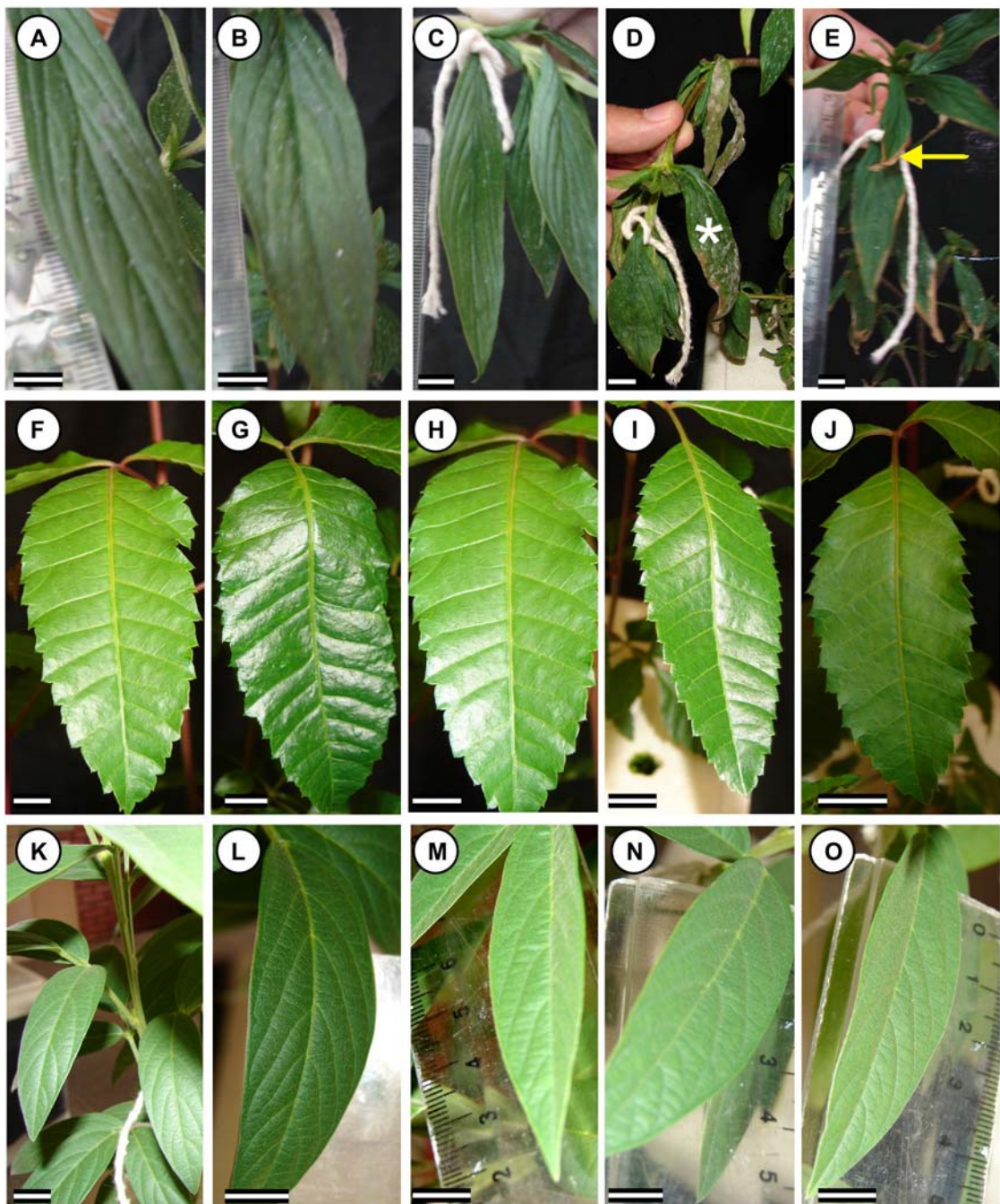


Figura 6. Efeitos do arsênio no aspecto geral das folhas de *Borreria verticillata* (A-E) e de folíolos de *Schinus terebinthifolius* (F-J) e *Cajanus cajan* (K-O) após cultivo em solução nutritiva. A, F e K (0 mg L⁻¹As); B e G (2,5 mg L⁻¹As); C e H (5 mg L⁻¹As); D e I (7,5 mg L⁻¹As); E e J (10 mg L⁻¹As); L (0,5 mg L⁻¹As); M (1mg L⁻¹As); N (1,5 mg L⁻¹As); O (2,5 mg L⁻¹As). Seta: necroses marginais; asterisco: murcha. Barra=1cm

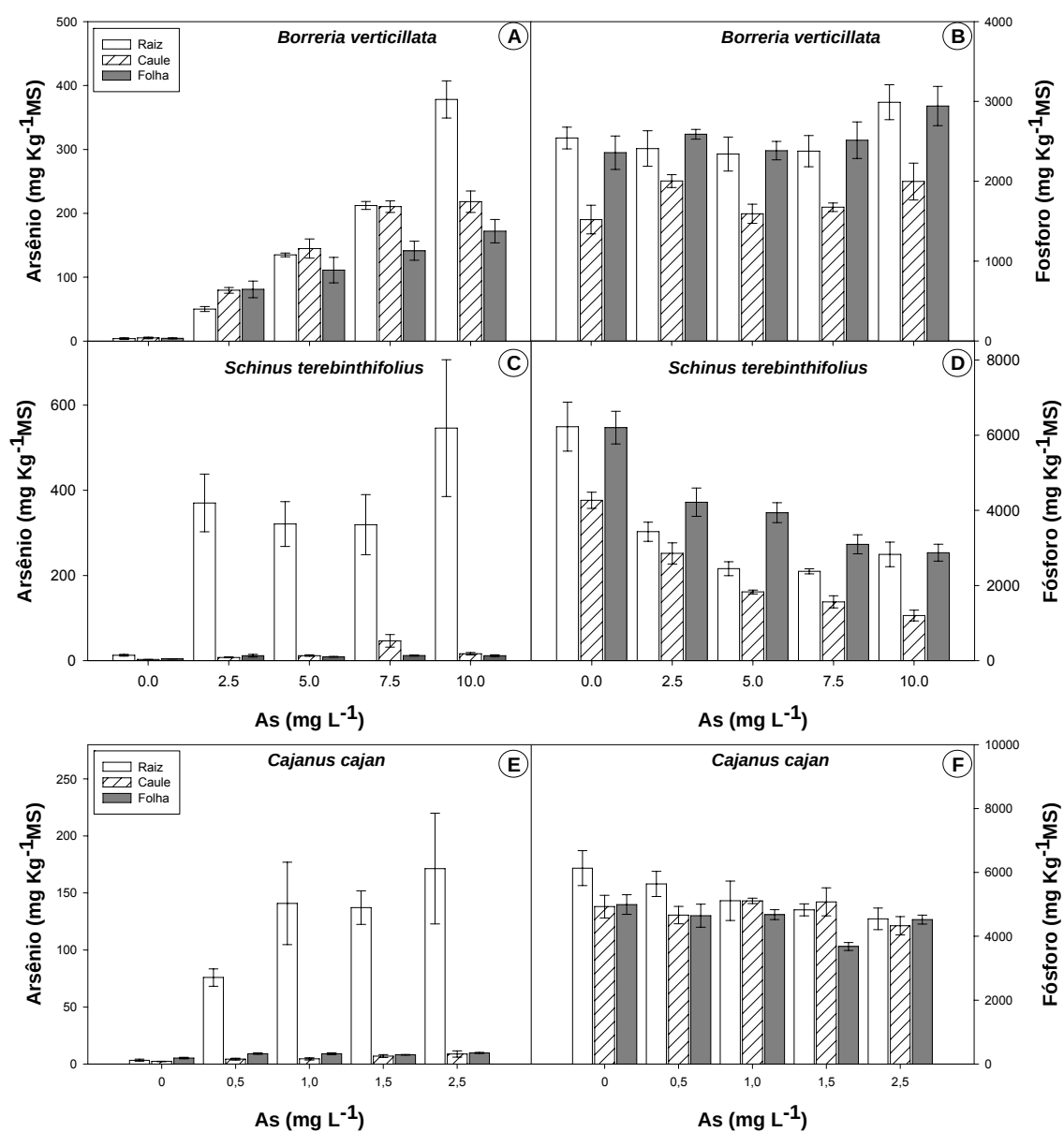


Figura 7. Efeitos do arsênio sobre o acúmulo deste elemento (A; C; E) e de fósforo (B; D; F) em raízes, caules e folhas de *Borreria verticillata* (A e B); *Schinus terebinthifolius* (C e D); *Cajanus cajan* (E e F) após cultivo em solução nutritiva. Os dados são médias e desvio padrão (n=4).

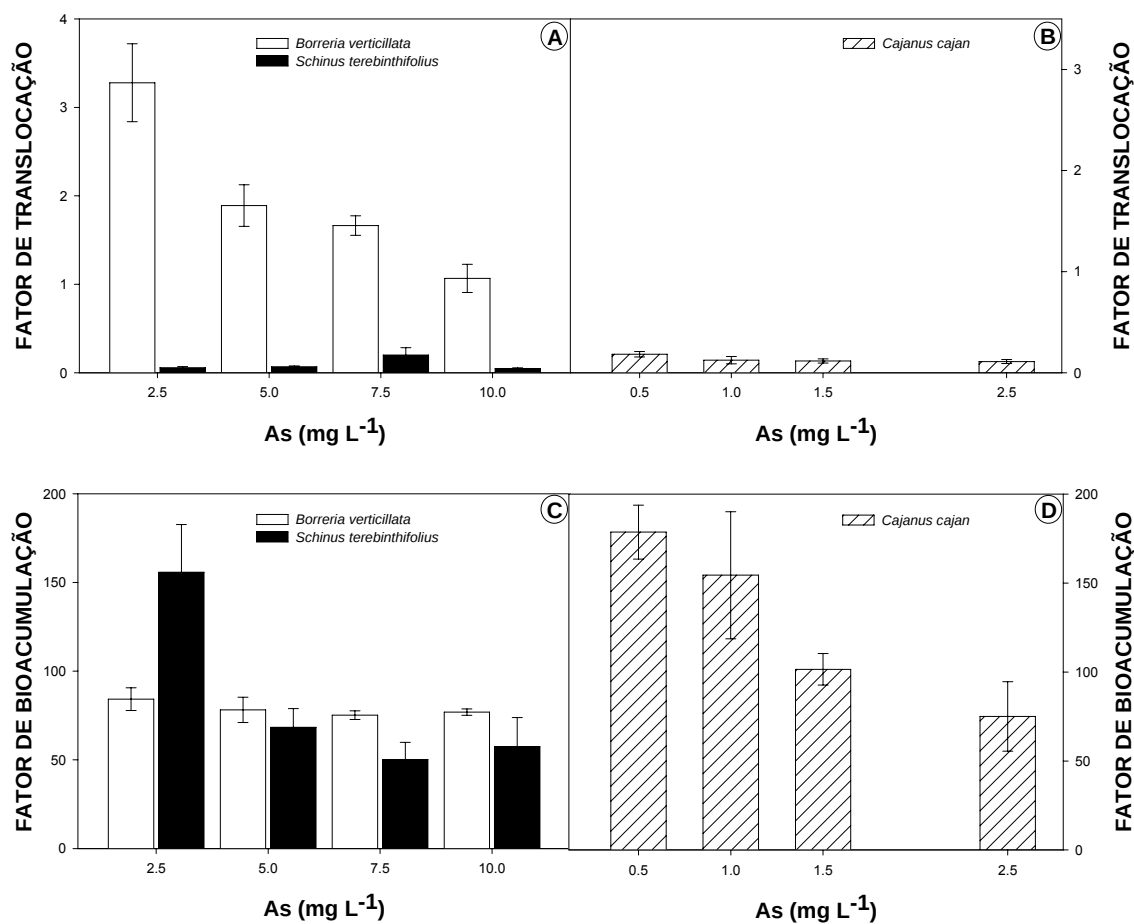


Figura 8. Fator de translocação (A e B) e fator de bioacumulação (C e D) de arsênio em *Borreria verticillata* e *Schinus terebinthifolius* (A e C); *Cajanus cajan* (B e D). Os dados são médias e desvio padrão (n=4).

CAPÍTULO II

Efeitos do arsênio na anatomia de raízes e folhas de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) e *Cajanus cajan* (Leguminosae)

Resumo: O objetivo deste trabalho foi caracterizar a anatomia de raízes e folhas de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) e *Cajanus cajan* (Leguminosae), após exposição ao arsênio. Foram verificadas alterações anatômicas, em microscopia de luz e eletrônica de varredura; a histolocalização de um possível sítio de acúmulo do arsênio nos tecidos das raízes e folhas e realizada análise morfométrica dos tecidos foliares. As plantas foram cultivadas em solução de Hoagland (meia força), e o arsênio foi aplicado na forma de arseniato de sódio. *S. terebinthifolius* e *B. verticillata* foram submetidas a concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10,0 mg L⁻¹As e, *C. cajan* foi submetida a: 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,5 mg L⁻¹As. O tempo de exposição foi: 47 dias (*S. terebinthifolius*), 27 dias (*C. cajan*) e 10 dias (*B. verticillata*). Amostras de raízes e folhas foram fixadas em Karnovsky e submetidas aos procedimentos usuais para microscopia de luz e eletrônica de varredura. A morfometria foliar foi feita com auxílio do programa AnatiQuanti. Para a detecção histoquímica do arsênio, as amostras foram fixadas em formalina a 10%, contendo 5% de CuSO₄.5H₂O, e, após inclusão em parafina, cortes (15 µm) foram desparafinizados e as lâminas foram montadas em Permunt. A observação e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio fotônico com sistema U-Photo. O arsênio alterou o formato das células, tanto nas folhas, quanto nas raízes, das três espécies estudadas. A retração do protoplasto, nas células do mesofilo, foi visível nas três espécies, bem como o aumento na quantidade dos compostos fenólicos. Sob microscopia de varredura, as folhas das três espécies mostraram alterações em resposta à exposição ao arsênio. Em *B. verticillata*, as células da face abaxial da folha apresentaram-se colapsadas sob a maior dosagem de As e foram mais afetadas que as da face adaxial. Os estômatos apresentaram aspecto colapsado. Em *S. terebinthifolius*, a diferenciação celular foi comprometida, uma vez que não foi possível distinguir os diferentes tipos celulares em algumas regiões da folha. Em *C. cajan*, os tricomas glandulares foram afetados, apresentando formato irregular e aspecto plasmolisado. As análises morfométricas das folhas mostraram que *B. verticillata* apresentou redução de 44,2% na espessura da epiderme da face abaxial, refletindo em redução de 16,8% na espessura do folíolo, enquanto em *S. terebinthifolius*, a redução do folíolo foi de 25,1%, sob a concentração de 10 mg L⁻¹As. Em *C. cajan*, a menor dose de arsênio foi suficiente para provocar redução de 37,3% na espessura do limbo. Nas raízes de *C. cajan* e de *S. terebinthifolius* ocorreu diferenciação atípica na formação de raiz lateral. Em *S. terebinthifolius*, além da alteração no formato do primórdio da raiz lateral, que se apresentou abaulado e arredondado, houve retenção da maioria destes primórdios no córtex; em *C. cajan* ocorreu uma diminuição na distância entre um primórdio e outro. A raiz de *B. verticillata* apresentou alterações sutis nas células do córtex e retração do protoplasto nas células do periciclo. Não foi possível estabelecer uma relação direta entre as alterações causadas pelo poluente e a sua concentração nos

órgãos, talvez devido à compartimentalização do poluente, principalmente, no vacúolo das células. O teste histoquímico para detecção de arsênio não se mostrou conclusivo, necessitando-se de outras análises para sua interpretação, não sendo também localizado um sítio de acúmulo de arsênio nas raízes e folhas das espécies estudadas. Não foi possível observar um marcador estrutural específico para o arsênio, uma vez que as alterações observadas foram também descritas para outros poluentes.

Palavras chave: histolocalização de arsênio, alterações anatômicas, análises morfométricas.

Summary: This study aimed to characterize the anatomy of roots and leaves of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) and *Cajanus cajan* (Leguminosae) following exposure to arsenic. Anatomical changes were observed, using a light and scanning electron microscope; the histolocalization of a possible site of accumulation of arsenic in the tissues of roots and leaves and morphometric analysis of leaf tissue were also examined. Plants were grown in Hoagland's solution (half strength) and arsenic was applied in the form of sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). *S. terebinthifolius* and *B. verticillata* were submitted to concentrations 0, 2,5, 5,0, 7,5, and 10,0 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$, and *C. cajan* to: 0, 0,5, 1,0, 1,5, and 2,5 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$. Exposure times were: 47 days (*S. terebinthifolius*), 27 days (*C. cajan*) and 10 days (*B. verticillata*). Roots and leaves samples were fixed in Karnovsky and underwent the usual procedures for light and scanning electron microscopy. The leaf morphometry was performed using the program AnatiQuanti. For the histochemistry detection of arsenic, the samples were fixed in formalin to 10%, with 5% of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, and after inclusion in paraffin, cuts ($15\mu\text{m}$) were dewaxed and the slides were mounted in Permount. Observations and photographic documentations were taken with a Photonic microscope with U-Photo system. Arsenic changed the format of the cells, both in leaves and in its roots, of the three species. Retraction of protoplast in the mesophyll cells was visible in the three species occurring also an increase in the amount of phenolic compounds. Under scanning microscopy, the leaves of three species showed changes in response to arsenic. In *B. verticillata*, the cells of the abaxial surface of the leaves presented collapsed at the largest dose of As being more affected than those of the adaxial surface. The stomata showed aspect collapsed. In *S. terebinthifolius*, cell differentiation could not be detected, since it was not possible to distinguish the cell types in some regions of the leaves. In *C. cajan*, the glandular trichomes were affected, showing irregular shape and a plasmolysed appearance. Morphometric analysis showed that the leaves *B. verticillata* exhibited a decrease of 44,2% in epidermis thickness in abaxial surface, reflecting a reduction of 16,8% in the foliole thickness, whereas in *S. terebinthifolius* reduction of the leaflet was 25,1%, under the concentration 10 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$. In *C. cajan*, the lowest dose of arsenic was enough to cause a reduction of 37,3% in leaf thickness. In roots of *C. cajan* and *S. terebinthifolius* an atypical lateral root differentiation occurred. In *S. terebinthifolius*, in addition to the change in the form of the lateral root primordia, which appeared convex and rounded, there was retention of most of these structures in the cortex; in *C. cajan* it was observed a decrease in the distance between the primordia. Roots of *B. verticillata* showed subtle changes in cells in the cortex and a retraction of

protoplast in pericycle cells. It was not possible to establish a direct relationship between changes caused by this arsenic and the its concentrations in the organs, perhaps due to compartmentalization of the element, mainly in the vacuole of the cells. The results of the histochemical test for arsenic was not conclusive, and further analysis is required for interpretation. A site of accumulation of arsenic in roots and leaves of the three species could not be determined. We were not able to observe a specific marker for structural arsenic, since similar affects were also described for other pollutants.

Key-word: histolocalization of arsenic, anatomic changes, morphometric analysis.

1 - INTRODUÇÃO

O estudo das alterações estruturais e ultra-estruturais provocadas por poluentes em plantas tem sido relevantes (Soikkeli, 1981). Simon et al. (2000) afirmaram que estudos anatômicos e ultraestruturais são apropriados para avaliar o efeito de metais em plantas, em áreas contaminadas, e recomendou estes estudos como ferramenta nos processos de biorremediação.

Diversos trabalhos têm retratado a importância da análise anatômica de folhas e raízes de plantas sob efeito de diversos poluentes, tais como flúor (Silva et al., 2000, 2006; Fornasiero, 2003; Sant'anna-Santos et al., 2006), cádmio (Vitória et al., 2006, 2003), zinco e níquel (Sresty et al., 1999), manganês (Blamey et al., 1986). A folha tem sido o órgão da planta mais amplamente estudado para avaliação do impacto causado por poluentes na vegetação (Fornasiero, 2003). Vários parâmetros foliares podem ser utilizados para qualificar e quantificar a influência de substâncias tóxicas sobre as plantas, tais como: ocorrência e aspectos das lesões foliares, percentagem de folhas injuriadas, área foliar necrosada, crescimento, taxa de fotossíntese e respiração, fluorescência da clorofila, conteúdo de pigmentos, quantidade de poluente(s) acumulado(s) no(s) tecido(s) foliar(es), alterações micromorfológicas, estruturais e ultra-estruturais (Domingos et al., 2004; Oliva e Figueiredo, 2005; Silva et al., 2005).

O arsênio é um poluente que, apesar de ocorrer naturalmente no ambiente, tem sua disponibilidade aumentada por ações antrópicas, principalmente por atividades mineradoras (Gontijo e Bittencourt, 2005). Diversos são os malefícios retratados em seres humanos após exposição ao arsênio (Barra et al., 2000) e, assim, estudos que minimizem o impacto deste elemento no ambiente tornam-se cada vez mais necessários. A fitorremediação surge como uma alternativa nos processos de descontaminação de ambientes (Salt et al., 1998) e exige o estudo de espécies capazes de tolerar elementos tóxicos, uma vez que esta técnica utiliza plantas capazes de descontaminar ambientes.

Poucos trabalhos têm retratado as respostas anatômicas de plantas sob efeito do arsênio e dentre elas, podem ser citadas: as alterações ultra-estruturais em cloroplastos de folhas maduras de *Pteris vitata* (Li et al., 2006); alterações no formato das células parenquimáticas do córtex da raiz e na diferenciação celular dos elementos de vaso de *Phaseolus aureus* (Singh et al., 2007); alterações nas células da epiderme, no formato das células do córtex e efeitos no xilema e no floema, nas raízes de *Pisum sativum* L. (Paivoke, 1983); e efeitos ultra-estruturais em rabanete (Simon et al., 2000).

No presente trabalho objetivou-se caracterizar anatomicamente, espécies expostas ao arsênio; identificar um possível marcador estrutural relacionado à tolerância ao arsênio; realizar análises histoquímicas com objetivo de verificar a existência de um sítio preferencial de acúmulo do arsênio nos tecidos das raízes e folhas e avaliar quantitativamente os efeitos do arsênio sobre a estrutura foliar.

O interesse em analisar anatomia de plantas das espécies que ocorrem em ambientes naturalmente contaminados por arsênio se deu no intuito de verificar se estas espécies apresentam alterações anatômicas em decorrência do arsênio e, ainda, comparar a anatomia destas plantas com a de uma espécie sensível.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material vegetal e condições de cultivo

As espécies utilizadas neste trabalho foram: *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) e *Borreria verticillata* (Rubiaceae) pelo fato de ocorrerem naturalmente em ambientes contaminados por arsênio e *Cajanus cajan* (Fabaceae) por ser descrita na literatura como uma espécie sensível ao arsênio.

As condições de cultivo foram as já descritas no item 2.2 do capítulo 1.

2.2 – Caracterização anatômica de raízes e folhas

Amostras de raízes e da lâmina foliar foram coletadas de plantas submetidas aos tratamentos segundo o item 2.2 (cap.1) e processadas para análise em microscopias de luz e eletrônica de varredura, visando a caracterização da anatomia e micromorfologia das espécies submetidas ao arsênio.

Em *S. terebinthifolius* foram analisadas as folhas entre o quarto e oitavo nós tomando como base o folíolo mediano das folhas. Em *B. verticillata* as folhas do segundo e terceiro nós foram analisadas. Em *C. cajan* o folíolo mediano de folhas, situadas entre o quarto e quinto nós, foram analisadas.

Para a microscopia de luz e análises morfométricas, as amostras foram fixadas em glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2, acrescido de cloreto de cálcio 5 mM (Karnovsky, 1965) e, em seguida, incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais (3 μ m de espessura) foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), corados em azul de Toluidina/pH=4,0 (O'Brian e McCully, 1981) e montados em Permount.

Para as análises micromorfométricas foram medidas as espessuras da epiderme, nas faces adaxial e abaxial das folhas, dos parênquimas paliçádico e lacunoso. A espessura do mesófilo foi obtida pelo somatório da espessura dos parênquimas paliçádico e lacunoso e a espessura do limbo foi resultado do somatório de todos os tecidos. As medições foram realizadas com o auxílio do software de análise de imagens AnatiQuanti (Aguiar et al., 2007). Foram selecionadas três lâminas de cada repetição e em cada lâmina foram selecionados aleatoriamente três cortes. Em cada corte foram realizadas 12 medições, sendo três na epiderme da face adaxial da folha, três na epiderme abaxial, três no parênquima paliçádico e três no parênquima lacunoso. Foram avaliadas as 4 repetições, 5 tratamentos e 3 espécies. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas

pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de significância. Para realização de todas as análises estatísticas foi utilizado o software SAEG (Euclides, 1983).

Para a detecção histoquímica do arsênio, amostras foliares e da raiz foram fixadas em formalina 10%, contendo 5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ conforme procedimento de Pearse (1972 modificado), por 5 dias e, em seguida, lavadas, durante 24 horas, em água destilada e submetidas à desidratação em série etílica. Após inclusão em parafina, cortes transversais ($15\text{ }\mu\text{m}$) foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e, após desparafinização, as lâminas foram montadas em Permount. Neste teste histoquímico o resultado positivo é de cor verde.

A observação e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo.

Para os estudos de micromorfologia foliar, em microscopia eletrônica de varredura, as amostras, após fixação em Karnovsky (1965) e desidratação em série etílica (Parsons, 1970), foram secas ao ponto crítico em CO_2 líquido em equipamento apropriado (modelo CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram afixadas em stubs, com fita dupla face, e submetidas à cobertura com ouro em metalizador (modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). O material vegetal foi analisado e documentado em microscópio eletrônico de varredura, com câmera digital acoplada (modelo LEO 1430UP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra) localizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3 - RESULTADOS

3.1 - Caracterização anatômica

3.1.1 - *Borreria verticillata*

A folha de *B. verticillata* é anfiestomática (Figura 1B) e apresenta epiderme unisseriada, com parede periclinal externa convexa e espessa (Figura 1A). O mesofilo é dorsiventral com duas camadas de parênquima paliçádico e duas a três de parênquima lacunoso com células lobadas (Figura 1A). Idioblastos contendo ráfides e conteúdo que se cora em roxo com azul de toluidina, provavelmente mucilagem, localizam-se no paliçádico e apresentam maior tamanho que as demais células deste tecido (Figura 1A, C e F). Na região mediana do mesofilo, entre os parênquimas paliçádico e o lacunoso, pode-se observar células alongadas, aparentemente um parênquima paravenal (Figura 1A). Os feixes vasculares são colaterais e na nervura mediana, o feixe é bem desenvolvido com bainha evidente, apresentando células que se coram de azul esverdeado com azul de toluidina (Figura 1H).

As alterações observadas nas folhas de *B. verticillata*, quando submetidas ao arsênio, foram: retração do protoplasto (Figura 1F), que provoca aglomeração dos cloroplastos; alteração na forma das células do parênquima paliçádico e do lacunoso que torna menos evidente a distinção entre os tecidos, aparentando desorganização do mesofilo (Figura 1C-F); idioblastos aparentemente mais aglomerados (Figura 1C); colapso na epiderme da face abaxial da folha, na dosagem mais elevada de As (Figura 1E); acúmulo de conteúdos, com uma coloração azul-esverdeada, nas células da bainha do feixe vascular, na nervura mediana, nas dosagens mais elevadas de arsênio (Figura 1H); redução de 44.2% na espessura da epiderme da face abaxial da folha, na concentração de 10 mg L⁻¹As em relação ao controle (Tabela 1 e Figura 1E). Esta redução acabou refletindo na espessura do folíolo como um todo, com redução em 16,8%, quando comparado ao controle (Tabela 1).

Em ambas as faces da folha, ao microscópio eletrônico de varredura, verificam-se tricomas tectores (Figura 2A e C), com parede ornamentada (Figura 2C), que nas plantas expostas ao As, aparecem colapsados com

formato completamente alterado pela perda da turgescência (Figura 2B, D e H). As células epidérmicas propriamente ditas apresentam-se colapsadas formando sulcos e alterando o relevo da epiderme como um todo (Figura 2B). As células da epiderme da face abaxial das folhas (Figura 2H) foram mais afetadas que as da face adaxial (Figura 2G), apresentando formato irregular e alterações no contorno da parede anticlinal, nas doses mais elevadas de As (Figura 2H). Os estômatos também apresentaram aspecto colapsado nos tratamentos com As (Figura 2F e H).

A raiz de *B. verticillata* apresenta anatomia típica de dicotiledôneas com a epiderme, o córtex e o cilindro vascular bem definidos (Figura 3A). A endoderme e o periciclo estão visíveis e cilindro vascular apresenta organização diarca, com dois pólos de protoxilema (Figura 3A). Macroscopicamente as raízes, após exposição ao arsênio, não mostraram alterações (Figura 5A-E/cap.1). As alterações anatômicas foram sutis na forma das células epidérmicas e do parênquima cortical (Figura 3B). Ocorreu, ainda, aumento no número de células apresentando conteúdo intensamente corado com o azul de toluidina, tanto na região do córtex, quanto no periciclo, provavelmente compostos fenólicos (Figura 3B). Foi observada a retração do protoplasto nas células do periciclo (Figura 3B).

3.1.2 - *Schinus terebinthifolius*

A folha *S. terebinthifolius* apresenta epiderme unisseriada com parede periclinal externa espessa (Figura 4A). Os estômatos estão presentes, em sua grande maioria, na epiderme da face abaxial da folha (Figura 4F). Porém, próximo à nervura mediana ocorrem também na face adaxial (Figura 4F), sendo, portanto, anfi-hipoestomática. O mesofilo é dorsiventral com três camadas de parênquima paliçádico e duas a cinco camadas de parênquima lacunoso (Figura 4A). Idioblastos contendo drusas podem ser observados no mesofilo (Figura 4A). A nervura mediana apresenta de dois a quatro feixes vasculares colaterais e canais secretores, bem desenvolvidos, associados ao floema (Figura 4F).

Apesar de não terem sido observadas necroses ou cloroses, na folha desta espécie, após exposição ao As, foram observadas alterações drásticas na anatomia deste órgão. Foi possível observar retração do protoplasto (Figura 4C), alteração no formato das células do mesofilo (Figura 4E) e alteração nos cloroplastos, que passaram a ser mais arredondados (Figura 4D). Foi possível observar, ainda, alterações no formato das células dos canais secretores, que apresentaram aspecto definido no controle (Figura 4G) e aspecto distorcido, e com retração de protoplastos, nas células das plantas que foram submetidas ao As (Figura 4H). Verificou-se maior quantidade de células com conteúdos mais intensamente corados pelo azul de toluidina no mesofilo (Figura 4D e E) e no entorno do canal (Figura 4H), provavelmente devido a um aumento de compostos fenólicos. A análise morfométrica mostrou que todos os tecidos, das plantas expostas ao As, apresentaram menor espessura que o do tratamento controle, com exceção do parênquima lacunoso (Tabela 2 e Figura 4B-E). A dose mais baixa de As aplicada foi suficiente para reduzir em 20,3% a espessura do folíolo, que se manteve nas demais concentrações de As.

A folha de *S. terebinthifolius* apresenta uma cutícula com ornamentação estriada e presença de estômatos (Figura 5B), além da presença de tricomas tectores e glandulares (Figura 5A). Após exposição ao As, as plantas sofreram fortes alterações (Figura 5C-H) em comparação ao controle (Figura 5A e B). As células da epiderme ficaram com aspecto retorcido e com sulcos entre elas (Figura 5C, D, F e H). A arquitetura dos estômatos ficou comprometida, com as células guardas colapsadas, com ruptura das cristas estomáticas e aspecto retorcido das células subsidiárias (Figura 5D e F). Os tricomas também foram afetados (Figura 5C e E). Próximo à nervura foi observado uma extensa área com células plasmolisadas (Figura 5G e H), na qual não foi possível distinguir os limites das paredes celulares.

A raiz possui uma organização típica de dicotiledônea com uma epiderme, endoderme, delimitando internamente o córtex parenquimático, e o cilindro vascular com organização tetrarca (Figura 6A) e periciclo nítido (Figura 6C). Também é possível observar os canais secretores associados ao floema (Figura 6A, C, E e F).

Após exposição ao As foi possível observar alterações visíveis nas raízes, pois houve uma menor emissão de raízes laterais e as raízes laterais se

desenvolveram pouco (Figura 5G-J/cap1). Anatomicamente, além de ter ocorrido deformação na formação do primórdio da raiz lateral, com formato abaulado e arredondado (Figura 6D), os primórdios foram formados bem próximos uns dos outros e ficaram retidos no córtex (Figura 12D), quando comparados ao desenvolvimento típico do controle (Figura 6B, 12B). Foi possível observar, ainda, que a endoderme apresentou conteúdo que se cora com o azul de toluidina (Figura 6C, E e F). A diferenciação dos elementos de vaso do xilema parece ter sido também alterada, pois a parede apresenta-se fina, com menor lignificação, em função de um padrão de lignificação atípico destas células (Figura 6F). Ocorreu também aumento no número de células fortemente coradas pela toluidina, principalmente no cilindro vascular (Figura 6E e F).

3.1.3 - *Cajanus cajan*

A folha de *C. cajan* apresenta uma epiderme unisseriada, com tricomas tectores e glandulares e com estômatos presentes, em ambas as faces sendo, portanto, uma folha anfiestomática (Figura 7A). O mesofilo é dorsiventral, com duas camadas de parênquima paliçádico e duas a quatro camadas de parênquima lacunoso. O feixe vascular é colateral com uma bainha cristalífera bem desenvolvida e extensão de bainha (Figura 7A). A nervura mediana apresenta um feixe colateral bem desenvolvido e ilhota de colênquima, voltada para a face adaxial e abaxial da folha (Figura 7F).

Os tricomas glandulares apresentaram células com aspecto plasmolisado nas plantas expostas ao As (Figura 7C, D e E), bem diferente do aspecto do controle (Figura 7A). A retração do protoplasto também foi evidente nas células das folhas, nesta espécie (Figura 7E-detelhe). A organização do mesofilo foi alterada, pois o formato das células foi modificado (Figura 7B-E) e ocorreu um aumento na quantidade dos compostos fenólicos, principalmente nas células da região mediana do mesofilo (Figura 7B-E). Além disso, foi possível observar redução na espessura dos tecidos de uma maneira geral, resultando na redução da espessura do mesofilo (Figura 7B-E e Tabela 3). A concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ As já foi suficiente para reduzir a espessura de

todos os tecidos, sendo que, a espessura do folíolo reduziu 37,26% em relação ao controle (Tabela 3 e Figura 7B-E).

Em microscopia eletrônica de varredura, nas plantas controle, foi possível observar os tricomas glandulares, com formato globoso (Figura 8C), e os tricomas tectores (Figura 8E). Após exposição ao As, observaram-se células com formato retorcido e plasmolisado (Figura 8D e F) e estômatos também alterados. No controle as células guardas e subsidiárias apresentam-se túrgidas (Figura 8A) e, nos demais tratamentos os estômatos apresentam alterações, com plasmólise nas células guarda e, principalmente, nas células subsidiárias (Figura 8B).

A raiz apresenta anatomia típica de dicotiledônea apresentando uma epiderme, exoderme e endoderme delimitando o córtex e o estelo com organização tetraarca (Figura 9C). Após exposição ao As foi possível verificar alterações visíveis na morfologia externa das raízes como redução no tamanho e no espaçamento das raízes laterais, aspecto gelatinoso e mudança na coloração destas raízes (Figura 5L-O/cap1). Anatomicamente, foi possível observar primórdios de raízes laterais bem próximos (Figura 9D). Foram observadas, ainda, alterações na região do córtex, com retração do protoplasto de algumas células e desorganização de uma maneira geral (Figura 9B, C e E), no cilindro vascular (Figura 9F) e no córtex (Figura 9B).

3.2 - Histoquímica

3.2.1 - *Borreria verticillata*

Em *B. verticillata*, as células da epiderme das folhas, que foram submetidas a diferentes concentrações de arsênio, apresentaram coloração esverdeada, após terem sido submetidas ao teste histoquímico para detecção de arsênio (Figuras 10B, C e D). A reação foi observada tanto na parede das células, quanto no protoplasto, sendo mais evidente na epiderme da face adaxial da folha. No mesofilo também foi observada esta coloração, tanto no parênquima paliçádico, quanto no lacunoso, sem apresentar um sítio preferencial (Figura 10B, C e D). Esta coloração não foi observada nas células do tratamento controle (Figura 10A). Conteúdos que se coraram de amarelo

claro foram observados no parênquima paliádico e nas células situadas na região mediana do mesofilo do controle (Figura 10A); nas plantas submetidas ao arsênio, estas mesmas regiões apresentam uma tonalidade mais forte de amarelo-acastanhado a marrom (Figura 10B, C e D).

Nas raízes de *B. verticillata*, submetidas ao As, foi possível observar uma coloração esverdeada nas células do córtex, tanto no citoplasma quanto na parede (Figuras 10F-H). Esta coloração não foi observada nas células do córtex das plantas do tratamento controle (Figura 10E). Entretanto foi possível verificar células do córtex e do cilindro vascular com coloração amarelo-acastanhado, tanto no controle quanto nas raízes submetidas ao arsênio (Figura 10 E-H). Sendo que, em todos os tratamentos, esta reação foi de amarelo-acastanhada a marrom.

3.2.2 - *Schinus terebinthifolius*

Em *S. terebinthifolius*, uma coloração esverdeada foi observada nas células da epiderme e em toda a região do mesofilo das folhas de todos os tratamentos, tanto no controle, quanto nas folhas que foram submetidas a diferentes concentrações de arsênio (Figuras 11A-F). Esta coloração foi mais forte na epiderme, em ambas as faces da folha (Figura 11B). Conteúdos que se coraram de amarelo claro foram observados no mesofilo, principalmente, no parênquima paliádico (Figura 11A-F). A coloração se tornou mais forte, passando de amarela até marrom, à medida que a concentração de arsênio na solução aumentava (Figura 11C, D e F). Na nervura mediana, estas colorações foram evidentes em torno do canal secretor (Figura 11F)

Nas raízes, foi possível observar uma coloração esverdeada nas células do córtex das plantas tratadas com arsênio (Figuras 12E e F), não observada nas células do córtex das plantas do tratamento controle (Figura 12A). Entretanto, a coloração que predominou na epiderme, nas células do córtex e no cilindro vascular foi de amarelo-acastanhada a marrom, tanto no controle, quanto nos tratamentos com arsênio (Figura 12A, E e F). Em secção longitudinal foi possível observar uma coloração mais intensa, nas raízes laterais das plantas que foram expostas ao arsênio (Figura 12D), em relação às

plantas do tratamento controle (Figura 12B). Notou-se também, que em presença de arsênio ocorreu maior número de primórdios de raízes laterais, próximos uns aos outros (Figura 12C e D), em relação ao controle (Figura 12B).

3.2.3 - *Cajanus cajan*

Em *C. cajan*, uma coloração esverdeada foi observada nos tricomas glandulares, presentes na epiderme, tanto na face adaxial, quanto na face abaxial em todos os tratamentos, incluindo controle (Figuras 13A, B, C e D). Conteúdos que se coraram de marrom foram observados no mesofilo, principalmente, no parênquima paliçádico (Figura 13A, B e D) e nas células na região mediana do mesofilo (Figura 13C).

Nas raízes, a coloração que predominou na epiderme, nas células do córtex e no cilindro vascular foi de amarelo-acastanhada a marrom, tanto no controle, quanto nas raízes que foram submetidas ao tratamento com arsênio (Figura 13E e F), não se observando a coloração esverdeada típica para arsênio.

4 - DISCUSSÃO

Alterações anatômicas, principalmente nas folhas, das três espécies estudadas, foram observadas após exposição ao arsênio, mesmo quando não foram observadas alterações macroscópicas. Estes resultados reforçam a importância dos estudos anatômicos, para o diagnóstico precoce da injúria e para o entendimento dos mecanismos de fitotoxicidade (Soikkeli, 1981).

As alterações observadas na organização do mesofilo e na forma das células, nas folhas das três espécies estudadas, não estão diretamente relacionadas ao aumento da concentração deste elemento no órgão, ao contrário do observado em resposta a outros poluentes (Sant'Anna-Santos, 2008; Silva et al., 2005). É importante ressaltar que apenas plantas de *B. verticillata* translocaram grande quantidade de arsênio para a folha; em *S. terebinthifolius* e *C. cajan* o arsênio ficou, em sua maior parte, nas raízes. Portanto, o efeito do arsênio nas folhas, pelo menos nestas duas espécies, foi indireto. As três espécies apresentaram altas concentrações de arsênio nas raízes mas, na maioria das vezes, as alterações ocorridas neste órgão foram sutis. Assim, o acúmulo de arsênio neste órgão, não determinou o aparecimento de alterações relevantes e não foi possível estabelecer uma relação direta entre as alterações causadas por este poluente, com sua concentração nos órgãos. Provavelmente o arsênio seja compartimentalizado, principalmente no vacúolo das células da raiz, complexado como arsenito livre ou como conjugado com glutationas ou outros tióis (Hartley-Whitaker et al., 2001).

Os cloroplastos em *B. verticillata* e *C. cajan* ficaram mais aglomerados, provavelmente em consequência da retração do protoplasto. Mas, em *S. terebinthifolius*, as alterações foram no formato dos cloroplastos, que passaram a ser mais arredondados, o que sugere a necessidade de uma análise ultra-estrutural. Alguns trabalhos têm mostrado alterações ultra-estruturais em cloroplastos após exposição ao arsênio, tais como: arredondamento da organela, acúmulo de amido e plastoglóbulos, completa desorganização destas organelas inclusive com ruptura do sistema de membranas (Li et al., 2006; Simola, 1977). Estas alterações também foram descritas para outros poluentes

(Vitória et al., 2003, 2006; Choudhury e Panda, 2004; Sant'Anna-Santos et al., 2008) e indicam que o cloroplasto é uma organela bastante sensível.

Uma outra característica presente nas três espécies foi o acúmulo de compostos fenólicos evidenciados pela coloração esverdeada com azul de toluidina. Entretanto, este resultado não é específico para o arsênio, uma vez que foi relatado como resposta das plantas não só a outros poluentes (Sant'Anna-Santos, 2008; Silva et al., 2005) mas, também, a vários fatores causadores de estresse (Taiz e Zeiger, 1998).

Os idioblastos presentes no mesofilo de *B. verticillata* apresentaram-se aglomerados, após exposição ao As. Muitas vezes, o maior número de determinadas estruturas está correlacionada à redução na área foliar (Dickison, 2000). Entretanto, no caso de *B. verticillata* não foi verificada alteração na área foliar em resposta ao arsênio. É interessante ressaltar que estes idioblastos apresentam-se azulados após coloração com azul de toluidina, sugerindo a natureza péctica do seu conteúdo, provavelmente mucilagem. Esta substância auxilia na retenção de água e na manutenção do potencial hídrico da folha. Apesar de não ter sido feita a quantificação do número de idioblastos, as observações qualitativas sugerem o aumento destes idioblastos, em resposta ao arsênio. Estudos posteriores para verificar a natureza química destas substâncias e realizar a quantificação destas células serão necessários para esclarecer as alterações anatômicas que antecederem as macroscópicas.

Ao microscópio eletrônico de varredura, alterações na epiderme das três espécies estudadas foram verificadas em resposta ao arsênio, especialmente nos tricomas e estômatos. Os tricomas, glandulares e tectores, e os estômatos apresentaram células com formato retorcido e aspecto plasmolisado nas três espécies estudadas. Em *C. cajan*, apesar de pouco arsênio ter sido translocado para parte aérea, os estômatos também foram alterados, principalmente as células subsidiárias. O aspecto retorcido e plasmolisado pode ser consequência do estresse hídrico provocado pela ação indireta do arsênio, pois muitas destas alterações foram também verificadas em plantas submetidas a estresse hídrico (Souza et al., 1999). Em *B. verticillata*, as alterações nos estômatos podem ter sido ocasionadas não apenas pelo efeito indireto deste poluente, mas também pela presença do arsênio nas folhas, pois grande parte do arsênio absorvido foi translocado para parte aérea e o arsênio pode

substituir o fósforo atuando como um análogo não funcional, comprometendo o metabolismo da planta (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002).

As análises morfométricas mostraram uma redução na espessura dos tecidos nas três espécies estudadas, sendo que em *B. verticillata*, esta redução foi menor. O fato é que apenas *B. verticillata* translocou este poluente em grandes quantidades para suas folhas, mas esta não parece ser a causa direta da redução dos tecidos, uma vez que em *S. terebinthifolius* e *C. cajan* esta translocação foi inexpressiva e os tecidos sofreram reduções mais severas. Isto poderia ser explicado, mais uma vez, por um efeito indireto do arsênio diferente do que aconteceu em outros poluentes, como o flúor, por exemplo, em que a presença do poluente promoveu danos diretos na estrutura da folha e na diferenciação dos tecidos e em consequência na sua espessura (Sant'Anna-Santos, 2008).

O estresse hídrico indireto pode ser atribuído aos efeitos do arsênio sobre o sistema radicular, pois em raízes de *S. terebinthifolius* e *C. cajan*, a emissão e o desenvolvimento das raízes laterais foram afetados. Em *C. cajan*, os primórdios radiculares foram formados bem próximos uns dos outros, provavelmente porque o crescimento da raiz principal foi reduzido e as raízes laterais foram formadas próximas umas das outras, diferente do observado no controle, onde o desenvolvimento foi típico. Entretanto, em *S. terebinthifolius* não era possível visualizar as raízes laterais em visão macroscópica e a anatomia vegetal revelou que a maioria destes primórdios ficou retido no córtex e não se desenvolveu.

As alterações morfológicas em resposta ao arsênio, provavelmente, comprometeram o funcionamento das raízes e interferiram na absorção e translocação de água e nutrientes para a parte aérea (Carbonell-Barrachina, et al., 1997). Respostas semelhantes a estas foram observadas em raízes de plantas expostas ao alumínio que afetou a emergência das raízes laterais, contudo, a diferenciação e a penetração destes primórdios no cortex não foram afetadas (Ferreira, 1983). No caso do alumínio, parece que o crescimento é influenciado pela interferência deste íon nos processos de alongamento e divisão celular (Ciamporova, 2002), portanto, estudos que possam esclarecer a interferência do arsênio no crescimento das raízes das plantas são necessários.

As alterações na forma e na organização das células parenquimáticas do córtex radicular ocorridas nas plantas de *S. terebinthifolius* e *C. cajan* foi semelhante ao observado em *Pisum sativum* L. (Paivoke, 1983) e em *Phaseolus aureus* Roxb (Singh et al., 2007), após exposição a diferentes concentrações de arsênio. Em *S. terebinthifolius*, foi possível observar que na endoderme as células foram intensamente coradas com azul de toluidina, provavelmente, devido ao acúmulo de compostos fenólicos.

Diversos estudos foram feitos, na tentativa de localizar sítios preferenciais de acúmulo de metais em plantas (Kramer et al., 1996; Kupper et al., 1999, 2000, 2001; Frey et al., 2000; Lombi et al., 2002; Robinson et al., 2003; Cosio et al., 2005; MacNear et al., 2005; Li et al., 2005; Lei et al., 2008; Chen et al., 2003, 2005). A maioria dos estudos de distribuição celular de metais, tais como o Zn, Cd, As e Ni mostraram que, estes elementos estavam localizados na epiderme (Kramer et al., 1996; Kupper et al., 1999, 2001; Frey et al., 2000; Lombi et al., 2002; Robinson et al., 2003; Cosio et al., 2005; MacNear et al., 2005). A distribuição e a compartimentalização de arsênio em tricomas foram demonstradas (Zhao et al., 2000; Li et al., 2005).

Os resultados dos testes histoquímicos, realizados no presente estudo, mostraram que *B. verticillata*, aparentemente, apresentou uma reação positiva na epiderme, pois foi observada a presença de um conteúdo de aspecto esverdeado, característica da reação positiva para este teste, de acordo com Pearse (1972). Contudo, um estudo realizado por Lei et al. (2008) retrata que, em *Viola principis* H. de Boiss., a presença de As e Pb, foi mais evidente no mesofilo e na bainha do feixe do que na epiderme, e o parênquima paliçádico apresentou níveis mais elevados destes elementos do que o parênquima lacunoso. Um resultado semelhante ao de Lei et al. (2008) foi obtido por Chen et al. (2003), que verificaram altas concentrações de As no mesofilo de *Pteris nervosa*, mais precisamente no parênquima paliçádico. Em *B. verticillata*, uma possível reação positiva na região do parênquima paliçádico foi observada, pois este tecido mostrou uma coloração esverdeada. Entretanto, a metodologia, para detecção de As nos tecidos, utilizada pelos autores citados anteriormente, difere da utilizada neste trabalho.

No presente trabalho, o teste histoquímico utilizando formalina com sulfato de cobre, aparentemente, evidenciou uma reação positiva para o As

tanto na epiderme, quanto no parênquima paliçádico, e nos demais tecidos de uma maneira geral, não deixando claro um sítio de localização preferencial. Entretanto, o teste mostrou-se inespecífico e com baixa confiabilidade, pois as folhas de *C. cajan* e de *S. terebinthifolius* também mostraram reação positiva, com várias regiões que se coraram de verde, mas pouco arsênio foi translocado para a parte aérea, que pudesse ser detectado por este teste. Estas conclusões só puderam ser feitas contrastando os resultados de quantificação de As (cap1), com as análises histoquímicas. Isto demonstra a ineficiência deste teste, uma vez que ele não é conclusivo per si, dependendo de outras análises para realizar as inferências.

A coloração observada após a aplicação do teste para arsênio pode ser confundida com outros conteúdos como, por exemplo, compostos fenólicos, encontrados naturalmente em muitas espécies e também observados na maioria das plantas em resposta a diferentes tipos de estresse (Sant'Anna-Santos et al., 2006; Silva et al., 2005). A hipótese de mascaramento do resultado positivo do teste pode ser reforçada pelo fato de que a coloração, evidenciada pelo teste histoquímico, ocorreu, na grande maioria das vezes, nos mesmos locais onde os conteúdos foram intensamente corados de azul esverdeado, com azul de toluidina, indicando, portanto, a presença de compostos fenólicos nestes tecidos.

Apesar de grande parte do arsênio ter sido acumulado nas raízes, o resultado do teste histoquímico neste órgão também não foi satisfatório pois foi observada uma fraca reação positiva. Este teste histoquímico foi realizado com sucesso em tecidos animais (Pearse, 1972) e, apesar de aparentemente ter ocorrido reação positiva nas células do córtex, o teste não foi satisfatório para as células vegetais.

5 - CONCLUSÕES

- Não foi possível observar um marcador estrutural específico, relacionado à tolerância do arsênio, uma vez que as principais alterações observadas foram também descritas para outros poluentes.

- As alterações anatômicas observadas nas folhas das três espécies, provavelmente, ocorreram em função do estresse hídrico provocado indiretamente pelo arsênio, uma vez que apenas *B. verticillata* translocou este poluente para a porção aérea da planta.

- Uma diferenciação atípica da raiz lateral ocorreu em *S. terebinthifolius* e *C. cajan* necessitando de maiores estudos que possam elucidar o desenvolvimento da raiz, após exposição ao arsênio.

- O teste histoquímico para detecção de arsênio não foi conclusivo, necessitando de outras análises para sua interpretação. A histolocalização do arsênio sofreu interferência de outros compostos presentes nas células, como os compostos fenólicos.

- O fato do teste histoquímico não ter sido eficiente, impediu a verificação de um possível sítio preferencial de acúmulo do arsênio nas raízes e folhas, das espécies estudadas neste trabalho.

- Os efeitos quantitativos causados pelo arsênio sobre a estrutura foliar foram visíveis em *S. terebinthifolius* e *C. cajan*, não tendo sido expressivo em *B. verticillata*.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, T. V.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A.; FERREIRA, R. S. 2007. Anat Quant: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**, 25(4): 649-659.
- BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; GUARDIA, M. 2000. Especificação de arsênio - uma revisão. **Química Nova**, 23(1): 58-70.
- BLAMEY, F. P. C.; JOYCE, D. C.; EDWARDS, D. G.; ASHER, C. J. 1986. Role of trichomes in sunflower tolerance to manganese toxicity. **Plant and Soil**, 91(1): 171-180.
- CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; BURLÓ, F.; BURGOS-HERNANDEZ, A.; LÓPEZ, E.; MATAIX, J. 1997. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Scientia Horticulturae**, 71(1): 167-176.
- CHEN, T. B.; HUANG, Z. C.; HUANG, Y. Y.; XIE, H.; LIAO, X. Y.; 2003. Cellular distribution of arsenic and other elements in hyperaccumulator *Pteris nervosa* and their relations to arsenic accumulation. **Chinese Science Bulletin**, 48(1):1586-1591.
- CHEN, T. B.; YAN, X. L.; LIAO, X. Y.; XIAO, X. Y.; HUANG, Z. C.; XIE, H.; ZHAI, L. M. 2005. Subcellular distribution and compartmentalization of arsenic in *Pteris vittata* L. **Chinese Science Bulletin**, 50 (24): 2843-2849.
- CHOUDHURY S., PANDA, S. K. 2004. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead and arsenic phytotoxicity. **Current Science**, 87(3): 342-348.
- CIAMPOROVA, M.; 2002. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. **Biologia Plantarum**, 45(2): 161-171.
- COSIO, C.; DESANTIS, L.; FREY, B.; DIALLO, S.; KELLER, C. 2005. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, 56(412): 765-775.
- COSTA, A. C. 2007. **Bases fisiológicas da ação do arsênio em algumas espécies de cerrado**. Tese de doutoramento do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 78p.
- DICKISON, W. C. 2000. **Integrative plant anatomy**. San Diego Harcourt. Academic Press. 533p.
- DOMINGOS, M.; ALVES, E. S.; BULBOVAS, P.; CUNHA, A. L.; LONGUI, E. L.; LOURENÇON, D. A. C. B.; MORAES, R. M.; RINALDI, M. C. S.; MAZZONI-

VIVEIROS, S. C. 2004. Reaction of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, to urban air pollution stress. In: Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. (eds): **Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness**. Cuvillier Verlag, Göttingen. 392p.

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

FERREIRA, A. A. A. 1983. **Efeito do alumínio sobre o desenvolvimento e o teor de alguns nutrientes em dois cultivares de soja (*Glycine max* (L.) MERRILL)**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da USP. 69p.

FORNASIERO, R. B. 2003. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. **Plant Science**, 165(1): 507-513.

FREY, B.; KELLER, C.; ZIEROLD, K.; SCHULIN, R. 2000. Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* **Plant, Cell and Environment**, 23(1): 675-687.

GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. 2005. Arsênio: uma revisão histórica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 80(1): 91-95.

HARTLEY-WHITAKER, J.; AINSWORTH, G.; VOOIJS, R.; TEN-BOOKUM, W.; SCHAT, H.; MEHARG, A. A. 2001. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Plant Physiology**, 126(1): 299-306.

KARNOVSKY, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27(2):137-138.

KRAMER, U.; COTTER-HOWELLS, J. D.; CHARNOCK, J. M.; BAKER, A. J. M.; SMITH, A. C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. **Nature**, 379(1): 635-638.

KUPPER, H.; ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P. 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, 119(1): 305-311.

KUPPER, H.; LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Planta**, 212(1): 75-84.

KUPPER, H.; LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; WIESHAMMER, G.; MCGRATH, S. P. 2001. Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. **Journal of Experimental Botany**, 52(365): 2291-2300.

LEI, M.; CHEN, T. B.; HUANG, Z. C. WANG, Y. D.; HUANG, Y. Y. 2008. Simultaneous compartmentalization of lead and arsenic in co-hyperaccumulator *Viola principis* H. de Boiss.: An application of SRXRF microprobe. **Chemosphere**, 72(1): 1491-1496.

LI, W. X.; CHEN, T. B., CHEN, Y.; LEI, M. 2005. Role of trichome of *Pteris vittata* L. in arsenic hyperaccumulation. **Science in China Series C-Life Sciences**, 48(2): 148-154.

LI, W. X.; CHEN, T. B.; HUANG, Z. C.; LEI, M.; LIAO, X. Y. 2006. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Chemosphere**, 62(1): 803-809.

LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; FUHRMANN, M.; MA, L. Q.; MCGRATH, S. P. 2002. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. **New Phytologist**, 156(1): 195-203.

MACNEAR, D. H.; PELTIER, E.; EVERHART, J.; CHANEY, R.; SUTTON, S.; NEWVILLE, M.; RIVERS, M.; SPARK, D. 2005. Application of Quantitative Fluorescence and Absorption-Edge Computed Microtomography to Image Metal Compartmentalization in *Alyssum murale*. **Environmental Science and Technology**, 39(1): 2210-2218.

MANGABEIRA, P. A.; MIELK, M. S.; ARANTES, I.; DUTRUCH, L.; SILVA D. C.; BARBIER, F.; ALMEIDA, A. A. F.; OLIVEIRA, A. H.; SEVERO, M. I. G.; LABEJOF, L; ROCHA, D. C.; ROSA, T. S.; SANTANA, K. B.; GAVRILOV, K. L.; GALLE, P.; LEVI-SETTI, R.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. 2006. Bioaccumulation of chromium in aquatic macrophyte *Borreria scabiosoides* Cham. e Schltdl. **Applied Surface Science**, 252(1): 6816-6819.

MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, 154(1): 29-43.

O'BRIAN, T. P.; MCCULLY, M. E. 1981. **The study of structure principles and selected methods**. Termarcarphi Pty LDT., Melbourne. 280p.

OLIVA, M. A. e FIGUEIREDO, J. G. 2005. Gramíneas bioindicadoras de flúor em regiões tropicais. **Revista Brasileira de Botânica**, 28(2):389-397.

PAIVOKKE, A. 1983. Anatomical responses of the roots pea seedlings to lead and arsenate ions. **Annales Botanici Fennici**, 20(1): 307-315.

PARSONS, D. F. 1970. **Some Biological Techniques in Electron Microscopy**. Academic Press, NY, London. 186p.

PEARSE, A. G. E. 1972. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. Williams and Wilkins Co, Baltimore. Vol 2. 1518p.

ROBINSON, B. H.; LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P. 2003. Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyperaccumulator *Berkheya oddii* **New Phytologist**, 158(1): 79-285.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. 1998. Phytoremediation. **Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49(1): 643-668.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; SILVA, L. C.; AZEVEDO, A. A.; AGUIAR, R. 2006. Effects of Simulated Acid Rain on Leaf Anatomy and Micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 49(2): 313-321.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. 2008. **Avaliação dos efeitos fitotóxicos do flúor em *Spondia dulcis* FORT F. (Anacardiaceae), espécie tropical sensível**. Tese de doutoramento do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa. 102p.

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(4): 385-393.

SILVA, L. C., AZEVEDO, A. A., SILVA, E. A. M.; OLIVA, M. A. 2005. Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). **Australia Journal of Botany**, 53(1): 789-796.

SILVA, L. C.; OLIVA, M. A.; AZEVEDO, A. A.; ARAÚJO, J. M. 2006. Responses of restinga plant species to pollution from na iron pelletization factory. **Water, Air, and Soil Pollution**, 75(1): 241-256.

SIMOLA, L. K. 1977. The effect os lead, cadmium, arsenate, and fluoride ions on the growth and fine structure of *Sphagnum nemoreum* in aseptic culture. **Canadian Journal of Botany**, 55(4): 426-435.

SIMON, T.; EBERHARD, A.; ROHR, R. 2000. Effect of Ni and As on radish tuber cultivated on artificially polluted soils. **European Journal of Soil Biology**, 36(1): 73-80.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K.; ARORA, K. 2007 Arsenic induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, 53(1): 65-73.

SOIKKELI, S. 1981. Comparison of cytological injuries in conifer needles from several polluted industrial environments in Finland. **Annales Botanici Fennici**, 18(1): 47-61.

SOUZA, G. M.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. 1999. Water deficit in relation to leaf and stem anatomy of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. shoots cultivated *in vitro*. **Scientia Agricola**, 56(3): 723-731.

SRESTY, T. V. S.; MADHAVA RAO, K. V. 1999. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeonpea. **Environmental and Experimental Botany**, 41(1): 3-13.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 1998. **Plant Physiology** 2ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts. 792p.

VITORIA, A. P.; RODRIGUEZ, A. P. M.; CUNHA, M.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. 2003. Structural changes in radish seedlings exposed to cadmium. **Biologia Plantarum**, 47(4): 561-568.

VITORIA, A. P.; CUNHA, M.; AZEVEDO, R.A. 2006. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, 58(1): 47-52.

ZHAO, F. J.; LOMBI, E.; BREEDON, T.; McGRATH, S. P. 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. **Plant, Cell and Environment**, 23(1): 507-514.

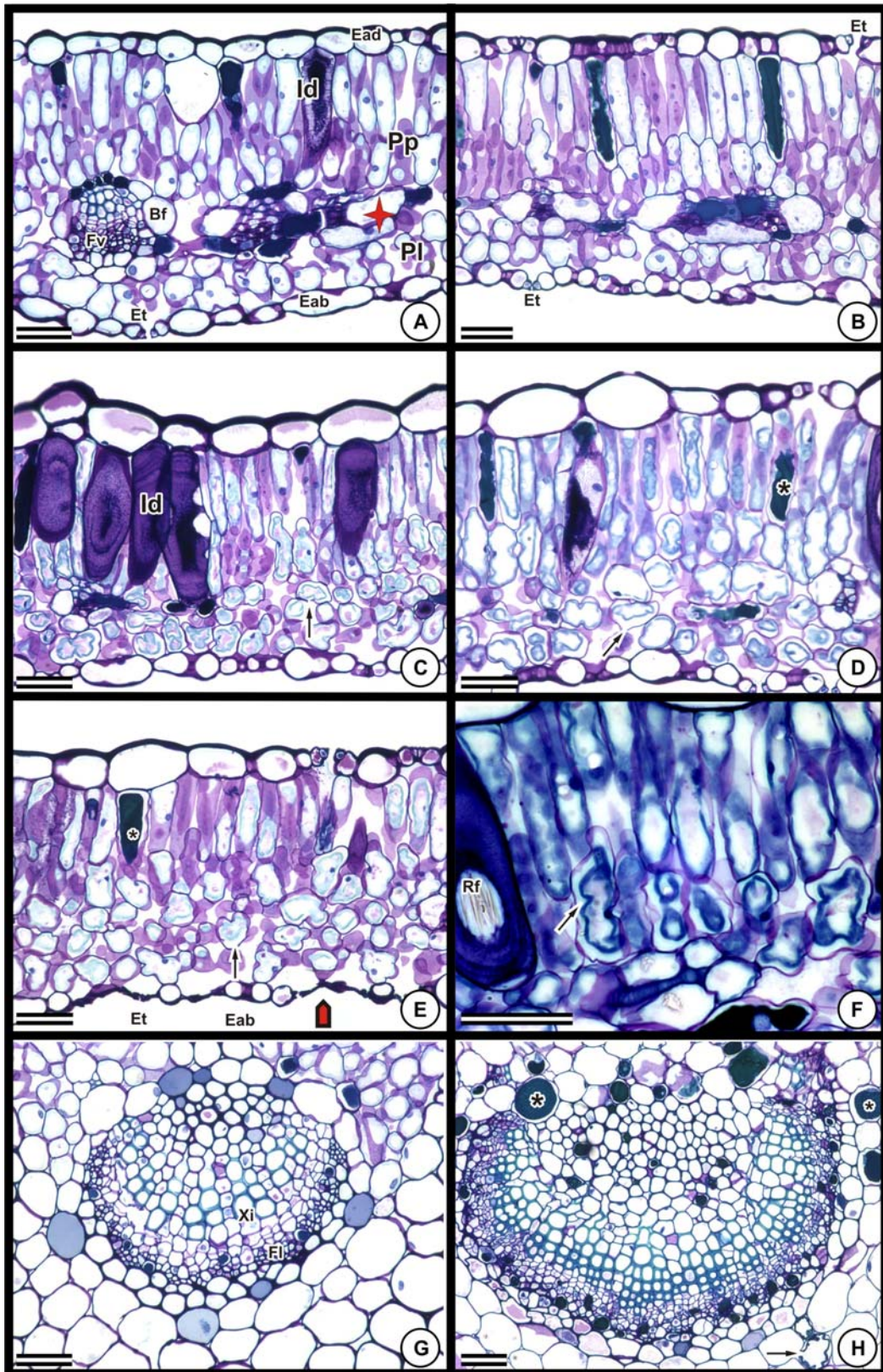


Figura 1. Estrutura da lâmina foliar de *Borreria verticillata* no tratamento controle e submetida à ação do arsênio A-H: Lâmina foliar ; G e H (detalhe feixe vascular); em secção transversal (microscopia de luz). A e G (0 mg L⁻¹As); B (2,5 mg L⁻¹As); C (5 mg L⁻¹As); D, F e H (7,5 mg L⁻¹As); E (10 mg L⁻¹As). Ead: Epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; Pp: parênquima paliçádico; Pl: Parênquima lacunoso; Et: Estômato; Bf: bainha do feixe vascular; Fv: Feixe vascular; Xi: Xilema; Fl: Floema; Id: Idioblasto; Rf: Ráfide; Retração do protoplasto (→); Compostos fenólicos (*). Estrela vermelha: Parênquima paravenal; Seta vermelha: Colapso da epiderme. Barra=50 μm.

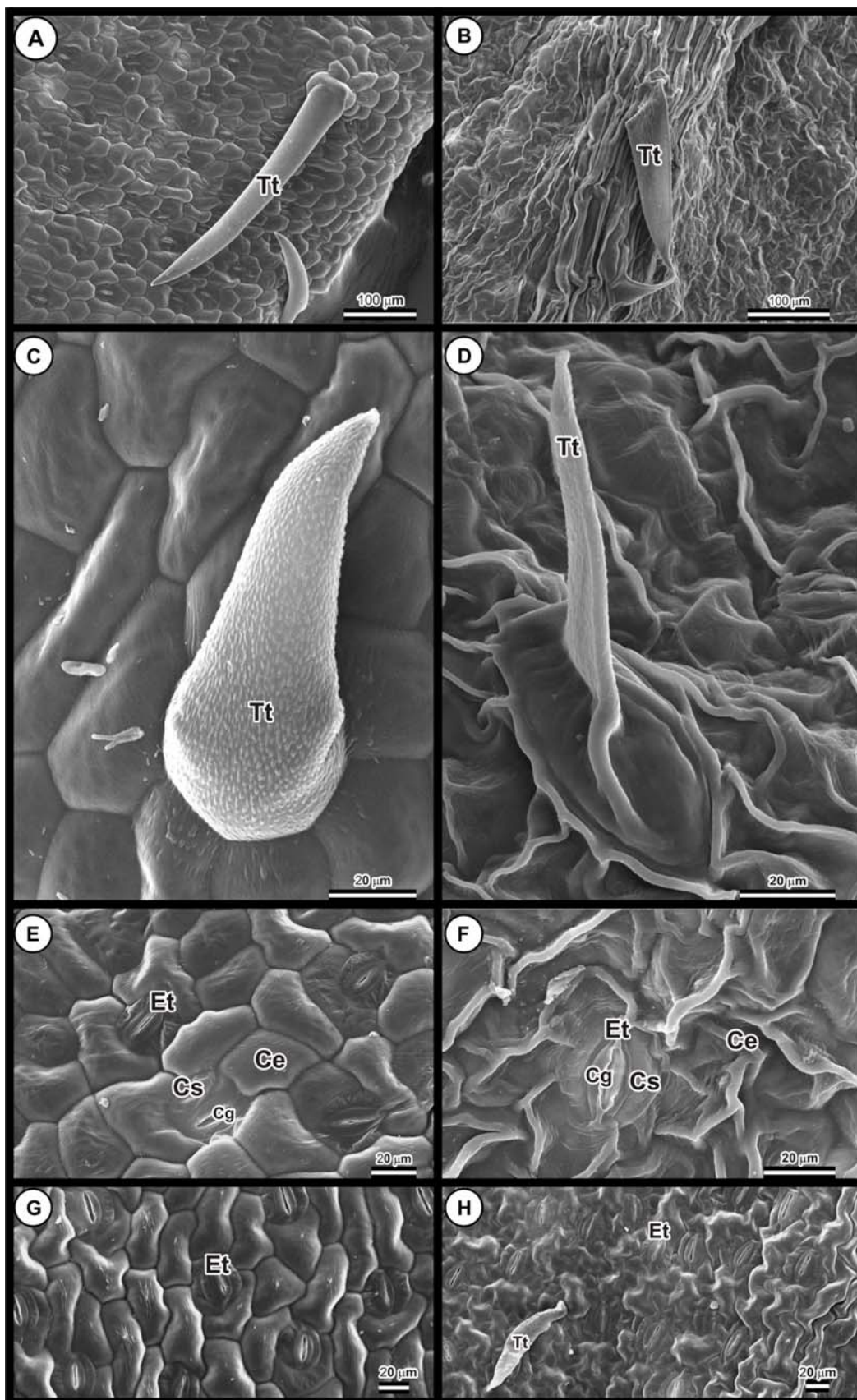


Figura 2. Micromorfologia foliar de *Borreria verticillata* no tratamento controle e nos tratamentos com arsênio (microscopia eletrônica de varredura). A, C, E, F, e G face adaxial. B, D e H face abaxial. A; C e E ($0 \text{ mg L}^{-1} \text{ As}$); B, D e F ($7,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ As}$). G e H ($10 \text{ mg L}^{-1} \text{ As}$). Et: Estômato; Cs: Célula subsidiária; Ce: célula epidérmica; Tg: Tricoma glandular; Tt: Tricoma tector.

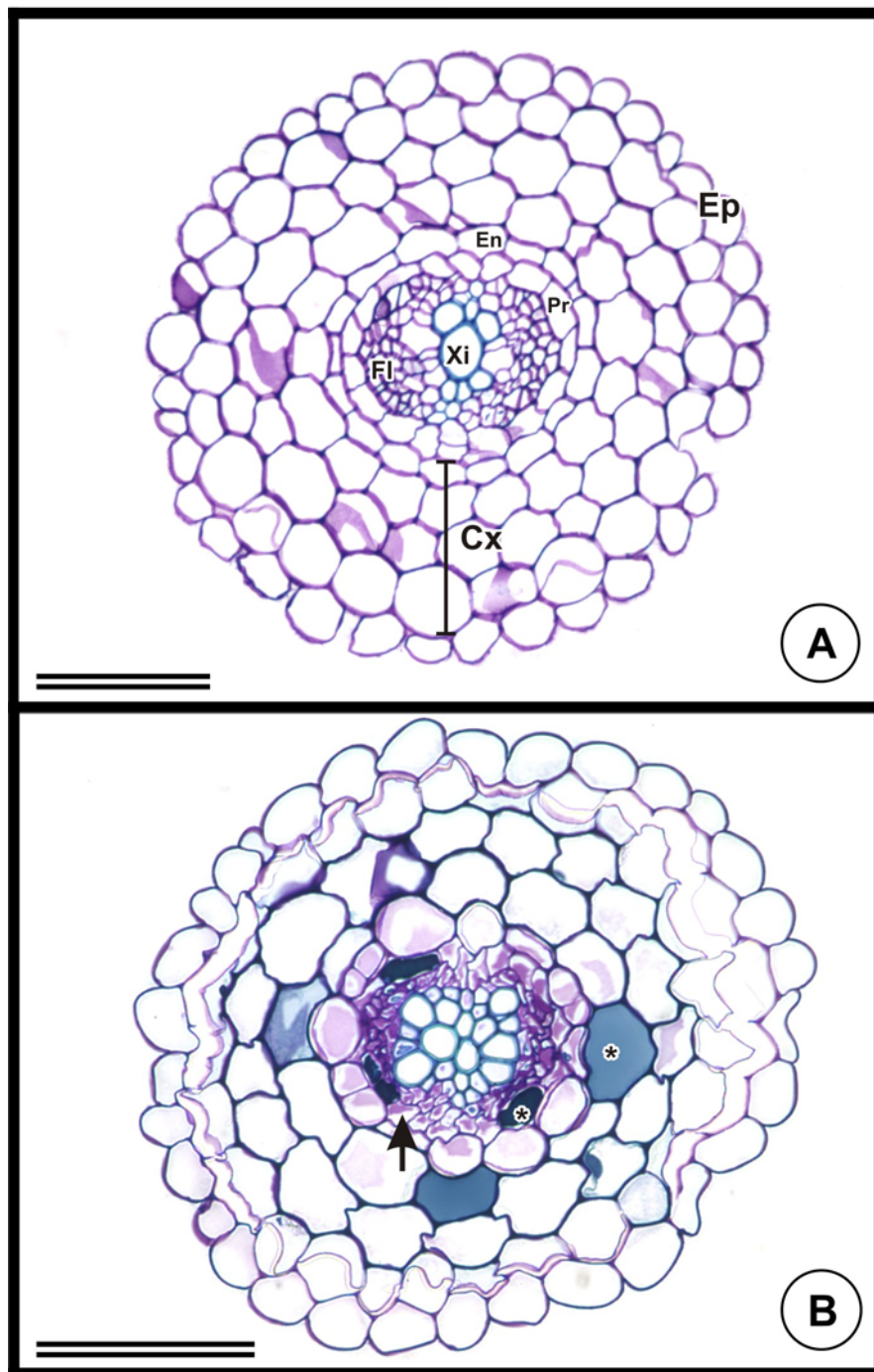


Figura 3. Corte transversal de raiz de *Borreria verticillata* (microscopia de luz) no tratamento controle e após ação do arsênio. A (0 mg L⁻¹As); B (5 mg L⁻¹As) Ep: Epiderme; Cx: Córtex; Xi: Xilema; Fl: Floema; En: Endoderme; Pr: Periciclo; Retração do protoplasto (seta); Composto fenólico (*). Barra=100 μm(A-C). Barra=50 μm.

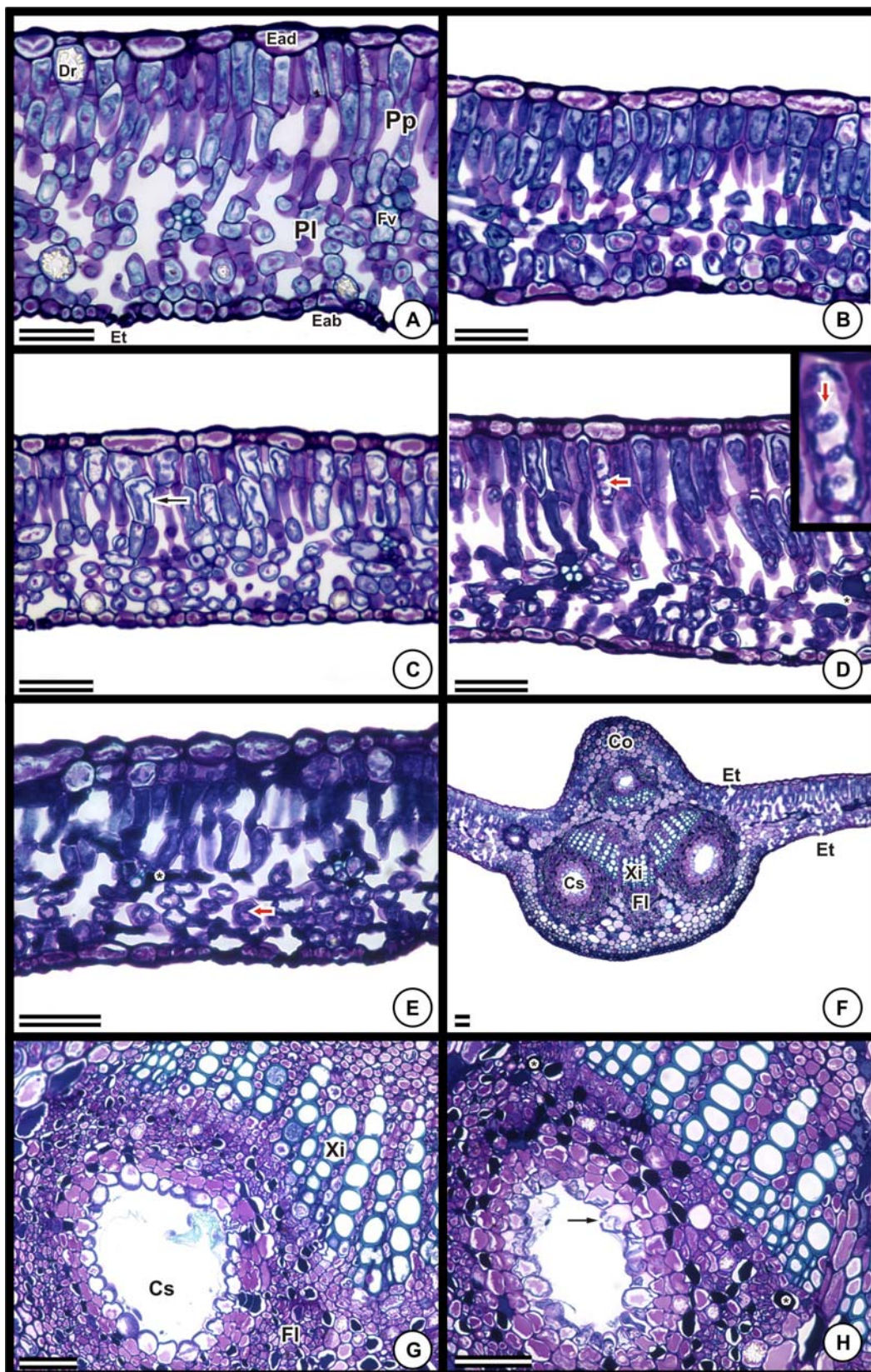


Figura 4. Estrutura da lâmina foliar de *Schinus terebinthifolius* no tratamento controle e submetida à ação do arsênio. Lâmina foliar A-E (mesófilo); F (nervura mediana); G e H (detalhe do canal secretor) em secção transversal. A e G (0 mg L⁻¹As); B (2,5 mg L⁻¹As); C (5 mg L⁻¹As); D, F e H (7,5 mg L⁻¹As); E (10 mg L⁻¹As). Ead: Epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; Pp: parênquima paliçádico; Pl: Parênquima lacunoso; Et: Estômato; Fv: Feixe vascular; Xi: Xilema; Fl: Floema; Co: Colênquima; Cs: Canal secretor; Dr: Drusa. Retração do protoplasto (→); Composto fenólico (*); alteração no cloroplasto (seta vermelha). Barra= 50 μm.

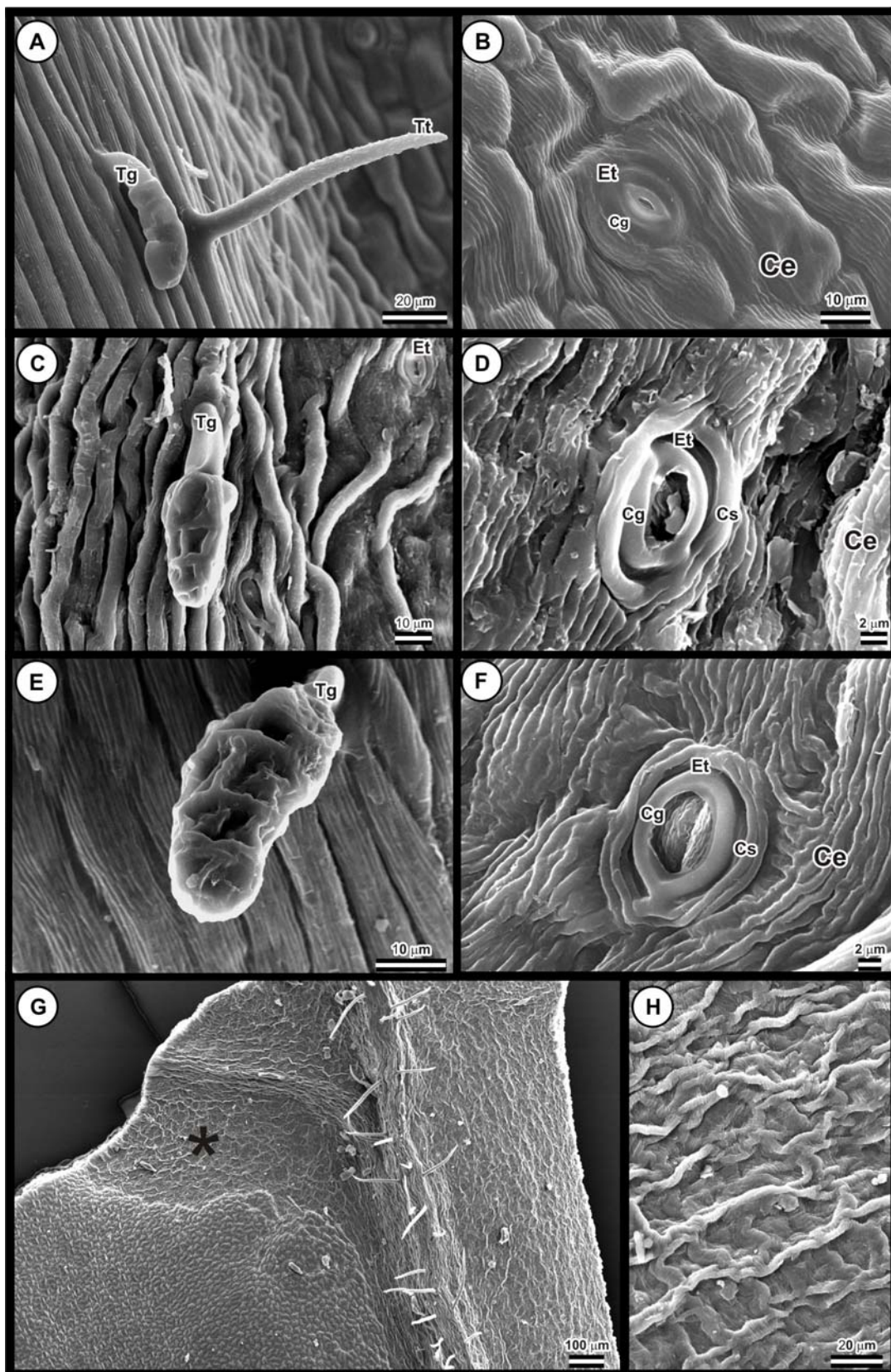


Figura 5. Micromorfologia foliar de *Schinus terebinthifolius* no tratamento controle e nos tratamentos com arsênio (microscopia eletrônica de varredura). A-H face adaxial. A e B (0 mg L⁻¹As); C, D, G e H (7,5 mg L⁻¹As). E e F (10 mg L⁻¹As). G: Vista geral da folha. H: Detalhe da região afetada vista em G. Et:Estômato; Cs:Célula subsidiária; Ce: célula epidérmica; Cg: célula guarda; Tg: Tricoma glandular; Tt: Tricoma tector. Área afetada (*).

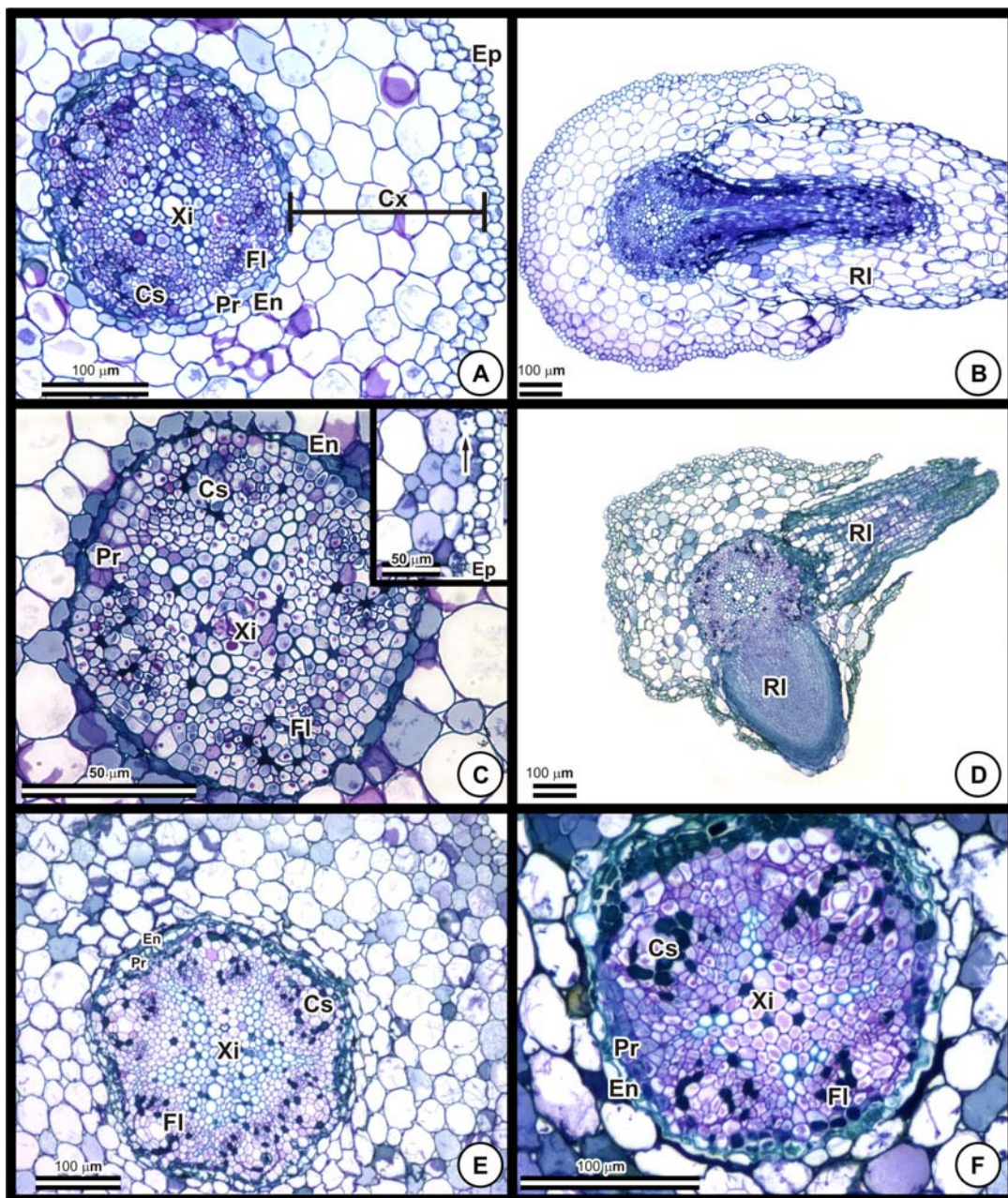


Figura 6. Corte transversal da raiz de *Schinus terebinthifolius* (microscopia de luz) no tratamento controle e após exposição ao arsênio. A e B ($0 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); C ($2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); D ($5 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); E ($7,5 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$); F ($10 \text{ mg L}^{-1} \text{As}$). Ep: Epiderme; Cx: Córtex; Xi: Xilema; Fl: Floema; En: Endoderme; Pr: Periciclo; Cs: Canal secretor. Material granuloso (→)

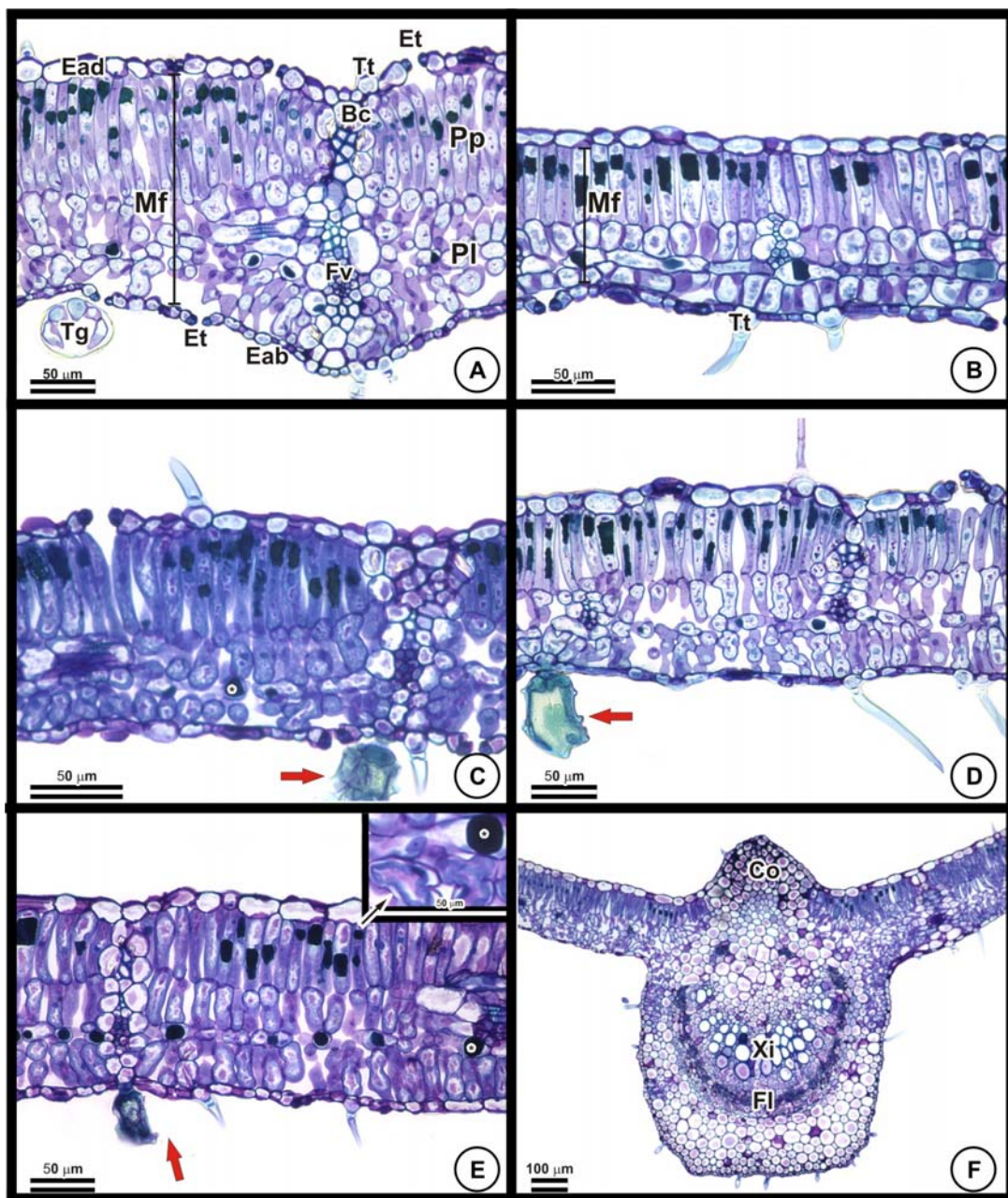


Figura 7. Estrutura da lâmina foliar de *Cajanus cajan* no tratamento controle e submetida à ação do arsênio. Lâmina foliar de A-E (mesofilo); F (nervura mediana); em seção transversal (microscopia de luz). A e F (0 mg L⁻¹As); B (0,5 mg L⁻¹As); C (1 mg L⁻¹As); D (1,5 mg L⁻¹As); E (2,5 mg L⁻¹As). Ead: Epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; Pp: parênquima paliçádico; Pl: Parênquima lacunoso; Et: Estômato; Fv: Feixe vascular; Xi: Xilema; Fl: Floema; Bc: Bainha cristalífera; Mf: Mesofilo; Tt: Tricoma tector; Tg: tricoma glandular; Co: Colênquima; Retração do protoplasto (→). Seta vermelha: alteração no tricoma glandular; Composto fenólico (*).

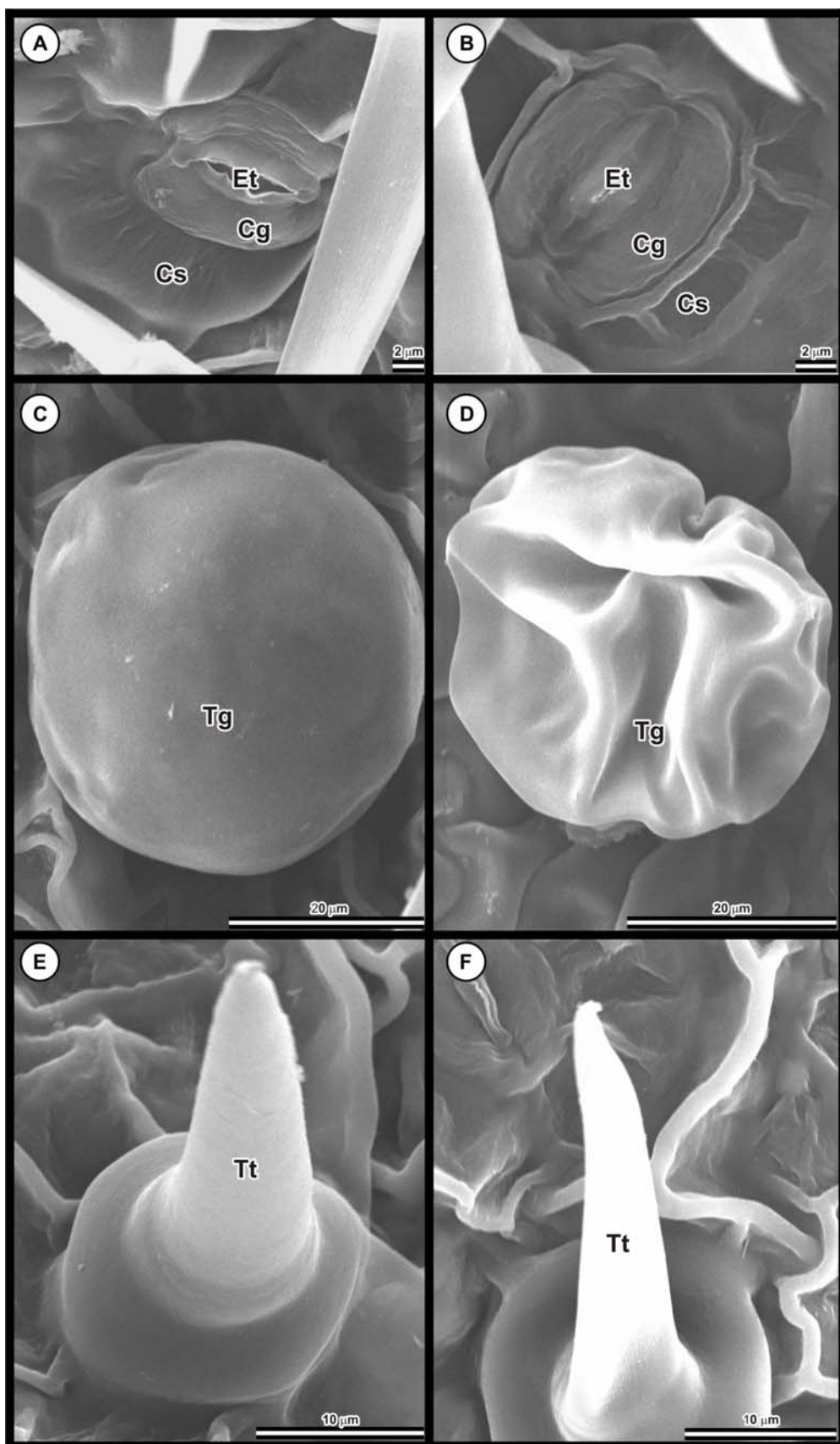


Figura 8. Micromorfologia foliar de *Cajanus cajan* no tratamento controle e nos tratamentos com arsênio (microscopia eletrônica de varredura). A e B face abaxial. C, D, E e F face adaxial. A; C e E ($0 \text{ mg L}^{-1} \text{ As}$); B, D e F ($2,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ As}$). Et: Estômato; Cs: Célula subsidiária; Tg: Tricoma glandular; Tt: Tricoma tector.

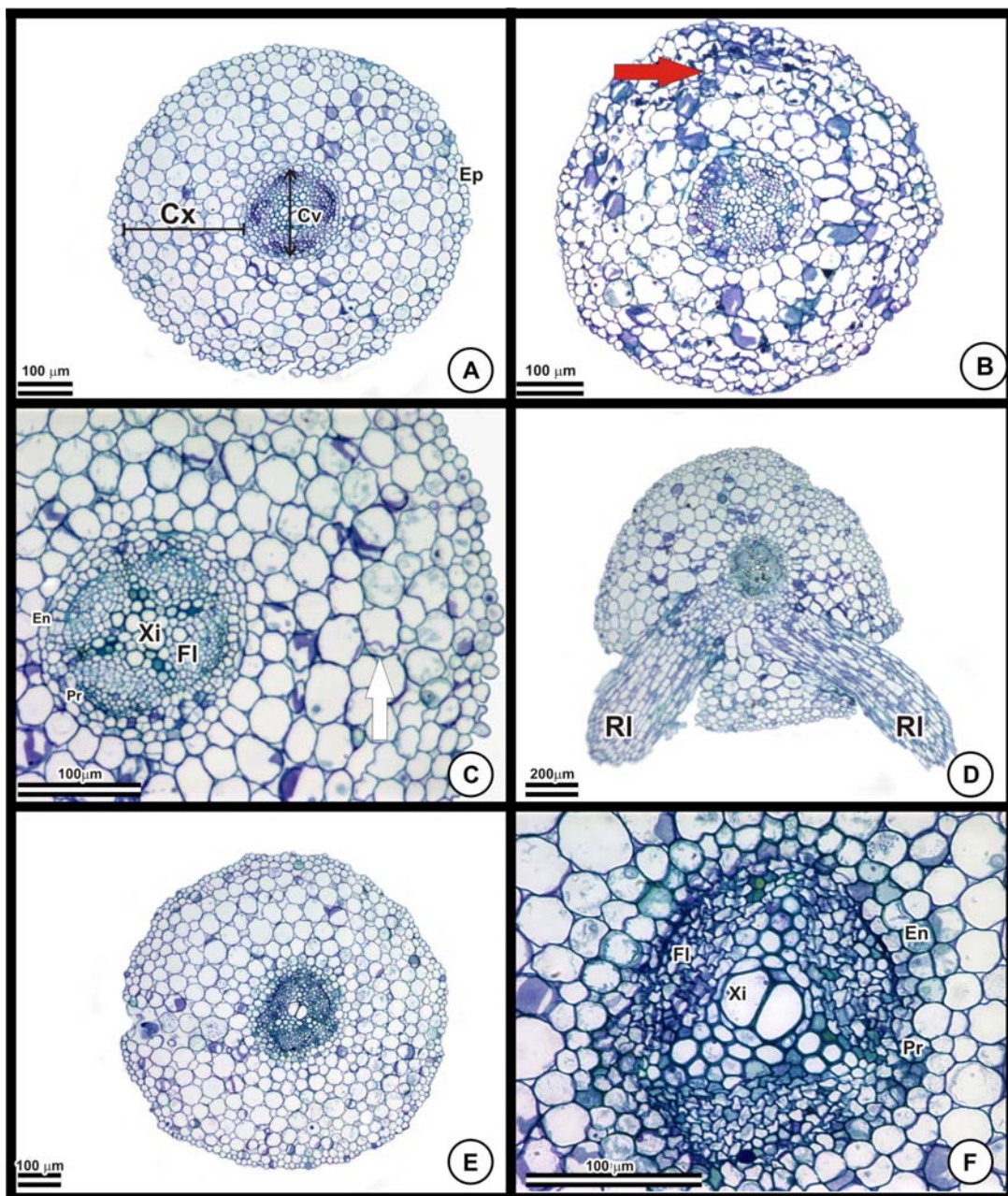


Figura 9. Corte transversal de raiz de *Cajanus cajan* (microscopia de luz) no tratamento controle e após exposição ao arsênio. A (0 mg L⁻¹As); B (2,5 mg L⁻¹As); C e D (0,5 mg L⁻¹As); E e F (1 mg L⁻¹As). Ep: Epiderme; Cx: Córtex; Xi: Xilema; Fl: Floema; En: Endoderme; Pr: Periciclo; Cv: Cilindro vascular; RI: Raiz lateral. Seta vermelha: desorganização córtex. Seta branca: retração do protoplasto.

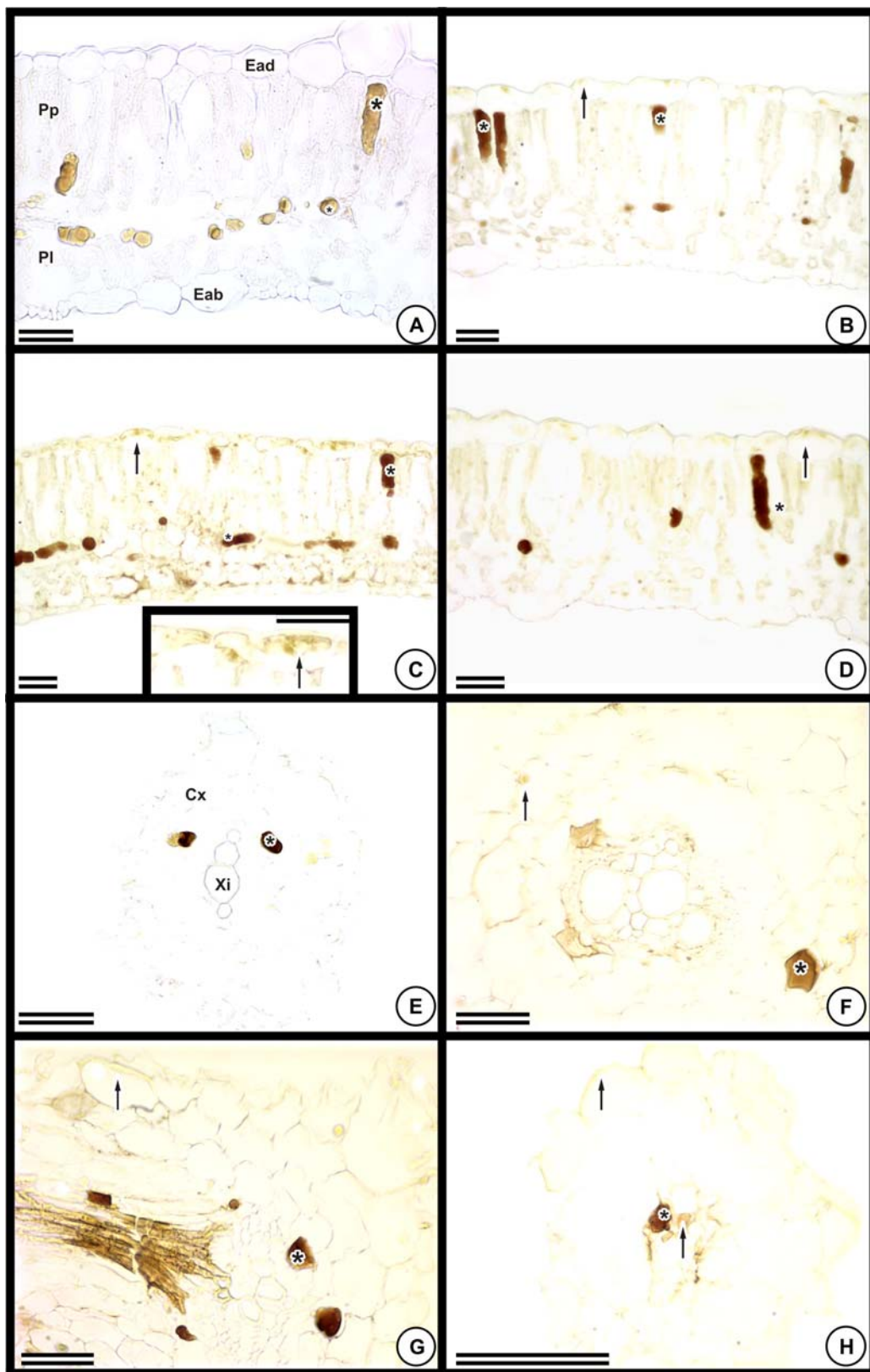


Figura 10. Teste histoquímico para arsênio, em folhas e raízes de *Borreria verticillata* A-D (lâmina foliar); E-H (raiz); em secção transversal (microscopia de luz). A e E (0 mg L⁻¹As); B e F (2,5 mg L⁻¹As); C e G (5 mg L⁻¹As); D (10 mg L⁻¹As); H (7,5 mg L⁻¹As). Ead: Epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; Pp: parênquima paliçádico; Pl: Parênquima lacunoso; Xi: Xilema; Cx: Córtex; Compostos fenólicos (*). Detalhe da reação (→). Barra= 50 µm.

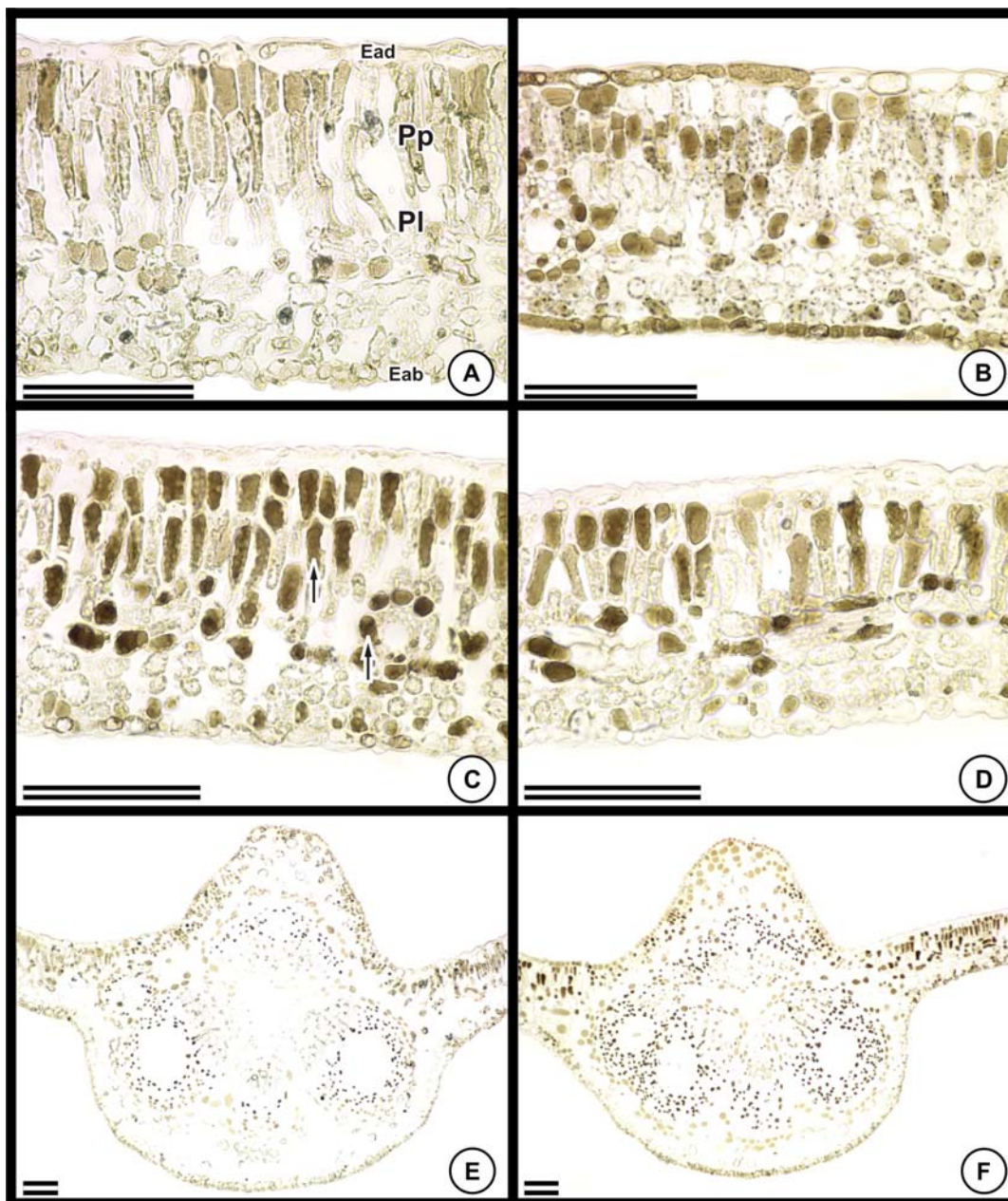


Figura 11. Teste histoquímico para arsênio, em folhas de *Schinus terebinthifolius* A e E (0 mg L⁻¹As); B (5 mg L⁻¹As); C e F (7,5 mg L⁻¹As); D (10 mg L⁻¹As). Ead: Epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; Pp: parênquima paliçádico; Pl: Parênquima lacunoso; Composto fenólico (→). Barra= 100 µm.

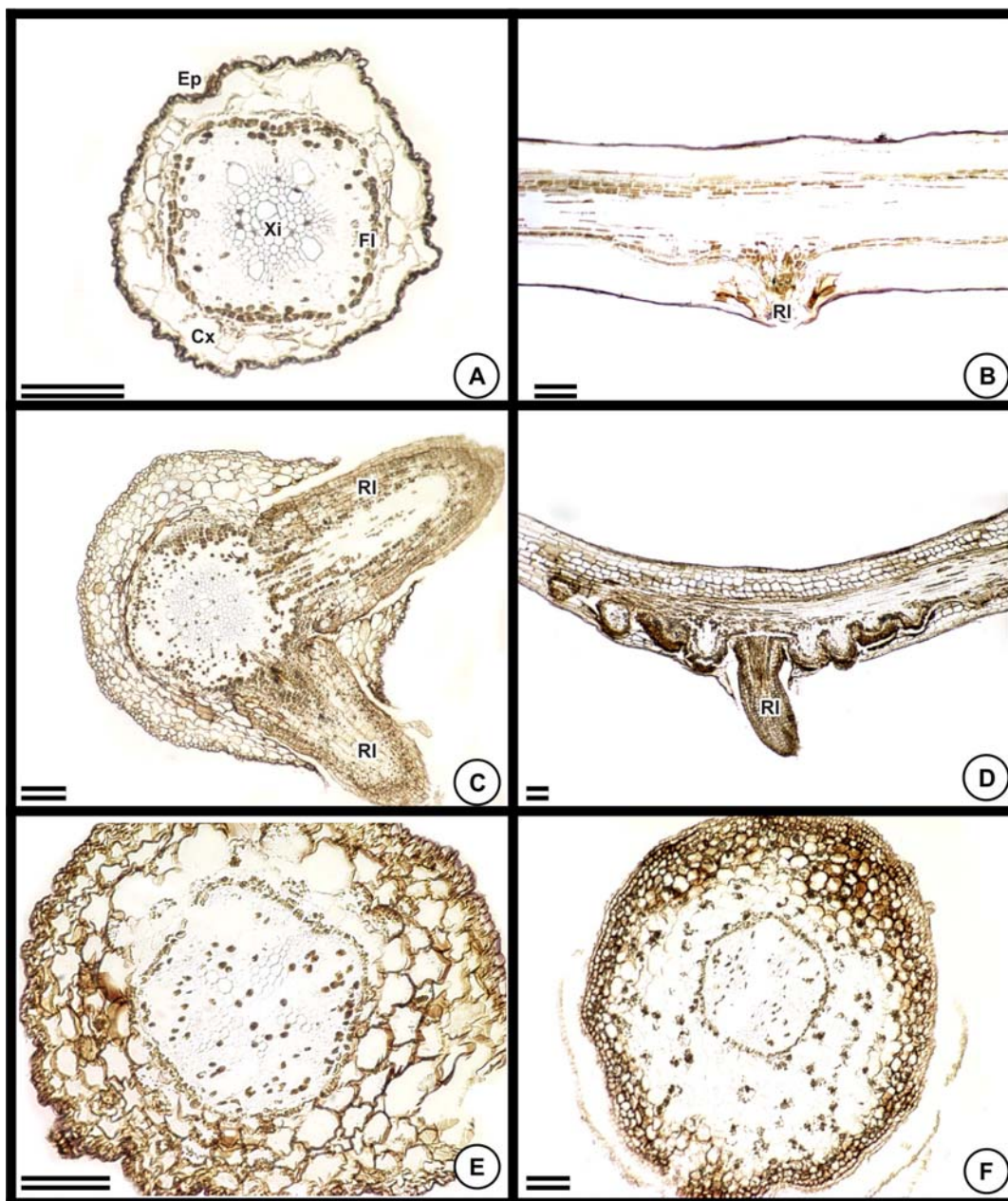


Figura 12. Teste histoquímico para arsênio em raízes de *Schinus terebinthifolius* A, C, E e F (secção transversal); B e D (secção longitudinal). A e B (0 mg L⁻¹As); C e D (7,5 mg L⁻¹As); E (5 mg L⁻¹As); F (10 mg L⁻¹As). Xi: Xilema; Fl: Floema; Ri: Raiz lateral; Cx: Córtex; Ep: Epiderme. Barra= 100 µm.

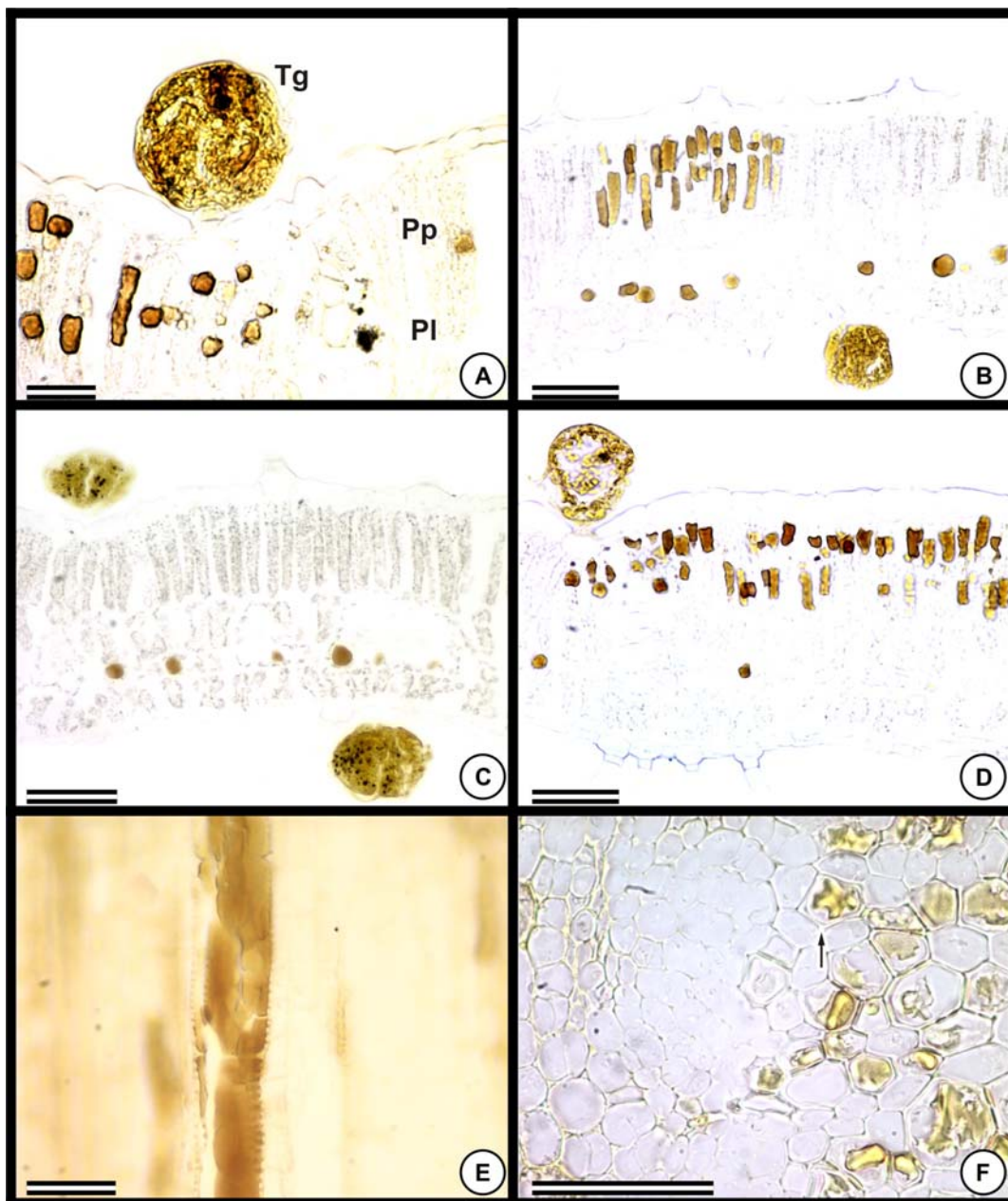


Figura 13. Teste histoquímico para arsênio, em folhas e raízes de *Cajanus cajan* A-D (lâmina foliar); E e F (raiz); em secção transversal (microscopia de luz). A (0 mg L⁻¹As); B (0,5 mg L⁻¹As); C (1 mg L⁻¹As); D (1,5 mg L⁻¹As); E (1 mg L⁻¹As); F (1,5 mg L⁻¹As). Pp: parênquima paliçádico; Pl: Parênquima lacunoso; Tg: tricoma glandular; Elementos de vaso com conteúdo (→). Barra= 100 μm.

Tabela 1 – Morfometria da lâmina foliar de *Borreria verticillata* após exposição a diferentes concentrações de arsênio

Arsênio (mgL ⁻¹)	EAD(μm) ^{ns}	PP(μm) ^{ns}	PL(μm) ^{ns}	EAB(μm) [*]	Ef(μm) [*]
0	30,97a	108,19a	109,44a	25,19a	273,79a
2,5	29,43a	97,98a	102,17a	21,12ab	250,69ab
5,0	24,93a	94,03a	100,11a	17,57ab	236,63ab
7,5	30,83a	96,95a	103,48a	23,32ab	254,57ab
10,0	21,32a	104,65a	87,56a	14,03b	227,56b
CV(%)	20,33	10,13	14,16	20,92	7,2

(*), (ns) Significativo e não significativo, respectivamente, a 5% pelo teste de F. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. EAD: Epiderme adaxial; PP: Parênquima paliçádico; PL: Parênquima lacunoso; EAB: Epiderme abaxial; Ef: Espessura do folíolo.

Tabela 2 – Morfometria da lâmina foliar de *Schinus terebinthifolius* após exposição a diferentes concentrações de arsênio

Arsênio (mgL ⁻¹)	EAD(μm) [*]	PP(μm) [*]	PL(μm) ^{ns}	EAB(μm) [*]	Ef(μm) [*]
0	17,19a	80,42a	85,70a	13,62a	196,94a
2,5	12,06b	66,42ab	68,78a	9,734b	156,99b
5,0	8,91c	57,68b	63,97a	7,44c	138,00b
7,5	9,56c	70,90ab	70,65a	7,75c	158,86b
10,0	9,39c	56,76b	73,27a	8,17bc	147,56b
CV(%)	9,42	12,61	19,29	9,18	9,41

(*), (ns) Significativo e não significativo, respectivamente, a 5% pelo teste de F. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. EAD: Epiderme adaxial; PP: Parênquima paliçádico; PL: Parênquima lacunoso; EAB: Epiderme abaxial; Ef: Espessura do folíolo.

Tabela 3 – Morfometria da lâmina foliar de *Cajanus cajan* após exposição a diferentes concentrações de arsênio

Arsênio (mgL ⁻¹)	EAD(μm) [*]	PP(μm) [*]	PL(μm) [*]	EAB(μm) [*]	Ef(μm) [*]
0	16,12a	78,77a	87,93a	10,59a	193,40a
0,5	8,978b	51,04b	55,86bc	5,45b	121,33b
1,0	9,50b	61,26b	65,47b	5,56b	141,81b
1,5	9,12b	50,67b	53,42c	5,34b	118,55b
2,5	8,88b	55,80b	60,54bc	5,03b	130,26b
CV(%)	16,73	9,68	7,73	10,13	8,9

(*) Significativo a 5% pelo teste de F. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. EAD: Epiderme adaxial; PP: Parênquima paliçádico; PL: Parênquima lacunoso; EAB: Epiderme abaxial; Ef: espessura do folíolo.

CAPÍTULO III

Avaliação de parâmetros fisiológicos de plantas expostas ao arsênio.

Resumo: Neste trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes doses de arsênio sobre as trocas gasosas e a emissão de fluorescência da clorofila *a* de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) e *Cajanus cajan* (Leguminosae). Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa. As plantas foram cultivadas em sistema hidropônico em solução nutritiva de Hoagland (meia força). O arsênio foi adicionado na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); *S. terebinthifolius* e *B. verticillata* foram submetidas a concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10,0 mg L^{-1} As e *C. cajan* a 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,5 mg L^{-1} As. O tempo de exposição das plantas ao arsênio variou entre as espécies, sendo 47 dias para *S. terebinthifolius*, 27 dias para *C. cajan*, e 10 dias para *B. verticillata*. As taxas de assimilação líquida de carbono (*A*), condutância estomática (*g_s*), transpiração (*E*) e relação entre a concentração interna (*C_i*) e externa (*C_a*) de CO_2 no mesófilo (*C_i/C_a*) foram obtidas por meio de um sistema de medição de trocas gasosas portátil LI-6400. As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas utilizando um fluorômetro portátil modulado MINI-PAM. As análises estatísticas foram realizadas no software SAEG (2007). O efeito do arsênio na resposta fotossintética das plantas variou de acordo com a espécie estudada. Nos parâmetros de trocas gasosas de *B. verticillata*, a concentração de 7,5 mg L^{-1} As foi a que mais afetou as plantas, com redução de 54,4% na *A*, 54,9% na *g_s* e 51,1% na *E*, em relação ao controle. A relação *C_i/C_a* oscilou levemente nas diferentes doses de arsênio com tendência de aumento sob a dose de 7,5 mg L^{-1} As. Sob a maior concentração de arsênio, entretanto, as plantas responderam como no controle. Em *S. terebinthifolius* todos os parâmetros de trocas gasosas foram reduzidos. Quando comparamos o controle e a dose mais elevada de arsênio, o efeito negativo foi de 56% na *A*, 69,2% na *g_s*, 43,4% na relação *C_i/C_a* e 70% na *E*. Em *C. cajan* 0,5 mg L^{-1} As foi suficiente para afetar negativamente todos os parâmetros fotossintéticos de trocas gasosas. A dose mais baixa de arsênio reduziu em 80,4% a *A*, em 92,3% a *g_s*, em 48,5% a relação *C_i/C_a* e em 83,7% a *E*, em relação ao controle. O arsênio não afetou os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em *B. verticillata*. Em *S. terebinthifolius* a fluorescência mínima (*F₀*) mostrou um ligeiro aumento, sob as doses mais elevadas de arsênio, de 11% sob a dose de 7,5 mg L^{-1} As, enquanto a eficiência quântica máxima do fotossistema II (*F_v/F_m*) foi de 0,78, sob a mesma dosagem. Entretanto, a eficiência quântica efetiva do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$), a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), o coeficiente de extinção fotoquímica (*qP*) e o coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) não foram alterados pela exposição ao As. Em *C. cajan* a *F₀* e a relação *F_v/F_m* não sofreram alterações em função do arsênio. Contudo, todos os demais parâmetros de fluorescência analisados foram significativamente alterados, sob a menor dose de arsênio. Os parâmetros fisiológicos de *C. cajan* mostraram a alta sensibilidade desta espécie ao elemento. Em *S. terebinthifolius* e *B. verticillata*, os danos causados na fotossíntese pelo arsênio ocorreram,

provavelmente, em função da redução da condutância estomática, sendo a primeira espécie a mais sensível.

Palavras chaves: Fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e arsênio.

Summary: This study aimed to evaluate the effects of arsenic on gas exchange and the emission of fluorescence of chlorophyll *a* in *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) and *Cajanus cajan* (Leguminosae). The experiments were conducted in The Plant Growth Unit, at the Federal University of Viçosa. Plants were grown in hydroponic system in the Hoagland nutrient solution (half strength). Arsenic was employed as sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). *S. terebinthifolius* and *B. verticillata* were treated at the concentrations 0, 2,5; 5,0; 7,5 and 10,0 mg L^{-1} and *C. cajan* at 0, 0,5; 1,0; 1,5 and 2,5 mg L^{-1} . Exposure time to arsenic plants differed among the species, being 47 days for *S. terebinthifolius*, 27 days for *C. cajan*, and 10 days for *B. verticillata*. Rates of net carbon assimilation (*A*), stomatal conductance (g_s), transpiration (*E*) and the relationship between internal (*C_i*) and external (*C_a*) concentration of CO_2 in mesophyll (*C_i/C_a*) were obtained with the portable system for measuring gas exchanges LI-6400. Chlorophyll fluorescence were measured with the portable modulated fluorometer MINI-PAM. Statistical analysis was performed with the software SAEG (2007). The effect of arsenic on the photosynthetic response varied with the species. In the *B. verticillata*, the concentration 7,5 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$ was the most efficient in affecting the gaseous parameters causing a reduction of 54,4% in *A*, 54,9% in g_s and 51,1% in *E*, as compared with the control. The ratio *C_i/C_a* fluctuated slightly under the different doses of arsenic showing an increasing trend at the dose 7,5 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$. At the highest concentration of arsenic, however, the plants responded similarly to the control. In *S. terebinthifolius* all parameters of gaseous exchanges were affected. As compared to the control the highest doses of arsenic caused a reduction of 56% in *A*, 69,2% in g_s , 43,4% in relation *C_i/C_a* and 70% in *E*. In *C. cajan* 0,5 mg L^{-1} sufficed to adversely affect all parameters of the photosynthetic gaseous exchanges. The lowest dose of arsenic caused reductions of 80,4%, in *A*, 92,3% in g_s , 48,5% in *C_i/C_a* and 83,7% in *E*. Arsenic did not affect the parameters of chlorophyll *a* fluorescence in *B. verticillata*. In *S. terebinthifolius* the minimum fluorescence (*F₀*) showed a slight increase under the higher doses of arsenic, 11% at the dose 7,5 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$, with the maximum quantum efficiency of photosystem II (*F_v/F_m*) 0,78, at the same dosage. However, the actual quantum efficiency of photosystem II ($\Delta F/F_m$ '), the apparent rate of electrons transport (ETR), the extinction coefficient of photochemical (qP) and extinction coefficient of non-photochemical (NPQ) were not affect by As. In *C. cajan* *F₀* and *F_v/F_m* did not change in response to arsenic. However all the other parameters of fluorescence examined were significantly changed even under the lowest dose of arsenic. The physiological parameters displayed by *C. cajan* showed this species to be highly to the element. In *S. terebinthifolius* and *B. verticillata* the damages caused in the photosynthetic parameters by arsenic, occurred probably as a function of the reduced stomatal conductance, the first being the most sensitive of the three species.

Key-words: Chlorophyll fluorescence, gaseous exchanges, arsenic.

1 – INTRODUÇÃO

A poluição por arsênio tem causado danos ao ambiente; entretanto, pouco tem sido descrito na literatura a respeito das respostas fisiológicas de plantas, após terem sido expostas ao arsênio. Alterações fisiológicas, tais como, variação na biossíntese de clorofila, alterações nas trocas gasosas e no processo fotossintético podem ocorrer em plantas expostas ao arsênio (Jain e Gadre, 1997; Stoeva et al., 2005; Rahman et al., 2007).

Os efeitos do arsênio nas plantas podem ser diretos, uma vez que o arsenato pode atuar como análogo não funcional do fósforo, interferindo em importantes reações, tais como a fosforilação (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002), ou reagir com grupos –SH de enzimas e proteínas, perturbando o metabolismo celular (Rosen, 2002; Meharg e Hartley-Whitaker et al., 2002); ou indiretos através do comprometimento do funcionamento das raízes que reduz a absorção e a translocação de nutrientes e água para a parte aérea (Carbonell-Barrachina, et al., 1997).

Em relação ao processo fotossintético das plantas, os efeitos do arsênio podem variar de acordo com a espécie estudada e com a concentração de arsênio às quais as plantas são expostas. Estes efeitos podem ocorrer em apenas uma das fases da fotossíntese ou em ambas. Na fase fotoquímica da fotossíntese, o arsênio pode: interferir em nível da cadeia transportadora de elétrons, levando à diminuição na formação de poder redutor (NADPH) e ATP; ocasionar aumento da emissão de fluorescência ou liberação da energia na forma de calor. Na fase bioquímica da fotossíntese o arsênio pode afetar a condutância estomática, cuja limitação pode restringir a concentração de CO₂ na planta, ou por efeito na atuação da enzima RUBISCO.

Stoeva et al. (2003/4) observaram que o arsênio provocou aumento na fluorescência da clorofila *a* e diminuição considerável na eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm), em plantas de milho, fato que pode estar relacionado a uma atividade reduzida do fotossistema II. Milivojeć et al. (2006) ao estudarem os efeitos do arsênio sobre plantas de soja, observaram que os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* não foram alterados, na presença deste elemento.

Plantas de *Mimosa caesalpinieafolia* apresentaram redução na fotossíntese, transpiração, condutância estomática e ainda nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, em concentrações de arsênio superiores a 1mg L⁻¹. A avaliação das trocas gasosas em plantas tem se mostrado um bom parâmetro na seleção de plantas resistentes ao As (Costa, 2007). Em plantas de feijão, submetidas à diferentes doses de arsênio, houve queda na fotossíntese, na condutância estomática e na taxa transpiratória, acompanhada por diminuição no conteúdo relativo de água e no potencial hídrico de folhas (Stoeva et al., 2005). Em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum*, todos os parâmetros de trocas gasosas foram afetados após exposição ao arsênio, sendo mais intensas as respostas na primeira espécie. Estas reduções ocorreram em função de possíveis danos ocasionados no sistema radicular, que provocaram redução na absorção de íons e de água, acarretando em limitações estomáticas (Nascimento, 2007).

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar as trocas gasosas e a emissão de fluorescência da clorofila *a* em plantas de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Borreria verticillata* (Rubiaceae) e *Cajanus cajan* (Leguminosae), após terem sido submetidas a diferentes doses de arsênio.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material vegetal e condições de cultivo

As espécies utilizadas neste trabalho foram: *Schinus terebinthifolius*; *Borreria verticillata* e *Cajanus cajan*, cultivadas segundo descrição no item 2.2 do capítulo 1.

2.2 – Trocas gasosas

As análises foram realizadas ao final do experimento, no período da manhã. Em *S. terebinthifolius* foram analisadas as folhas entre o quarto e oitavo nós tomando como base o folíolo mediano das folhas, sem sintomas visuais. Em *B. verticillata* as folhas do segundo e terceiro nós foram analisadas,

sendo que as folhas dos três últimos tratamentos apresentavam murcha. Em *C. cajan* o folíolo mediano pertencente às folhas, situadas entre o quarto e quinto nós, foram analisadas e não apresentavam sintomas visuais.

As taxas de assimilação líquida de carbono (A , $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{molH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa transpiratória (E , $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e a concentração de CO_2 no mesofilo (C_i , $\mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$) foram obtidas por meio de um sistema de medição de trocas gasosas portátil LI-6400 (LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA) equipado com uma fonte de luz azul/vermelho modelo LI-6400-02B (LI-COR). As mensurações foram feitas sob concentração de CO_2 , temperatura e vapor de H_2O do ambiente dos locais de estudo, sendo o ar de referência homogeneizado em um galão de 20L antes de alcançar a câmara foliar. Após o coeficiente combinando as variações de gás carbônico (ΔCO_2), água ($\Delta\text{H}_2\text{O}$) e fluxo de ar (Δu_e) ter ficado abaixo de 1%, foram realizados 10 registros por folha, um a cada 12 segundos, cuja média foi considerada uma medida.

2.3 – Parâmetros de fluorescência da clorofila a

Estas análises foram realizadas de maneira coordenada com as análises de trocas gasosas. Ou seja, foram analisadas as mesmas folhas e folíolos tanto para as trocas gasosas quanto para a fluorescência da clorofila a, nas três espécies estudadas.

As medidas de fluorescência da clorofila a foram obtidas utilizando um fluorômetro portátil modulado MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), equipado com uma pinça especial para suporte da folha modelo 2030-B (Bilger et al., 1995, Rascher et al., 2000). O rendimento quântico potencial do fotossistema II (Van Kooten e Snel, 1990) foi calculado após 30 minutos de adaptação ao escuro como $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, em que F_0 é a fluorescência mínima, excitada por uma luz vermelha modulada de baixa intensidade ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e F_m é a fluorescência máxima obtida pela aplicação de um pulso de 0,8s de luz actínica saturante ($>6000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Genty et al., 1989) foi determinado por meio da sobreposição de um pulso de saturação em folhas previamente adaptadas à

luz ambiente, sendo calculado como $\Delta F/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$, onde F é o rendimento de fluorescência antes do pulso de saturação e F_m' a fluorescência máxima durante o pulso de saturação. O $\Delta F/F_m'$ foi utilizado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) de acordo com Bilger et al. (1995): $ETR = \Delta F/F_m' \times DFF \times 0,5 \times 0,84$, onde DFF é a densidade de fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha, 0,5 o valor correspondente à fração da energia de excitação distribuída para o fotossistema II (FSII) (Laisk e Loreto, 1996) e 0,84 o valor correspondente a fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981). O coeficiente de extinção não-fotoquímica de Stern-Volmer foi calculado como $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ (Bilger e Björkman, 1990).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e algumas vezes apresentados como médias e desvio padrão. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$) e quando necessário os dados foram submetidos ao ajuste de modelos de regressão. As análises estatísticas foram realizadas no software SAEG (Euclides, 1983). Para a realização da ANOVA alguns valores foram transformados em raiz quadrada e outros em função logarítmica.

3 - RESULTADOS

3.1 – Efeito de arsênio sobre a fotossíntese

Em *B. verticillata*, a taxa fotossintética (A) (Figura 1A); a condutância estomática (g_s) (Figura 1B) e a taxa transpiratória (E) (Figura 1D) apresentaram redução na dose de 5,0 e 7,5 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$, entretanto, na dose mais elevada, o comportamento foi semelhante ao do controle. A concentração de 7,5 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$ reduziu em 54,44% a (A), 54,87% a (g_s) e 51,1% (E), em relação ao controle. Enquanto que, a relação C_i/C_a oscilou levemente nas diferentes doses de arsênio (Figura 1C) apresentando uma tendência de aumento na dose de 7,5 $\text{mg L}^{-1}\text{As}$.

Em *S. terebinthifolius*, todos os parâmetros de trocas gasosas, foram afetados (Figura 2A-D). Comparando-se o controle e a maior dose de arsênio aplicada, o efeito negativo foi de 69,2% na (g_s) (Figura 2B), que refletiu em 70% em (E) (Figura 2D), 43,4% na relação C_i/C_a (Figura 2C), e 56% em (A) (Figura 2A).

Em *C. cajan*, a menor dose de arsênio foi suficiente para afetar negativamente todos os parâmetros fotossintéticos (Figura 3A-D). A menor dose de arsênio reduziu a (g_s) em 92,3% (Figura 3B), consequentemente, a (E) em 83,69% (Figura 3D), a relação C_i/C_a em 48,49% (Figura 3C) e (A) em 80,4% (Figura 3A).

3.2 – Efeito do arsênio sobre a fluorescência da clorofila a

O arsênio não afetou os parâmetros de fluorescência da clorofila a de *B. verticillata* (Tabela 1).

Em *S. terebinthifolius*, a eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foi de 0,78 na dosagem de 7,5 mg L⁻¹As, enquanto que a fluorescência mínima (F_0) foi maior na dose de 7,5 mg L⁻¹As. Entretanto, a eficiência quântica efetiva do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$), a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), o coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e o coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) não foram alterados após exposição desta planta ao arsênio (Tabela 2).

Em *C. cajan*, a relação F_v/F_m (Figura 4A) e F_0 (Figura 4B) não apresentaram alterações em função do arsênio. Contudo, todos os demais parâmetros de fluorescência foram significativamente alterados na dose mais baixa de arsênio. Ao se comparar o controle com a primeira dose de arsênio aplicada, $\Delta F/F_m'$ (Figura 4C) apresentou redução em 43,75%, a ETR, de 44,5% (Figura 4D) e o qP de 31,6% (Figura 4E). Entretanto, o NPQ aumentou com o aumento da concentração de arsênio na solução (Figura 4F).

4 - DISCUSSÃO

Os dados de trocas gasosas nas folhas das três espécies estudadas indicam uma tendência de diminuição da taxa de fixação do carbono, à medida que a concentração de arsênio na solução foi aumentada. Provavelmente, os efeitos negativos nos parâmetros de trocas gasosas das espécies estudadas sejam devido à distúrbios na entrada e no transporte de água, causadas por alterações no sistema radicular. Entretanto, houve variação no efeito do arsênio entre as espécies estudadas.

Em *S. terebinthifolius* e *B. verticillata*, a redução nas trocas gasosas, provavelmente, pode estar relacionada à queda na g_s , com diminuição na fixação de carbono e da transpiração. Contudo, em *S. terebinthifolius* foi verificada uma queda na condutância estomática, concomitante à queda de C_i/C_a . A relação C_i/C_a integra as respostas estomáticas e metabólicas do processo fotossintético. Normalmente, a concentração de CO_2 no ambiente é constante e a C_i varia em função da demanda de CO_2 no mesofilo (Mott, 1998). Redução em C_i/C_a está associada à redução na condutância estomática ou a aumento na taxa fotossintética. A redução na relação C_i/C_a , observada em *S. terebinthifolius* ocorreu, provavelmente, em função de uma queda na condutância estomática, uma vez que a fotossíntese foi afetada negativamente. Além disso, a análise da folha destas plantas, em microscopia eletrônica de varredura, mostrou danos estruturais nos estômatos que, podem ter afetado o funcionamento dos mesmos.

Em *B. verticillata*, a relação C_i/C_a não sofreu alteração. Desta forma, a queda na condutância estomática não foi suficiente para restringir a concentração de CO_2 no mesofilo destas plantas ou o consumo de CO_2 não está acontecendo no ciclo do Calvin, provavelmente em função de algum dano bioquímico na fotossíntese. Em *Mimosa caesalpinieafolia*, os níveis de C_i/C_a foram mantidos mesmo com uma queda na condutância estomática, podendo ser um indicativo de que além dos danos no sistema radicular, o arsênio provocou danos diretos no processo de fixação do CO_2 (Costa, 2007). Entretanto, em *B. verticillata* esta possibilidade seria diminuída, uma vez que após recuperação da condutância estomática houve aumento na fotossíntese, nas plantas submetidas a maior dosagem de arsênio.

Contudo, *S. terebinthifolius* apresentou maior sensibilidade ao arsênio que *B. verticillata*. Nesta última, a redução na condutância estomática (g_s) aconteceu na dosagem de $7,5 \text{ mg L}^{-1}\text{As}$, reduzindo assim a fotossíntese e a transpiração. Diferentemente de *S. terebinthifolius*, que teve a fotossíntese afetada na menor dosagem de arsênio ($2,5 \text{ mg L}^{-1}\text{As}$), em *B. verticillata*, na dosagem de $10 \text{ mg L}^{-1}\text{As}$ ocorreu uma recuperação, em todos os parâmetros citados anteriormente, com valores equiparados aos do controle. Uma possível explicação é que os danos ocasionados na arquitetura dos estômatos, acarretaram perda da capacidade de controlar a entrada de CO_2 . Sem este controle ocorreu entrada indiscriminada de CO_2 , aumentando tanto a fotossíntese quanto a transpiração, na maior dose de arsênio aplicada. A análise micromorfológica das folhas destas plantas (Tab.1 / Cap.2) mostrou danos estruturais evidentes, especialmente, na maior dose de arsênio, cuja espessura da epiderme da face abaxial da folha ficou comprometida. Ressalta-se ainda, a importância de estudos integrados de anatomia e fisiologia na interpretação das respostas de plantas a diversos poluentes.

Apesar de ter ocorrido redução na fotossíntese, o crescimento de *B. verticillata* não foi influenciado com a presença do arsênio na solução (Fig.1 / cap.1). Este resultado pode ser explicado pelo tempo de exposição destas plantas ao arsênio, que foi curto, apenas dez dias, não tendo sido suficiente para afetar os parâmetros de crescimento e a concentração de CO_2 interno no mesófilo.

Em *B. verticillata*, o fato do arsênio não ter afetado significativamente os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* mostrou que os efeitos ocasionados pelo arsênio foram, provavelmente, em função do decréscimo da condutância estomática. Resultado semelhante foi obtido em plantas de soja expostas ao arsênio (Milivojevic et al., 2006) e em plantas de *Canavalia ensiformis* e *Stizolobim aterrimum* (Nascimento, 2007).

Em *S. terebinthifolius*, foi possível observar ligeira queda na relação F_v/F_m , acompanhada de pequeno aumento na fluorescência mínima (F_0), enquanto que os demais parâmetros de fluorescência não foram alterados. Stoeva et al. (2003/4) observaram queda na F_v/F_m e aumento no F_0 em milho sob doses de arsênio, o que indicou redução na atividade funcional do fotossistema II. Em *S. terebinthifolius*, entretanto, estas alterações foram

características de fotoinibição reversível uma vez que, em todos os tratamentos, a relação F_v/F_m ficou em torno de 0,8, valor mencionado ser ótimo para a maioria das plantas (Maxwell e Johnson, 2000).

O efeito do arsênio em *C. cajan* foi muito acentuado, uma vez que foi verificada uma queda pronunciada na condutância estomática, concomitante à queda de C_i/C_a , com redução na fotossíntese e transpiração, na menor dose de arsênio aplicada. Contudo, provavelmente, esta queda pode ser explicada não apenas em função da queda na condutância estomática, mas num somatório de efeitos simultâneos, pois a análise dos dados de fluorescência em *C. cajan*, também mostrou alterações acentuadas na primeira dose de arsênio utilizada. Alterações nos parâmetros da fluorescência podem estar associadas ao déficit hídrico nas folhas (Stoeva et al., 2003/4) ou à ação direta do arsênio. Uma queda no qP , ETR e $\Delta F/F_m'$, juntamente com o aumento do NPQ, indica que a maior parte de energia de excitação foi dissipada em processos não fotoquímicos (Maxwell e Johnson, 2000).

Entretanto, em *C. cajan*, a fluorescência mínima (F_0) e a eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) não sofreram alterações em função do arsênio, indicando que os danos no fotossistema II promovido pelo arsênio foram reversíveis. Resultados semelhantes foram obtidos por Costa (2007), em *Mimosa caesalpineafolia* e *Psidium guineense*.

O efeito do arsênio na fotossíntese de *C. cajan* está no fato de que o ETR e $\Delta F/F_m'$ sofreram queda. Alterações na ETR e no $\Delta F/F_m'$ indicam que o fluxo de elétrons foi alterado. Consequentemente, o gradiente de prótons do tilacóide foi comprometido, interferindo na ação da próton ATP sintase, que utiliza deste gradiente para a formação de ATP. A restrição de poder redutor, da fase fotoquímica, limita o consumo de CO_2 no ciclo de Calvin afetando a fase bioquímica, provocando queda na fixação de CO_2 . Mudanças no $\Delta F/F_m'$ e no qP , apontam que altas concentrações de arsênio provocam mudanças no potencial redox do *pool* de plastoquinona (Milivojevic et al., 2006). A alteração no *pool* de plastoquinona tem sido relatada também para outros metais, tais como cobre, níquel, cádmio, cromo e zinco (Mallick e Mohn, 2003).

O aumento do NPQ pode estar relacionado ao gradiente de ΔpH que ativa o ciclo das xantofilas. Em *C. cajanus*, ocorreu aumento do NPQ, sem apresentar danos no fotossistema II. Este aumento pode ter sido em função do

qE (*quenching* dependente de energia) , pois o arsênio, ao desacoplar o fluxo de energia na célula, pode ter contribuído para o aumento do ΔpH através das membranas do tilacóide, o que promoveria aumento de NPQ via indução de qE. Resultado semelhante foi encontrado em *Mimosa caesalpiniaefolia* e em *Psidium guineense* (Costa, 2007).

5 - CONCLUSÕES

- As taxas fotossintéticas das espécies estudadas variaram de acordo com a concentração de arsênio aplicada.

- A menor dose de arsênio foi suficiente para inibir a fotossíntese, tanto nas trocas gasosas, quanto os parâmetros de fluorescência da clorofila a de *C. cajan*, mostrando alta sensibilidade desta espécie a este elemento.

- Em *S. terebinthifolius* e *B. verticillata* os danos causados na fotossíntese, pelo arsênio, foram provavelmente ocasionados pela queda na condutância estomática, sendo *S. terebinthifolius* mais sensível.

- Os parâmetros de fluorescência da clorofila a não foram alterados em *B. verticillata* e sofreram alterações características de uma fotoinibição reversível em *S. terebinthifolius*.

.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. 1990. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research**, 25:173-185

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, 102:425-432

CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; BURLÓ, J. F.; BURGOS-HERNKDEZ, A.; LOPEZ, E.; MATAIAX, A. 1997. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Scientia Horticulturae**, 71:167-176

COSTA A. C. 2007. **Bases fisiológicas da ação do arsênio em algumas espécies de cerrado**. Tese de doutoramento do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 78p.

EHLERINGER, J. 1981. Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. **Oecologia**, 102: 366-370

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

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, 990:87-92

JAIN, M.; GADRE, R. P. 1997. Effect of As on chlorophyll and protein contents and enzymic activities in greening maize tissues. **Water, Air, and Soil Pollution**, 93: 109-115

LAISK, A.; LORETO, F. 1996. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology**, 110:903-912

MALLICK, N.; MOHN, F. H. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 55(1): 64-69.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, 51(345): 659-668

MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, 154: 29–43

MILIVOJEVIC, D. B.; NIKOLIC, B. R.; DRINIC, G. 2006. Effects of arsenic on phosphorus content in different organs and chlorophyll fluorescence in primary leaves of soybean. **Biologia Plantarum**, 50(1): 149-151

MOTT, K. A. 1988. Do stomata respond to CO₂ concentrations other than intercellular? **Plant Physiology**, 86:200-203

NASCIMENTO, K. J. T. 2007. **Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. 36p.

RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H.; RAHMAN, M. M.; ISLAM, M. N.; MIAH, M. A. M.; TASMEN, A. 2007. Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. **Chemosphere**, 67(1): 1072-1079.

RASCHER, U.; LIEBIG, M.; LUTTGE, U. 2000. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. **Plant, Cell and Environment**, 23:1397-1405

ROSEN, B. P. 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, 529: 86-92

STOEVA, N.; BEROVA, M.; ZLATEV, Z. 2003/4. Physiological response of maize to arsenic contamination. **Biologia Plantarum**, 47(3):449-452

STOEVA, N.; BEROVA, M.; ZLATEV, Z. 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. **Biologia Plantarum**, 49(2): 293-296

VAN KOOTEN, O.; SNEL, J. F. H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, 25: 147-150

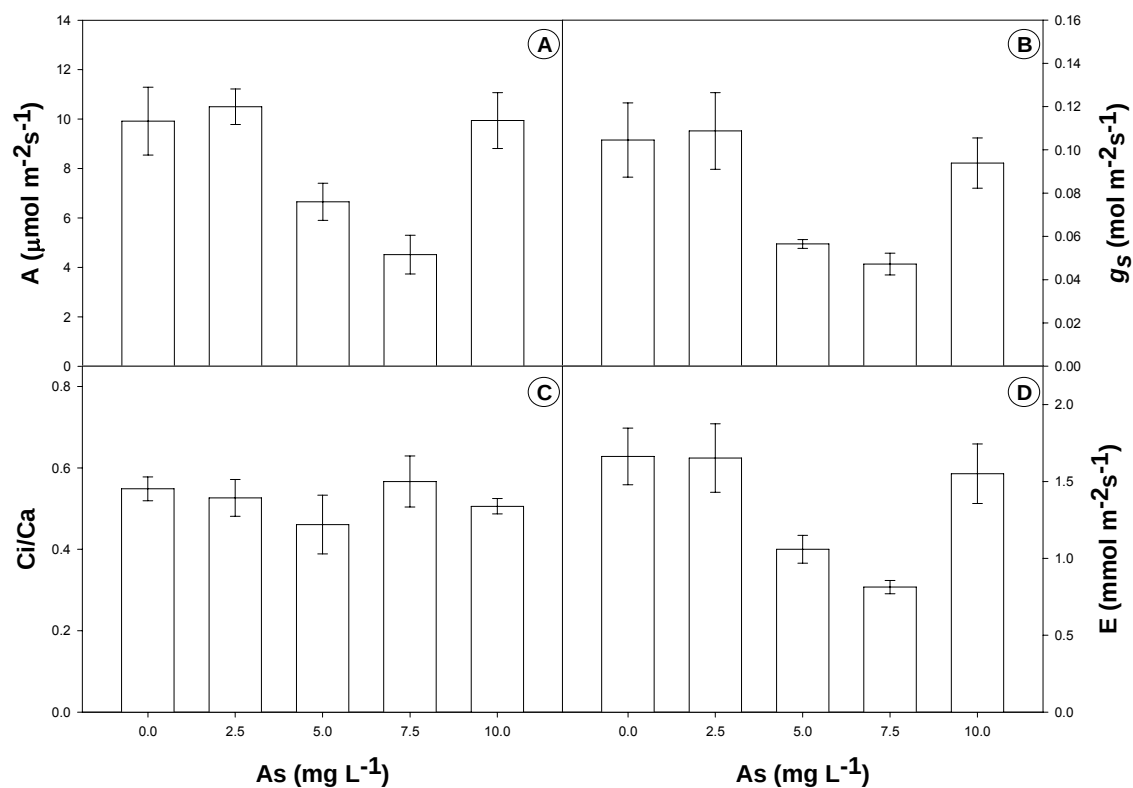


Figura 1. Efeitos do arsênio sobre os parâmetros de trocas gasosas de *Borreria verticillata* **A-** taxa fotossintética (A); **B-** condutância estomática (g_s); **C-** relação entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a); **D-** taxa transpiratória (E). Os dados são médias e o desvio padrão (n=4).

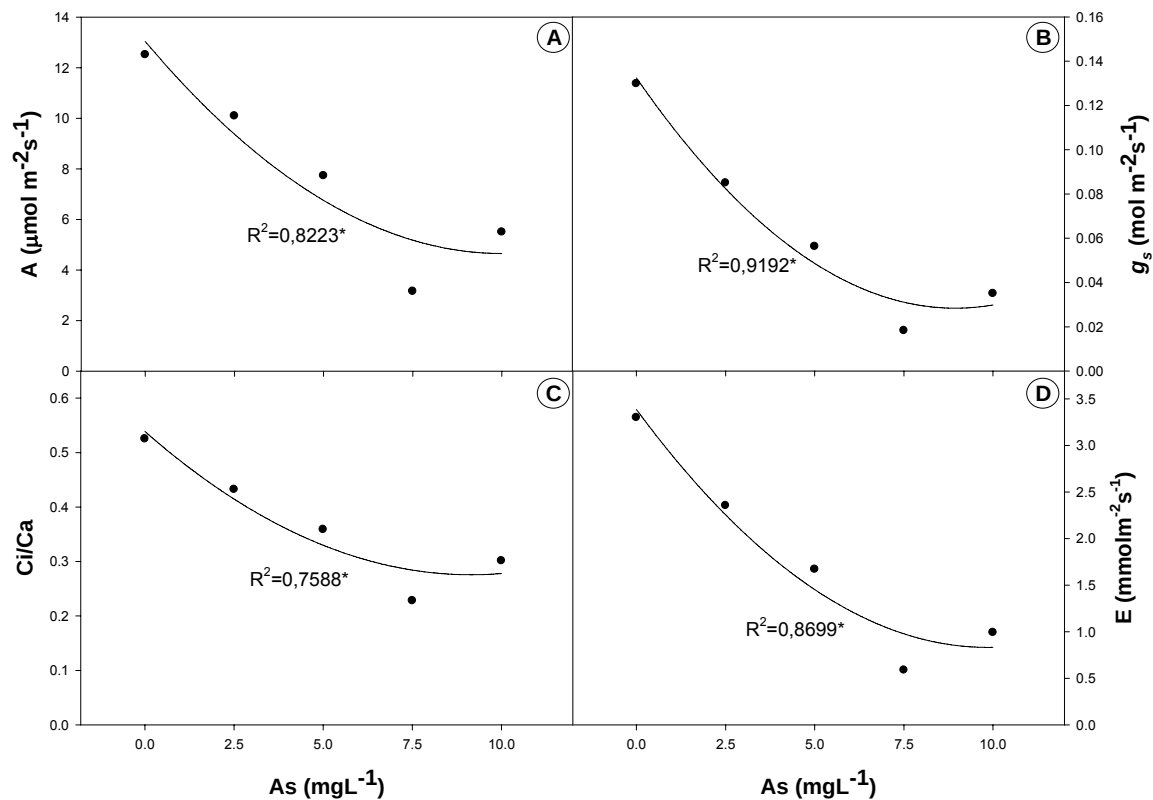


Figura 2. Efeito do arsênio sobre os parâmetros de trocas gasosas de *Schinus terebinthifolius*. **A-** taxa fotossintética (A); **B-** condutância estomática (g_s); **C-** relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a); **D-** taxa transpiratória (E). Em todos os parâmetros o modelo de regressão ajustado foi o polinomial quadrático. Significância $*p < 0,05$.

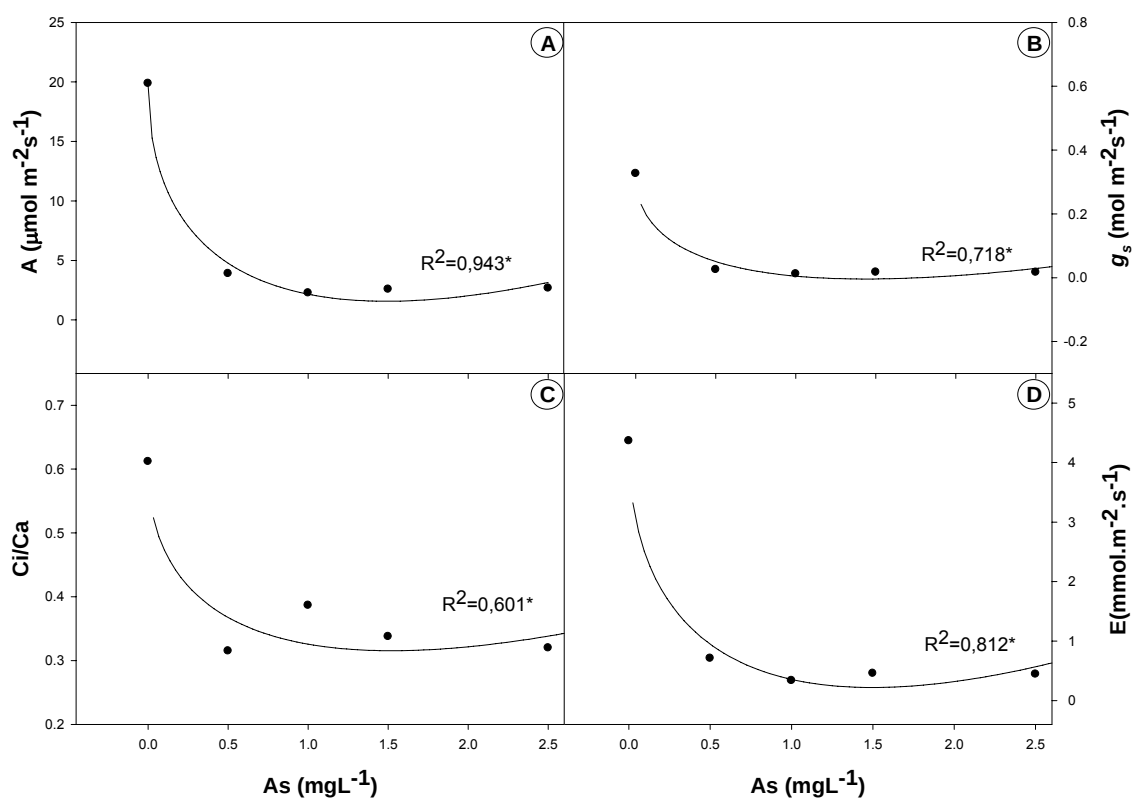


Figura 3. Efeito do arsênio sobre os parâmetros de trocas gasosas de *Cajanus cajan*. **A-** taxa fotossintética (A); **B-** condutância estomática (g_s); **C-** relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a); **D-** taxa transpiratória (E). Em todos os parâmetros o modelo de regressão ajustado foi o raiz quadrada. Significância $*p < 0,05$.

Tabela 1- Efeito do arsênio sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila a de *Borreria verticillata*

Arsênio (mg L ⁻¹)	F ₀ ^{ns}	Fv/Fm ^{ns}	ΔF/Fm' ^{ns}	ETR ^{ns}	qP ^{ns}	NPQ ^{ns}
0	223,25a	0,817a	0,426a	183,93a	0,641a	1,284a
2,5	228,5a	0,812a	0,428a	180,78a	0,637a	1,127a
5,0	224,25a	0,816a	0,366a	158,30a	0,589a	1,728a
7,5	241,5a	0,806a	0,326a	140,68a	0,516a	1,465a
10,0	214,5a	0,818a	0,407a	174,78a	0,606a	1,253a
CV(%)	8,46	1,27	14,86	15,15	9,96	34,38

(^{ns}) não significativo a 5% pelo teste de F. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. F₀: fluorescência mínima; Fv/Fm: eficiência quântica máxima do fotossistema II; ΔF/Fm': eficiência quântica efetiva do fotossistema II; ETR: taxa aparente de transporte de elétrons; qP: coeficiente de extinção fotoquímica; NPQ: coeficiente de extinção não fotoquímica.

Tabela 2- Efeito do arsênio sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila a de *Schinus terebinthifolius*

Arsênio (mg L ⁻¹)	F ₀ [*]	Fv/Fm [*]	ΔF/Fm' ^{ns}	ETR ^{ns}	qP ^{ns}	NPQ ^{ns}
0	255,63ab	0,81a	0,35a	178,10a	0,56a	1,66a
2,5	255,75ab	0,81a	0,35a	180,65a	0,58a	1,77a
5,0	252,63b	0,80a	0,27a	136,23a	0,48a	2,18a
7,5	283,63a	0,78b	0,26a	135,33a	0,52a	2,45a
10,0	264,50ab	0,79ab	0,28a	144,18a	0,51a	2,15a
CV(%)	4,951	1,14	17,48	17,01	11,16	24,72

(^{*}), (^{ns}) Significativo e não significativo, respectivamente, a 5% pelo teste de F. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. F₀: fluorescência mínima; Fv/Fm: eficiência quântica máxima do fotossistema II; ΔF/Fm': eficiência quântica efetiva do fotossistema II; ETR: taxa aparente de transporte de elétrons; qP: coeficiente de extinção fotoquímica; NPQ: coeficiente de extinção não fotoquímica.

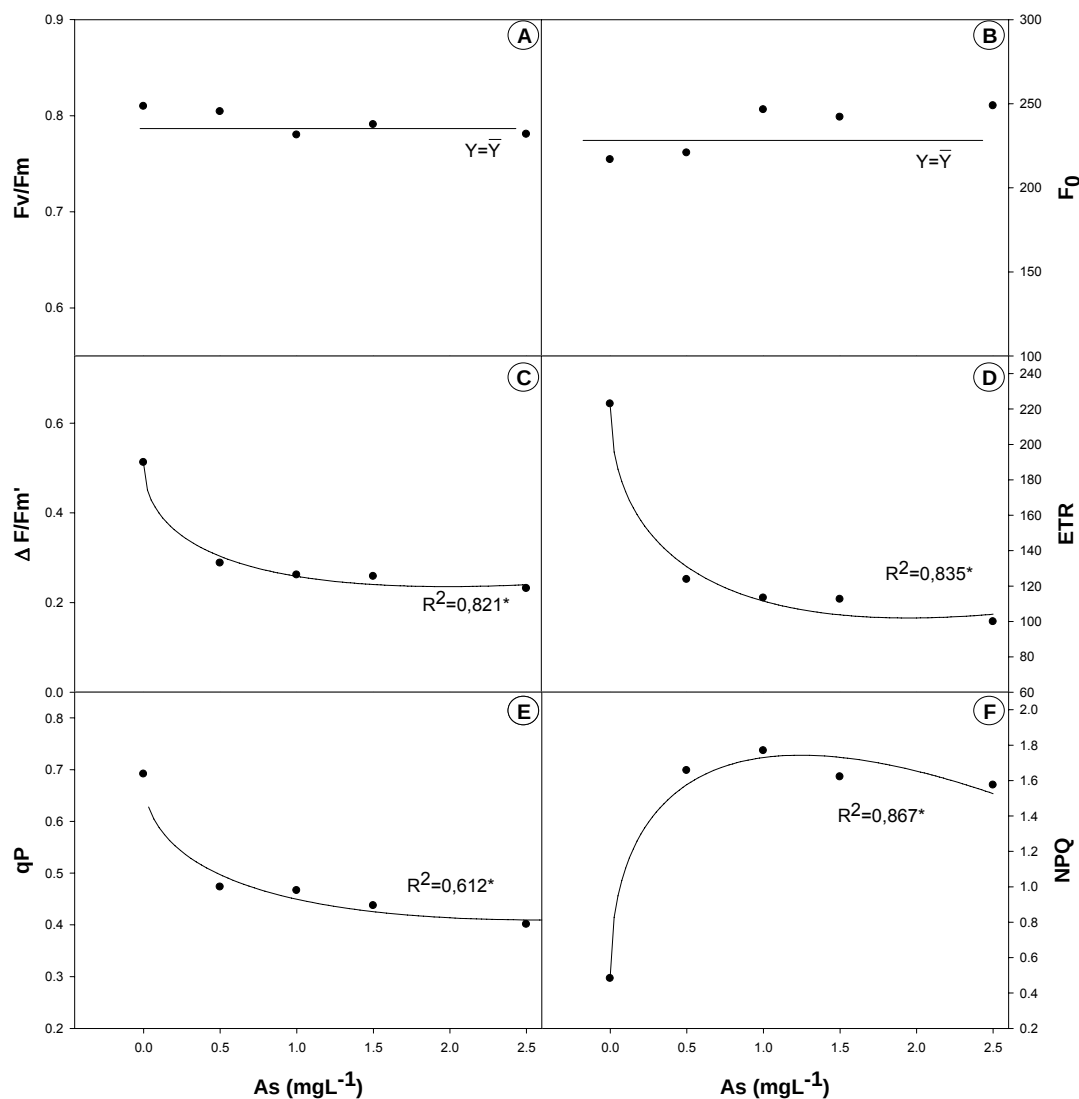


Figura 4. Efeito do arsênio sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* de *Cajanus cajan*. **A-** eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm); **B-** fluorescência mínima (F₀); **C-** eficiência quântica efetiva do fotossistema II (ΔF/Fm'); **D-** taxa aparente de transporte de elétrons (ETR); **E-** coeficiente de extinção fotoquímica (qP); **F-** coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ). Em todos os parâmetros o modelo de regressão ajustado foi o raiz quadrada. Significância *p<0,05.

CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo mostrou que as três espécies apresentaram respostas diferentes nos diversos parâmetros analisados.

B. verticillata apresentou alta capacidade de absorver e translocar arsênio sem apresentar alterações no incremento de sua biomassa, mas apresentou alterações anatômicas e fisiológicas que necessitam de estudos posteriores para afirmar se esta espécie apresenta realmente, características para ser utilizada em recuperação de áreas contaminadas por este poluente. Sugere-se alterar as doses aplicadas de arsênio e aumentar o tempo de exposição a este elemento e ainda realizar um estudo de especiação do arsênio na raiz e na parte aérea, para investigar os mecanismos de tolerância destas plantas ao arsênio, uma vez que a maior parte do arsênio absorvido foi translocado para parte aérea.

A anatomia mostrou-se uma importante ferramenta, pois antecedeu os sintomas macroscópicos. Entretanto, não foi possível observar um marcador estrutural específico, relacionado à tolerância do arsênio, uma vez que as principais alterações observadas foram também descritas para outros poluentes. Não houve uma relação direta entre a concentração de arsênio e os danos anatômicos visualizados, uma vez que os sintomas foram mais severos nas folhas e apenas *B. verticillata* translocou o poluente para parte aérea. Em contrapartida, em todas as espécies, grande quantidade de arsênio foi encontrado nas raízes, mas os danos estruturais neste órgão não foram muito expressivos. Atribui-se assim, os sintomas das folhas a efeitos indiretos, como o estresse hídrico que este poluente provocou, em função de ter influenciado negativamente o crescimento das raízes e a diferenciação das raízes laterais, prejudicando a absorção de água e nutrientes pela planta.

O teste histoquímico para detecção de arsênio não foi conclusivo, necessitando de outras análises para sua interpretação. A histolocalização do arsênio, provavelmente, sofreu interferência de outros compostos presentes nas células, como os compostos fenólicos. O fato do teste histoquímico não ter sido eficiente, impediu a verificação de um possível sítio de acúmulo do arsênio nas raízes e folhas, das espécies estudadas neste trabalho. Sugere-se a

realização de teste para detecção e quantificação de compostos fenólicos para comparar com o teste de histolocalização de arsênio.

As respostas fisiológicas das plantas variaram de acordo com a espécie e com a concentração de arsênio aplicada. Em *C. cajan*, tanto as trocas gasosas quanto a fluorescência da clorofila *a* foram afetadas após exposição destas plantas ao arsênio, mostrando que a sensibilidade desta espécie se dá em ação direta e indireta do arsênio. Em *S. terebinthifolius* e *B. verticillata*, os danos causados na fotossíntese, pelo arsênio, foram provavelmente em função da condutância estomática, sendo a primeira mais sensível, pois os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* não foram alterados em *B. verticillata* e sofreram alterações características de uma fotoinibição reversível em *S. terebinthifolius*.