

**ALICE PITA BARBOSA**

**EFEITOS DO ARSÊNIO EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE**  
***Cajanus cajan* (L.) DC (FABACEAE)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL

2009

**ALICE PITA BARBOSA**

**EFEITOS DO ARSÊNIO EM RAÍZES DE PLÂNTULAS DE  
*Cajanus cajan* L. (DC) (FABACEAE)**

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

APROVADA: 9 de março de 2009.

---

Dra. Kellen Lagares Ferreira Silva

---

Dra. Luzimar Campos da Silva

---

Dra. Renata Maria Strozi Alves Meira  
(Co-orientadora)

---

Dr. Wagner Campos Otoni

---

Dra. Aristéa Alves Azevedo  
(Orientadora)

Aos meus avós (*in memoriam*), Navantino e Estherina,  
e aos meus pais, Fernando e Elioni, por me mostrarem  
que a honestidade, humildade e perseverança constituem  
o caminho mais sábio para alcançar as vitórias pretendidas.

*“Na imensurável extensão do tempo, vê-se que a vida se move para frente e para cima, dos infusórios ao homem, e não se pode negar que infinitas possibilidades de maior perfeição ainda aguardam a humanidade.”*

Thomas Mann

*“A vida está cheia de um potencial verdadeiramente incompreensível (...) na maioria dos casos, nossas ditas limitações nada mais são que nossa própria decisão de nos limitarmos.”*

Daisaku Ikeda

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, presente em todas as formas de vida, verdadeiros milagres.

Aos meus pais e ao Rômulo, meu irmão, pelo carinho, confiança, incentivo e assistência diária, o que os mantiveram bem próximos, dentro do meu coração, apesar da distância física. Agradeço também pela concessão de bolsas da “Papes” e “Papemig”!

À Universidade Federal de Viçosa, onde há muito tempo sonhei em estudar e acabei desfrutando de agradáveis momentos nesse lindo campus. Agradeço, em particular, ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-graduação em Botânica, pela oportunidade concedida.

À minha orientadora, Aristéa Alves Azevedo, pela confiança, em primeiro lugar. Seu amor pela botânica, unido ao seu profissionalismo, faz dela um exemplo que quero levar comigo para o resto da vida. Às demais professoras do laboratório de Anatomia Vegetal: Luzimar, Marília e Renata, pela agradável convivência e por estarem sempre dispostas a ajudar. Agradeço à D. Edite, técnica responsável pelo lab. de Anatomia Vegetal, prova viva de que a experiência aliada à boa vontade sempre funciona.

À Unidade de Crescimento de Plantas (UCP/UFV), onde conduzi, ao todo, seis experimentos e, portanto, passei grande parte do meu tempo. Agradeço ao Prof. Marco Oliva, por ter me disponibilizado toda a infra-estrutura e pela atenção concedida. Ao Gomide (verdadeiro “Inspetor Bugiganga”), com suas idéias brilhantes e ao João, pela disposição em ajudar sempre que necessário.

À cidade de Viçosa, que hoje posso chamar de “minha cidade”. Com o passar do tempo, esta cidade ensinou-me que o ideal é viver um dia de cada vez.

Aos colegas que ingressaram junto comigo no mestrado em Botânica, grandes companheiros de estudos e de risadas: Advanio, Victor, Claudinéia, Patrícia F. e Flávia (esta última, companheira durante os almoços no laboratório via tele-marmitex!). Um agradecimento especial à Letícia e à Rúbia, que se tornaram grandes amigas, sempre presentes nos momentos alegres e difíceis e dispostas a escutar os meus lamentos do tipo: “porque a vida é tão dura comigo?”. Mentira isso... tenho é que agradecer!

A Kellen Lagares, minha primeira orientadora, por ter me apresentado a Anatomia Vegetal. Sou muito grata pela confiança depositada em mim e a vejo como

um exemplo de que, com persistência, tudo pode ser alcançado. Ao Bruno, por ter me passado um pouco de sua experiência como pesquisador nato que é.

Às amigas da minha república: Adriana, Camila, Luciana e Solange, pelo companheirismo e amizade adquiridos ao longo do tempo. É muito bom conviver diariamente com pessoas com as quais nos damos muito bem. A amizade demorou, mas aflorou.

Ao Sr. Dilermando Oliveira, funcionário da Embrapa - CNPMS, por ter sido tão prestativo e ágil ao me fornecer as sementes de feijão-guandu utilizadas neste estudo.

Ao Elton, meu braço direito durante os experimentos em casa de vegetação e no processamento do material, em laboratório. Além da parceria profissional, hoje posso dizer que, “graças ao arsênio”, a “chefinha” ganhou um grande amigo.

Ao Pity, pelo suor gasto peneirando areia para a semeadura e pelos neurônios queimados tentando entender qual animal estava predando as minhas plantinhas que, segundo ele, “aparentavam ser deliciosas”. Ao “irmão” Zenzen pelo interesse em me ajudar sempre, apesar da correria com as disciplinas “fisiologicamente moleculares”.

Ao Dudu e ao Clenilso, por terem tirado uma parte do seu tempo para me auxiliar com as análises estatísticas e confecção dos gráficos.

Ao Nando, por ter apoiado muito a minha vinda para Viçosa, por saber que este era a realização de um sonho meu que poderia destruir os dele próprio e por sempre ter se orgulhado muito da pessoa que sou, do jeito que sou. À D. Carminha (*in memoriam*) e Sr. Francisco, que me mostraram que a beleza da vida está nos olhos de quem vê e que esta depende só da forma como optamos por vivê-la. Nunca vou esquecer-los!

Aos meus queridos avós, Chiquito e Marluce, à tia Fafá, ao padrinho Ronaldo e à minha afilhada Larissa, por serem umas das pessoas que mais me deram amor durante a minha vida e que amo muito, assim como à tia Whitney e ao tio Carlos, os quais admiro pela inteligência e bom humor. E um muito obrigado a todos pelo comparecimento no seminário de defesa do presente trabalho.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para que hoje eu me tornasse a pessoa que sou, tanto no âmbito profissional, mas, especialmente, no pessoal. Como costumo dizer: “*Somos como rochas de cachoeiras, moldados continuamente pelas águas que passam por nós*”. Je vous remercie beaucoup!

## BIOGRAFIA

Alice Pita Barbosa, filha de Fernando Luiz Vaula Barbosa e Elioni Domingues Pita Barbosa, natural de Mirafá/MG, nasceu em 21 de maio de 1985.

Em março de 2003 ingressou no curso de Ciências Biológicas, no Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, em Coronel Fabriciano, onde obteve o título de Bacharel em Biologia da Conservação, em dezembro de 2006.

Em março de 2007, iniciou o Mestrado em Botânica, com ênfase em Anatomia Vegetal, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Realizou o trabalho de dissertação intitulado “Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae)”, submetendo-se à defesa em março de 2009.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	01
JUSTIFICATIVA .....	03
OBJETIVOS GERAIS .....	04
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	04
CAPÍTULO 1: Efeitos do arsênio no crescimento e estrutura anatômica de raízes de plântulas de <i>Cajanus cajan</i> (Fabaceae) .....	08
RESUMO .....	08
ABSTRACT .....	09
INTRODUÇÃO .....	10
MATERIAL E MÉTODOS .....	11
Condições de cultivo e delineamento experimental .....	11
Crescimento e desenvolvimento radicular .....	12
Análises anatômicas .....	13
Análises estatísticas .....	14
RESULTADOS .....	14
Efeitos do arsênio no crescimento e desenvolvimento radicular .....	14
Alterações anatômicas causadas pelo arsênio .....	15
DISCUSSÃO .....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	20
CAPÍTULO 2: Efeitos do arsênio, durante um curto período de exposição, no desenvolvimento inicial de raízes de plântulas de <i>Cajanus cajan</i> (Fabaceae): caracterização estrutural, histoquímica e de genotoxicidade .....	29
RESUMO .....	29
ABSTRACT .....	30
INTRODUÇÃO .....	31
MATERIAL E MÉTODOS .....	32
RESULTADOS .....	34
DISCUSSÃO .....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
CONCLUSÕES GERAIS .....	50

## RESUMO

BARBOSA, Alice Pita. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae).** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo. Co-orientadores: Renata Maria Strozi Alves Meira e Rogério Ferreira Ribas.

A contaminação ambiental por arsênio (As) constitui um problema sério em várias regiões do mundo, visto que este elemento apresenta elevada toxicidade para os seres vivos. Metodologias físico-químicas para detecção deste poluente no ambiente são bastante laboriosas, sendo o uso de espécies vegetais sensíveis uma boa alternativa para processos de bioindicação. Avaliações dos efeitos tóxicos do As em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (Fabaceae) foram realizadas após exposição ao poluente. Para isso, procedeu-se a análise do crescimento das raízes laterais e principal; caracterização anatômica, incluindo análises micromorfométricas e histoquímica; e avaliação da genotoxicidade, por meio da determinação do índice mitótico. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas da Universidade Federal de Viçosa. No primeiro experimento, plântulas de *C. cajan* foram expostas, em solução nutritiva, às concentrações de 0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, na forma de arsenato de sódio, durante dez dias consecutivos. No experimento posterior foram utilizadas as concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As e a exposição teve duração de três dias. A sensibilidade de *C. cajan* foi confirmada. Verificou-se que o As promoveu redução no crescimento da raiz principal e das laterais, estas últimas não visualizadas no tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As. Contudo, microscopicamente, foi possível notar que os primórdios foram formados, mas permaneceram retidos no córtex. Notou-se que as raízes adquiriram aspecto gelatinoso e coloração escurecida com o passar do tempo de exposição. Também foram detectados problemas na formação da coifa e encurvamento do ápice radicular. A anatomia mostrou ser uma ferramenta eficiente na detecção da sensibilidade de *C. cajan*. Alterações anatômicas mais severas, como desintegração tecidual, nas regiões adjacentes às raízes laterais, na zona de ramificação, sugerem que esta possa ser uma importante via de entrada do poluente. Nessa mesma região células do felogênio e do câmbio apresentaram formato e planos de divisão incomuns, o que acarretou a formação de um xilema secundário assimétrico. Na zona de alongamento foram observadas células com formato alterado, indicando perda

de turgidez celular. O As promoveu aumento na proporção ocupada pelo cilindro vascular, redução na proporção de espaços intercelulares no córtex, em função do maior adensamento celular nessa região, e também redução na área, em secção transversal, dos elementos de vaso. O teste histoquímico revelou acúmulo de compostos fenólicos na região do cilindro vascular e acúmulo de pectinas ao redor da raiz, possivelmente em função da ocorrência de alterações na composição química e/ou da estrutura da parede celular. A determinação do índice mitótico nos ápices radiculares evidenciou que o As apresenta elevado grau de genotoxicidade, uma vez que houve um decréscimo no número de células em divisão mitótica com o incremento de As na solução nutritiva. Esse fator, aliado à redução nas taxas de alongamento celular, observada nas células corticais, são fatores que explicam a redução nas taxas de crescimento radicular.

## ABSTRACT

BARBOSA, Alice Pita. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2009. **Arsenic's effects in seedlings of *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae) roots.** Adviser: Aristéa Alves Azevedo. Co-advisers: Renata Maria Strozi Alves Meira and Rogério Ferreira Ribas.

Environmental contamination by arsenic (As) is a serious problem in several regions of the world due to the high toxicity of this element. Physical-chemical methods for detection of this pollutant in the environment are quite laborious, and the use of susceptible plant species as bioindicators should be a good alternative. Assessments to the toxic effects of As in roots of seedlings of *Cajanus cajan* (Fabaceae) were performed after exposure of this plant to the pollutant. Growth analysis were taken for lateral and main roots, as well as anatomical characterization, including micromorphometrical analysis, histochemistry, and assessment of genotoxicity via mitotic index determination. The experiments were conducted under greenhouse condition, at the Plant Growth Unit of the Universidade Federal de Viçosa. In the first experiment, seedlings of *C. cajan* were grown for ten consecutive days in nutrient solutions containing 0.0 and 1.5 mg L<sup>-1</sup> of As, in the form of sodium arsenate. In the second experiment, seedlings were grown for three days, in nutrient solutions containing 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup> of As. The sensitivity of *C. cajan* was confirmed. It promoted the reduction in growth of main and lateral roots. Lateral roots were not even seen in the treatment containing 2.0 mg L<sup>-1</sup> of As. However, it was possible to observe microscopically roots but kept retained in the cortex. Moreover, roots showed a gelatinous and dark appearance, which increased with time exposure. The cap and bending of the root apex also showed developmental alterations. The anatomy technique has proved to be an effective tool in detecting the sensitivity of *C. cajan* to As. Severe anatomical changes, such as disintegration tissue, in particularly in the areas adjacent to the lateral roots in the zone of branching, suggested that this pathway may be an important route of entrance of the pollutant. In this same region, cells from the felogen and the cambium showed uncommon division plans, which led to an asymmetric secondary xylem. In the elongation cell zone it was observed cells of different shapes, indicating loss of cell turgidez. It was observed an increase in the proportion occupied by the vascular cylinder and a reduction in the proportion of intercellular spaces in the

cortex due to a higher cells density in this region. It was also detected a reduction in area of vessels elements, in cross section. The hystochemical test revealed accumulation of phenolic compounds in the vascular cylinder and accumulation of pectins around the root, possibly due to occurrence of changes in chemical composition and/or due to structure of the cell wall. The determination of mitotic index in root apices showed that As presents high degree of genotoxicity, since there was a decrease in the number of cells in mitotic division with the increase of As in nutrient solution. This factor, combined to the reduction in the rate of cell elongation observed in cortical cells, are factors that explain the reduction in rates of root growth.

## INTRODUÇÃO GERAL

O arsênio (As) é um metalóide cuja oxidação pode resultar em arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ), arsenito ( $\text{As}^{+3}$ ) e arsina ( $\text{As}^{-3}$ ) (Simon et al., 1999) e pode ocorrer tanto na forma orgânica, quanto na inorgânica (WHO, 2001). Geralmente, o grau de toxicidade de diferentes formas de As segue a seqüência: arsenito > arsenato > formas orgânicas, como o ácido monometilarsênico (MMA) e o ácido dimetilarsênico (DMA) (Adriano, 2001). O arsenato é a forma predominante do As na natureza, visto que o arsenito é facilmente oxidado pelo oxigênio atmosférico (Pepper et al., 1987). Vale ressaltar que a forma elementar do As não ocorre naturalmente no ambiente e não é solúvel em água (WHO, 2001).

O As está presente em mais de duzentos minerais, destacando-se o realgar ( $\text{AsS}$ ), ouropigmento ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ) e arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) (WHO, 2001; Mandal & Suzuki, 2002). Dessa forma, atividades antropogênicas, como a mineração de ouro, são as que mais contribuem para a liberação de elevadas taxas de arsênio para o ambiente. A mineração é uma das atividades econômicas mais importantes no Brasil, tendo papel de destaque no estado de Minas Gerais (Daus et al., 2005). Além da mineração, atividades agrícolas e industriais, tais como aplicação de pesticidas (Folkes et al., 2001), preservação de madeiras (Hingston et al., 2001), manufatura de vidro e fundição de metais contribuem para o aumento dos níveis de As no ambiente (Smith et al., 1998).

Altas concentrações de arsênio nos solos ocorrem naturalmente apenas localmente; em áreas industriais, o acúmulo de elevadas concentrações desse poluente pode gerar grandes perturbações ambientais (Smith et al., 1998). Além disso, a mobilidade do As ao longo do perfil do solo é mínima, o que significa que o poluente é mantido principalmente na superfície. Entretanto, quando o As é concentrado em esgotos e aterros, ele se torna móvel e se movimenta através dos aquíferos sedimentares, contaminando as águas subterrâneas (Anawar et al., 2003; Bhattacharya et al., 2002; Ahmed et al., 2004). Da mesma forma, a lixiviação de solos contaminados por As pode favorecer sua entrada na cadeia trófica (Mello et al., 2006), principalmente através da ingestão de água contaminada, citada como a forma mais comum de contaminação por As no homem (Matschullat et al., 2000).

Elevados níveis de As são retidos nos ossos, pele, cabelos e unhas em humanos expostos ao poluente por longos períodos de tempo, mesmo que em baixas concentrações (Mandal et al., 2003). O arsênio tem atraído a atenção pública, devido à ocorrência de contaminações em massa, observadas principalmente em países asiáticos, como Bangladesh e Mongólia, ocasionada pela ingestão contínua de água contaminada, causando vários tipos de câncer e dermatoses em milhões de pessoas (Gontijo & Bittencourt, 2005; Hopenhayn, 2006; Hossain, 2006).

O efeito tóxico do As também é observado em plantas e a sua fitotoxicidade depende, principalmente, da sua forma química, concentração no ambiente, duração da exposição e do estado fisiológico da planta (Singh et al., 2007), além da presença de outros íons e de fatores intrínsecos da espécie (Gonzaga et al., 2006).

A absorção do arsenato pelas raízes pode ser fortemente influenciada pela presença de fosfato no substrato ou nas plantas, pois o arsenato é absorvido como um análogo não-funcional do fosfato, o que os leva a competir fortemente entre si (Meharg & Macnair, 1994; Pickering et al., 2000). A absorção do arsenito ocorre por meio de transportadores de água e glicerol, denominados “aquaporinas”, que são proteínas integrais de membrana altamente expressas em células de raízes (Otto & Kaldenhoff, 2000; Meharg & Jardine, 2003). Durante a absorção de água, o arsenito é absorvido em elevadas taxas de influxo, segundo a cinética de Michaelis-Menten (Abedin et al., 2002).

O arsenito é mais tóxico para as plantas que o arsenato, visto que ele reage com o grupo sulfidríla (-SH) de enzimas e outras proteínas, levando à inibição das funções celulares e morte celular (Delnomdedieu et al., 1993). A conversão do arsenato em arsenito no ambiente é muito comum. Em meios anaeróbicos, o arsenato é facilmente reduzido a arsenito, que é absorvido pelas raízes em taxas mais elevadas que o arsenato (Abedin et al., 2002). Essa conversão também ocorre no interior das células vegetais (Bertolero et al., 1987; Carter, 1995) através de processos que podem envolver mecanismos enzimáticos (e.g. arsenato redutases) e não-enzimáticos (e.g. glutatona) (Carter 1995).

A sensibilidade de espécies vegetais ao As é muito variada, sendo *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae) uma espécie definida por Melo (2006), Felipe (2007) e Silva (2008) como muito sensível ao poluente. *C. cajan*, popularmente conhecido como feijão-

guandu, é perene e possui porte arbustivo, sendo muito utilizado para melhorar a fertilidade de solos degradados e compactados, visto que suas raízes reduzem o adensamento das camadas compactadas do solo, favorecendo a infiltração de água e reduzindo a erosão (Wong, 2003). É uma espécie originária da África e amplamente cultivada no Brasil, sendo suas sementes muito utilizadas na alimentação.

## JUSTIFICATIVA

A contaminação por As constitui num sério problema para a saúde humana em certas regiões do estado de Minas Gerais (Matschullat et al., 2000; Daus et al., 2005), devido à intensa atividade mineradora, e pode resultar em inúmeras patologias cancerígenas e não-cancerígenas (Ahmad et al., 1997; Gontijo & Bittencourt, 2005; Hopenhayn, 2006; Hossain, 2006).

Atualmente, o monitoramento da contaminação ambiental por As envolve metodologias físico-químicas que, além de bastante laboriosas, apresentam alto custo. Uma boa alternativa para o desenvolvimento de técnicas mais simples para esse fim é o uso de espécies vegetais sensíveis em programas de biomonitoramento. Neste contexto, a anatomia vegetal, aliada a outras metodologias, como a avaliação da sintomatologia e de processos fisiológicos, pode ser uma ferramenta muito eficiente, pois utiliza-se de técnicas simples e economicamente viáveis em que alterações anatômicas específicas em plantas sensíveis indicam a presença de determinado poluente no ambiente (Blamey et al., 1986; Sresty & Madhava Rao, 1999; Silva et al., 2000; Fornasiero, 2003; Vitória et al., 2003, 2006; Sant'Anna-Santos et al, 2006; Maksimovic et al., 2007). Contudo, a escassez de estudos nessa linha de pesquisa impossibilita a adoção dessa técnica em áreas contaminadas com As.

A espécie *Cajanus cajan* (Fabaceae) é promissora nos estudos sobre poluição por As visto que é comprovadamente sensível a este poluente, como demonstrado por estudos recentes (Melo, 2006; Felipe, 2007; Silva, 2008). Além disso, é uma espécie tropical que apresenta crescimento rápido, fator fundamental para a realização de experimentos curtos que demandam respostas rápidas das plantas ao poluente, como é o caso do presente trabalho.

## OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo objetivou avaliar: os efeitos do arsênio sobre as raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (Fabaceae), em diferentes estádios de desenvolvimento, por meio de parâmetros macroscópicos visuais e de crescimento; proceder à caracterização anatômica e de genotoxicidade e identificar possíveis biomarcadores da presença de arsênio no ambiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDIN, M.J.; FELDMANN, J. & MEHARG, A.A. 2002. Uptake kinetics of arsenic species in rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Plant Physiology** 128: 1120-1128.
- ADRIANO, D.C. 2001. Arsenic. In: Adriano, D.C. (ed). **Trace Elements in the Terrestrial Environment**. 2ªed. New York: Springer-Verlag. pp. 219-262.
- AHMAD, S.A.; BANDARANAYAKE, D.; KHAN, A.W.; HADI, S.A.; UDDIN, G. & HALIM, M.A. 1997. Arsenic contamination in groundwater and arsenicosis in Bangladesh. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 7: 271-276.
- AHMED, K.M.; BHATTACHARYA, P.; HASAN, M.A.; AKHTER, S.H.; ALAM S.M.M.; BHUYIAN, M.A.H.; IMAM, M.B.; KHAN, A.A. & SRACEK, O. 2004. Arsenic enrichment in groundwater of the alluvial aquifers in Bangladesh: an overview. **Applied Geochemistry** 19: 181-200.
- ANAWAR, H.M.; AKAI, J.; KOMAKI, K.; TERAO, H.; YOSHIOKA, T.; ISHIZUKA, T.; SAFIULLAH, S. & KATO, K. 2003. Geochemical occurrence of arsenic in groundwater of Bangladesh: sources and mobilizations processes. **Journal of Geochemical Exploration** 77: 109-131.
- BERTOLERO, F.; POZZI, G.; SABBIONI, E. & SAFFIOTTI, U. 1987. Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. **Carcinogenesis** 8: 803-808.
- BHATTACHARYA, P.; JACKS, G.; AHMED, K.M.; ROUTH, J. & KHAN, A.A. 2002. Arsenic in groundwater of the Bengal delta plain aquifers in Bangladesh. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 69: 538-545.
- 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: 171-180.

CARTER, D.E. 1995. Oxidation-reduction reactions of metal ions. **Environmental Health Perspectives** 103: 17-19.

DAUS, B.; WENNRICH, R.; MORGENSTERN, P.; WEIB, H.; PALMIERI, H.E.L.; NALINI, H.A.; LEONEL, L.V.; MONTEIRO, R.P.G. & MOREIRA, R.M. 2005. Arsenic speciation in plant samples from the iron quadrangle, Minas Gerais, Brazil. **Microchimica Acta** 151: 175-180.

DELNOMDEDIEU, M.; BASTI, M.M.; OTVOS, J.D. & THOMAS, D.J. 1993. Transfer of arsenite from glutathione to dithiols: A model of interaction. **Chemical Research in Toxicology** 6: 598-602.

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

FOLKES, D.J.; KUEHSTER, T.E. & LITTLE, R.A. 2001. Contributions of pesticide use to urban background concentrations of arsenic in Denver, Colorado, U.S.A. **Environmental Forensics** 2: 127-139.

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

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

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: 254-260.

HINGSTON, J.A.; COLLINS, C.D.; MURPHY, R.J. & LESTER, J.N. 2001. Leaching of chromate copper arsenate wood preservatives: a review. **Environmental Pollution** 111: 53-66.

HOPENHAYN, C. 2006. Arsenic in drinking water: Impact on human health. **Elements** 2: 103-107.

HOSSAIN, M.F. 2006. Arsenic contamination in Bangladesh – an overview. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 113: 1-16.

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

MANDAL, B.K.; OGRA, Y. & SUZUKI, K.T. 2003. Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry. **Toxicology Applied Pharmacology** 189: 73-83.

MAKSIMOVIC, I.; KASTORI, R.; KRSTIC, L. & LUCOVIC, J. 2007. Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. **Biologia Plantarum** 51: 589-592.

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: 181-190.

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

MEHARG, A.A. & MACNAIR, M.R. 1994. Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv. that differ in their tolerance of arsenate. **Plant and Soil** 162: 99-106.

MELO, R.F. de. 2006. **Potencial de espécies vegetais para a fitorremediação de um solo contaminado por As**. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da Universidade Federal de Viçosa, MG. 107 p.

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: 365-375.

OTTO, B. & KALDENHOFF, R. 2000. Cell specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtQP1 from *Nicotiana tabacum*. **Planta** 211: 167-172.

PEPPER, I.; GALANTI, N.; SANS, J. & LOPEZ-SAEZ, J.F. 1987. Reversible inhibition of root growth and cell proliferation by pentavalent arsenic in *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany** 28: 9-18.

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: 1171-1177.

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: 313-321.

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

SILVA, K.L.F. 2008. **Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio**. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, MG. 98 p.

SIMON, G.; HUANG, H.; PENNER-HAHN, J.E.; KESLER, S.E. & KAO, L.S. 1999. Oxidation state of gold and arsenic in gold-bearing arsenic pyrite. **American Mineralogist** 84: 1071-1079.

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: 65-73.

SMITH, E.; NAIDU, R. & ALSTON, A.M. 1998. Arsenic in the soil environment: a review. **Advances in Agronomy** 64: 149-195.

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: 3-13.

VITÓRIA, 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: 561-568.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. Arsenic and arsenic compounds. 2.ed. **Environmental Health Criteria Series**. n. 224. 187 p. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>. Acesso em: 26 de fev. 2008.

WONG, M.H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere** 50: 775-780.

## Capítulo I

### Efeitos do arsênio no crescimento e estrutura anatômica de raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (Fabaceae)

**Resumo:** Raros são os trabalhos que se utilizam da anatomia vegetal, aliada a outras técnicas, na avaliação da sensibilidade de espécies vegetais ao arsênio (As). Este estudo objetivou caracterizar as respostas anatômicas e de desenvolvimento de raízes de plântulas de *Cajanus cajan* após exposição ao As (0,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As), em sistema hidropônico, durante dez dias consecutivos. Foram avaliados os efeitos do As sobre parâmetros de crescimento e desenvolvimento radicular (comprimento da raiz principal e das laterais e formação de raízes laterais) e, ao término da exposição, foram feitas coletas para análises anatômicas (qualitativas e quantitativas) em diferentes regiões da raiz principal. A exposição ao As promoveu redução drástica nas taxas de alongamento radicular, além do escurecimento das raízes e comprometimento na formação da coifa. As alterações anatômicas foram mais evidentes na zona de ramificação, principalmente próximo às raízes laterais. Geralmente, na região do córtex onde um primórdio de raiz lateral se desenvolvia, observou-se desintegração do tecido parenquimático circunvizinho à raiz lateral, resultando em um grande espaço vazio entre o córtex e a raiz recém-emitida. Foram detectadas alterações no padrão de divisão celular e formato das células do câmbio e do felogênio, inclusive completa desintegração celular. A atividade do câmbio não foi homogênea, culminando na produção desigual de xilema secundário, o qual adquiriu um formato assimétrico. Alguns elementos de vaso apresentaram-se obliterados, com as paredes extremamente sinuosas e aspecto colapsado. Estas alterações indicam a interferência do As no processo de diferenciação celular. O acúmulo de compostos fenólicos, principalmente no xilema e no floema secundários e, eventualmente, no câmbio e no córtex, foi freqüente. Nas demais regiões da raiz (zona pilífera e de alongamento) os danos foram menos severos e localizados, principalmente, na periferia do órgão. A epiderme apresentou sinais de deterioração, com células plasmolisadas, expondo o tecido parenquimático do córtex, que apresentou células com retração do protoplasto. Nestas regiões, a análise micromorfométrica se mostrou muito eficiente na detecção de alterações causadas pelo poluente. Observou-se aumento no espaço ocupado pelo cilindro vascular na raiz, além de grande redução na proporção de espaços intercelulares no córtex e redução na área em secção transversal ocupada pelos elementos de vaso do xilema secundário. Acredita-se que as alterações em maior grau a zona de ramificação sejam consequência de um maior tempo em contato com o poluente. Visto que as principais alterações ocorreram nas proximidades das raízes laterais, sugere-se a região de ramificação seja a principal via de entrada do As nas raízes de *C. cajan*.

**Palavras-chave:** alterações anatômicas, diferenciação celular, micromorfometria.

## Chapter I

### Effects of arsenic on growth and anatomical structure of seedlings' roots of *Cajanus cajan* (Fabaceae)

**Abstract:** There are a small number of works that use plant anatomy, combined with other techniques, to assess the sensitivity of plants to arsenic (As). This study aimed to characterize anatomically the growth and development of roots of *Cajanus cajan*, after exposure to As. Seedlings were grown in hydroponic system at different concentrations of As (0.0 and 1.5 mg L<sup>-1</sup> As). After ten days it was analyzed the length of main and lateral roots, the formation of lateral roots and qualitative and quantitative anatomical characteristics of samples collected from different regions of the main root. The exposure to As promoted drastic reduction in the rate of root elongation, darkish of roots and other alterations on the formation of root cap. The anatomical changes were more evident along the branching areas, especially near the lateral roots. Generally, in the cortex region where the lateral roots are developed, there was disintegration of parenchymatous tissue surrounding the lateral root, resulting in a large empty space between the root cortex and the newly-emitted root. It was detected alterations in the pattern of cell division and cell format of the cambium and the felogenium, till the complete cell disintegration. The activity of the cambium was not homogeneous, resulting in uneven production of secondary xylem, which acquired an asymmetrical shape. Some tracheary elements were obliterated, showing sinuous walls and collapsed appearance. These changes are evidences that As may interfere in the process of cell differentiation. Moreover, accumulation of phenolic compounds, especially in the secondary xylem and phloem and in cambium and cortex, was frequent. In other regions of the root (hair and stretching zone) the damage was lesser severe, taking, primarily, the organ periphery. The epidermis showed deterioration signs, with plasmolysed cells, exposing the parenchymatous tissue in the cortex, which showed cells with protoplast retraction. In these regions, the micromorphometrical analysis was extremely efficient to detect changes caused by the pollutant. There was also an increase of the space occupied by the root vascular cylinder, a large reduction in the proportion of intercellular spaces in the cortex and a reduction in area of cross section occupied by the vessel elements of secondary xylem. It is believed that the changes have affected in a greater degree the branching zone because it was in contact to the pollutant for a longer time. Since the main changes occurred in the vicinity of lateral roots, it is suggested that these are the main route of As entrance in the roots of *C. cajan*.

**Keywords:** anatomical alterations, cell differentiation, micromorphometry.

## INTRODUÇÃO

Apesar do arsênio (As) ocorrer naturalmente no ambiente (Mandal & Suzuki, 2002), sua disponibilidade é aumentada por uma variedade de atividades antrópicas, principalmente as mineradoras, contaminando o solo e a água (Borba et al., 2004; Gontijo & Bittencourt, 2005). Desta forma, o As pode ser repassado aos seres humanos, através da ingestão de água contaminada (Smith et al., 2000; Hopenhayn, 2006) e pela cadeia alimentar (Meharg & Rahman, 2003; Meharg, 2004), causando inúmeras patologias cancerígenas (Jager & Ostosky-Wegman, 1997) e não cancerígenas (Das et al., 1995).

Na maioria das plantas, a raiz é o ponto de contato direto com o As em áreas contaminadas e a avaliação dos processos ocorrentes neste órgão auxilia o entendimento de como as plantas respondem aos poluentes (Hartley-Whitaker et al., 2001). Na raiz ocorre a absorção e o maior acúmulo do poluente, visto que sua taxa de translocação para a parte aérea é, geralmente, baixa, como já demonstrado para *Cajanus cajan* (Felipe, 2007; Silva, 2008). A similaridade química do arsenato com o fosfato é um fator chave que facilita a absorção do primeiro, permitindo que esse afete severamente o crescimento e o desenvolvimento de plantas, como resultado de desordens bioquímicas e fisiológicas (Hartley-Whitaker et al., 2001; Li et al., 2006; Singh et al., 2007). Além disso, a fácil conversão do arsenito em arsenato, tanto no meio ambiente (em condições anaeróbicas) (Abedin et al., 2002) quanto no interior da célula vegetal (Carter, 1995), também contribui para o aumento da fitotoxicidade deste poluente (Delnomdedieu et al., 1993).

Estudos estruturais e ultra-estruturais podem ser úteis na avaliação de danos causados por poluentes em plantas, uma vez que é possível a identificação de alterações estruturais antes mesmo de se detectar retardamento nas taxas de crescimento em plantas de áreas contaminadas (Päivöke, 1983a). Alguns autores utilizaram-se da anatomia vegetal, geralmente em conjunto com a sintomatologia, para avaliar os efeitos fitotóxicos de poluentes, tais como o cádmio (Vitória et al., 2003, 2006), o flúor (Silva et al., 2000; Fornasiero, 2003; Sant'Anna-Santos et al., 2006), o manganês (Blamey et al., 1986), o níquel e o zinco (Sresty & Madhava Rao, 1999). Vale acrescentar que, além da caracterização anatômica (qualitativa), análises micromorfométricas

(quantitativas) têm sido eficazes na avaliação dos efeitos fitotóxicos de poluentes, principalmente nas regiões do vegetal que não apresentam sintomas visíveis (Sant'Anna-Santos, 2008; Silva, 2008).

Tratando-se especificamente do As, raros são os estudos que relataram o uso da anatomia vegetal como ferramenta na avaliação dos danos causados por esse elemento nas plantas. Alguns trabalhos descreveram os efeitos do As sobre a anatomia de plantas, podendo-se citar: alterações nas células epidérmicas e parenquimáticas do córtex, bem como na diferenciação e organização de elementos condutores e da endoderme de raízes de *Pisum sativum* (Päivöke, 1983b); alterações ultra-estruturais nas mitocôndrias de elementos condutores de raízes de rabanete (Simon et al., 2000); alterações ultra-estruturais em cloroplastos de folhas de *Pteris vitata*, espécie hiperacumuladora de As (Li et al., 2006); alterações nas células parenquimáticas do córtex da raiz e na diferenciação celular dos elementos de vaso de *Phaseolus aureus* (Singh et al., 2007). Também vale destacar que são escassos na literatura registros sobre os efeitos do As em raízes de plântulas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos: verificar os efeitos do arsênio no desenvolvimento e crescimento radicular inicial; caracterizar e quantificar os possíveis danos causados por este poluente na anatomia de raízes de plântulas de *C. cajan*, espécie sensível ao As; identificar um possível marcador estrutural que, em conjunto com a sintomatologia, possa ser utilizado em processos de bioindicação ambiental.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Condições de cultivo e delineamento experimental**

Foram utilizadas plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae), obtidas a partir da germinação de sementes fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo (Embrapa – CNPMS). Sementes com forma e tamanho homogêneos foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio 1%, durante cinco minutos, lavadas com água deionizada e semeadas em areia lavada, a 1,5 cm de profundidade. Para

exposição ao arsênio (As) (Figura 1), plântulas com sete dias de idade, com raiz principal de aproximadamente 4,0 cm de comprimento e primeiro par de folhas simples em início de expansão, foram transferidas da areia para frascos, com 0,7 L de capacidade, contendo solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1938) à meia-força iônica, pH 6,0, com sistema de aeração. A exposição ao poluente teve início imediatamente após a transferência das plântulas para os recipientes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos e cinco repetições cada, tendo-se colocado um planta por recipiente. No tratamento controle utilizou-se somente solução nutritiva e no tratamento com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As adicionou-se arsenato de sódio (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>). A escolha desta concentração de As baseou-se nos resultados de Felipe (2007), que expôs *C. cajan* a doses crescentes deste poluente e verificou que 1,50 mg L<sup>-1</sup> foi suficiente para causar alterações em parâmetros fisiológicos, incluindo o crescimento radicular.

As plântulas foram cultivadas em solução, por dez dias consecutivos, em casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e durante este período realizou-se o registro fotográfico das raízes. Vale ressaltar que todo o resíduo de As resultante do experimento foi precipitado com uma base forte (NaOH) e o sobrenadante (sem As) evaporado de modo a se obter uma pasta concentrada, com volume reduzido, destinada à incineração.

### **Crescimento e desenvolvimento radicular**

A fim de avaliar os efeitos do As nas taxas de crescimento radicular, mensurou-se, durante os dez dias de experimento, a cada dois dias, o comprimento das raízes principais e das três maiores raízes laterais das plântulas de *C. cajan*, com auxílio de régua milimetrada. Da mesma forma, contou-se o número de raízes laterais presentes ao longo de toda a extensão da raiz principal de cada planta, a cada dois dias, para detecção de possíveis alterações nas taxas de emissão de raízes laterais. A partir destes dados, calculou-se o percentual de redução nas taxas de crescimento das raízes laterais e principal. Ressalta-se que, imediatamente após as medições, as plântulas retornavam para o seu respectivo recipiente, para medições subsequentes.

Após os dez dias de exposição ao elemento, antes da coleta para as demais análises, os ápices radiculares foram observados sob estereomicroscópio (modelo Stemi 2000-C, Carl Zeiss), com o intuito de verificar a ocorrência de alterações na conformação do ápice radicular como um todo e, especificamente, da coifa.

### **Análises anatômicas**

Para as análises anatômicas, foram avaliadas as diferentes regiões da raiz principal das plântulas de *C. cajan*: zona de ramificação (ZR), zona pilífera (ZP), zona de alongamento (ZA) e coifa. As análises do laminário foram conduzidas no laboratório de Anatomia Vegetal da UFV e a documentação fotográfica obtida em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema U-Photo, com câmera digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc., Nova Iorque, EUA) e microcomputador acoplados.

Fragmentos com 0,5 cm de comprimento de ZA, ZP e ZR foram coletados e fixados em glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2, acrescido de cloreto de cálcio 5 mM (Karnovsky, 1965). Após desidratação em série etílica, os fragmentos foram incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha), para a obtenção de cortes transversais e longitudinais, com 5 µm de espessura, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM 2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Os cortes foram corados com azul de Toluidina/pH=4,0 (O'Brien & McCully, 1981) e montados entre lâmina e lamínula, utilizando-se Permount (Fisher Scientific) como meio de montagem.

Foram realizadas análises qualitativas (caracterização anatômica) e quantitativas (micromorfometria). Nas análises quantitativas mensurou-se a proporção ocupada pelo cilindro vascular na raiz (duas medições perpendiculares em cada corte, para obtenção de média) e a área ocupada pelos espaços intercelulares no córtex, ambos em secção transversal. Avaliou-se também a área, em secção transversal, dos três maiores elementos de vaso. As análises foram conduzidas com o auxílio do programa de análise de imagens Image Pro-Plus versão 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Para cada análise citada, foram utilizadas quatro repetições para

cada uma das três regiões amostradas (ZA, ZP e ZR). Para cada uma das regiões foram amostradas três lâminas, e três cortes em cada lâmina, para as medições.

### **Análises estatísticas**

As médias referentes às análises micromorfométricas e de crescimento radicular foram submetidas à análise de variância e comparação das médias pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância, empregando-se o programa SAEG – Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (Euclides, 1983).

## **RESULTADOS**

### **Efeitos do arsênio no crescimento e desenvolvimento radicular**

Verificou-se que o As apresentou influência sobre as taxas de alongamento radicular de plântulas de *C. cajan* (Figura 2B; Tabela 1). Logo no segundo dia de exposição foi possível perceber redução do crescimento da raiz, com as raízes principais e laterais apresentando comprimentos, em média, 35 e 68% menores, respectivamente, que as raízes das plântulas controle (Tabela 1). Com o decorrer do tempo de exposição ao As, observou-se tendência a uma gradual redução nas taxas de alongamento radicular, com as plantas apresentando, após dez dias de exposição, a raízes principais e laterais, em média, 45 e 78% menores que as controle, respectivamente (Tabela 1). Apesar dos efeitos severos nas taxas de crescimento, não foi observado efeito significativo do As sobre a taxa de emissão de raízes laterais.

Ao término da exposição, as raízes adquiriram coloração amarronzada (Figura 2B), diferentemente das plantas controle, que mantiveram a típica coloração esbranquiçada (Figura 2A). Apesar de não se ter medido o comprimento da ZA separadamente do comprimento total da raiz principal, notou-se que o As promoveu redução no comprimento dessa região da raiz, se comparado ao comprimento da mesma nas plantas controle e as raízes laterais passaram a ocupar maior extensão ao longo da raiz principal (Figura 2B). As raízes de *C. cajan* apresentam coifa evidente (Figura 3A).

Notou-se que o encurvamento do ápice radicular das plantas expostas ao poluente foi freqüente, assim como a má-formação da coifa ou, ainda, a completa ausência desta nas plântulas expostas ao poluente (Figura 3B).

Além das alterações observadas na raiz, verificou-se que o As também promoveu danos à parte aérea. Ao término do experimento, as folhas das plantas expostas ao poluente apresentaram-se murchas e com aspecto retorcido (Figura 2B). Verificou-se que as folhas deixaram de apresentar coloração verde-brilhante (Figura 2A), adquirindo aspecto clorótico e necroses pontuais.

### **Alterações anatômicas causadas pelo arsênio**

A raiz de *C. cajan* (Figura 4A-L) apresenta epiderme unisseriada, córtex parenquimático (Figura 4C) e estelo com organização tetraarca. A concentração de As utilizada no presente estudo provocou alterações estruturais drásticas na ZR das raízes das plântulas de *C. cajan* submetidas ao poluente (Figuras 4F/H-L). Em ZR, notou-se que as regiões mais internas do cilindro vascular, correspondente ao xilema primário e imediações, não apresentaram injúrias, ao passo que as porções mais externas, como a periferia do xilema e floema secundários, apresentaram várias alterações estruturais devido à toxicidade por As (Figuras 4H/I/K). As células do felogênio, principalmente aquelas situadas nas proximidades das raízes laterais, passaram a apresentar planos de divisão e formato atípicos (Figura 4J) e, em alguns casos, completa desintegração, assim como também observado nas células cambiais. Verificou-se produção desigual de xilema secundário pelo câmbio, o que fez com que esse freqüentemente apresentasse formato assimétrico (Figura 4H). Também foram observados elementos de vaso obliterados, com as paredes extremamente sinuosas e aspecto colapsado, principalmente na ZR (Figura 4F), mas também algumas vezes na ZP (Figura 4G). O acúmulo de substâncias coradas em azul, granulares ou agranulares (Figuras 4I/K/L), foi freqüente somente na ZR, ocorrendo principalmente no xilema e no floema e, eventualmente, no câmbio e no córtex.

Vale ressaltar que as alterações ocorreram, preferencialmente, nas proximidades das raízes laterais. Durante o desenvolvimento do primórdio da raiz lateral, ainda no córtex, observou-se desintegração freqüente do tecido parenquimático circunvizinho,

criando um grande espaço vazio entre o córtex e a raiz recém-emitida (Figura 4K). Nas plantas controle, ao contrário destas, não foram observadas alterações na estrutura das células circundantes (Figura 4A).

Nas demais regiões da raiz (ZA e ZP) os danos foram menos severos, ocorrendo, principalmente, na periferia do órgão. Em ambas as regiões, observaram-se sulcos na epiderme, bem como sinais de deterioração, com células plasmolisadas (Figura 4D). Em alguns casos, observou-se a exposição ao ambiente do tecido parenquimático do córtex que apresentou células com protoplasto retraído e indícios de perda de turgidez, bem como completa deterioração (Figura 4E).

Em geral, verificou-se que o As promoveu efeito significativo sobre os parâmetros anatômicos quantitativos avaliados na raiz (Tabela 2). Na ZA e na ZP, regiões aparentemente pouco afetadas, a micromorfometria revelou alterações quantitativas causadas pelo poluente. Nessas regiões, o cilindro vascular passou a ocupar maior área, em secção transversal total da raiz (aumento de 21,25 e 9,64% em ZA e ZP, respectivamente). Verificou-se, também, redução drástica na proporção de espaços intercelulares no córtex (redução de 58,8 e 28,92%, em ZA e ZP, respectivamente), o que reflete maior adensamento celular em resposta ao As. O As também interferiu na diferenciação de elementos de vaso em ZP e ZR (Figuras 4F/G), que apresentaram formato atipicamente contorcido. Entretanto, somente em ZP observou-se redução na área em secção transversal dos elementos de vaso do xilema secundário, de mais de 30% com relação ao controle. Ressalta-se que as análises referentes à proporção ocupada pelo cilindro vascular na raiz e porcentagem de espaços intercelulares no córtex não foram realizadas em ZR, pois nesta região o córtex está sendo naturalmente eliminado devido o crescimento secundário da raiz, inviabilizando as medições.

## DISCUSSÃO

A toxicidade de poluentes em vegetais tem sido associada a alterações fisiológicas na raiz, que podem ocasionar a inibição do alongamento radicular (Macnair, 1993). Dessa forma, a redução na taxa de crescimento radicular pode ser um indício da sensibilidade de uma espécie vegetal a dado poluente. Os efeitos do As nas taxas de alongamento radicular em plântulas de *C. cajan* foram significativos após um curto período de exposição ao poluente, perceptíveis após dois dias, o que sugere que o elemento é facilmente absorvido pelas raízes da espécie em estudo, confirmando sua sensibilidade ao As, como já relatado por Melo (2006), Felipe (2007) e Silva (2008).

O crescimento das raízes laterais foi mais afetado pelo As que o da principal, possivelmente, pelo fato do desenvolvimento das raízes laterais ter se dado, integralmente, na presença do poluente, o que não ocorreu com a principal, que já estava formada antes do início da exposição. A sensibilidade das plantas é influenciada pela concentração e tipo de poluente, mas também pelo estágio de desenvolvimento da planta. Os estádios iniciais de desenvolvimento, como a germinação e crescimento inicial, são os mais sensíveis aos poluentes porque alguns dos mecanismos de defesa ainda não estão completamente desenvolvidos (Liu et al., 2005).

Silva (2008) verificou que os primórdios radiculares foram formados bem próximos uns dos outros na raiz principal, provavelmente, em consequência da redução do crescimento da mesma. No presente estudo, não foi verificada diferença visível na disposição das raízes laterais, umas em relação às outras, em resposta ao arsênio. Entretanto, foi observado que as raízes laterais ocuparam maior extensão da raiz principal, levando à redução do comprimento relativo de ZA. Sugere-se que a redução nas taxas de crescimento radicular das raízes das plântulas de *C. cajan* possa ter resultado (1) de alterações no processo de alongamento celular e/ou (2) da ocorrência de danos no meristema apical da raiz, afetando a divisão celular e, conseqüentemente, o crescimento radicular. A visível redução do comprimento da ZA é um forte indício da interferência negativa do As no processo de alongamento celular. Ambas as hipóteses foram testadas no experimento que será apresentado no capítulo 2.

O escurecimento das raízes das plântulas de *C. cajan* após exposição ao As também foi observado em raízes de *Stizolobium aterrimum* (Fabaceae) expostas a

diferentes concentrações deste poluente (Nascimento, 2007). Assim como observado no presente estudo em *C. cajan*, verificou-se que o efeito do escurecimento nas raízes de *S. aterrimum* foi intensificado com o aumento da concentração e do tempo de exposição. Possivelmente, o escurecimento das raízes esteja relacionado à ocorrência de reações de oxidação-redução na superfície da raiz que interferem no funcionamento do órgão (Nascimento, 2007). Este fato, aliado à ocorrência de alterações anatômicas e a um sistema radicular pouco desenvolvido, pode ter levado ao baixo suprimento de nutrientes essenciais e água, promovendo déficit hídrico indireto, afetando assim a parte aérea (Carbonell-Barrachina et al., 1997).

O As é, muitas vezes, comparado a metais de transição e a outros metalóides que são, na maioria das vezes, micronutrientes ou nutrientes não-essenciais (Marschner, 1995). Esses elementos são absorvidos em pequenas quantidades e, quando em concentrações tóxicas no meio intracelular, seus níveis são regulados visando à manutenção de concentrações celulares baixas e a homeostase celular (Clemens, 2001). Com o As na forma de arsenato ocorre o oposto; sua similaridade química com o macronutriente fosfato, essencial no metabolismo dos vegetais, leva à absorção de quantidades relativamente elevadas do poluente, através de transportadores de fosfato existentes na raiz, por competição entre os dois radicais e da substituição do fosfato pelo arsenato (Meharg & Macnair, 1992; Kabata-Pendias & Pendias, 2001; Sharples et al., 2000). Como resultado, o arsenato pode substituir o fosfato em processos bioquímicos e/ou promover a diminuição da concentração de fosfato no meio intracelular, levando à redução de processos metabólicos vitais, como a fosforilação oxidativa na mitocôndria. Estes processos promovem uma queda na produção de poder redutor (NADPH) e de adenosina trifosfato (ATP), reduzindo a disponibilidade de energia para a raiz (Meharg & Macnair, 1994). Somado a isso, acredita-se que o As, quando em solução nutritiva, é mais facilmente disponível para a planta que na solução do solo (uma vez que não está adsorvido às partículas de solo), facilitando ainda mais a absorção deste metalóide tóxico.

O fato das alterações anatômicas mais significativas terem se dado na ZR situada mais próxima à base da raiz possivelmente está relacionada com o tempo de exposição ao poluente visto que, por ser a região mais velha, permaneceu por mais tempo em contato direto com o As. Verificou-se, ainda, que o xilema secundário foi bastante

danificado, provavelmente por seu processo de diferenciação ter ocorrido já na presença do As. Por outro lado, os tecidos de condução primários, que se diferenciaram anteriormente à exposição ao poluente, não foram afetados.

Os resultados sugerem que o As possa atuar mais intensamente sobre regiões com elevada atividade mitótica, como o câmbio e o felogênio, que apresentaram células com formato e planos de divisão incomuns. O efeito tóxico do As sobre as células cambiais provavelmente interferiu na sincronia das divisões celulares e na diferenciação dos elementos de vaso, promovendo a formação de um xilema secundário com formato assimétrico, bastante atípico. A ocorrência de elementos de vaso obliterados, com paredes extremamente sinuosas e aspecto colapsado, juntamente com as alterações supracitadas, indica a interferência do As no processo de diferenciação celular. Em raízes de *Pisum sativum* (ervilha) expostas ao As, Päivöke (1983b) verificou alterações na organização, tamanho e formato das células parenquimáticas do córtex; alterações no padrão de organização do estelo, com variação no número de pólos de protoxilema e disposição dos tecidos vasculares além de aumento na lignificação das células do estelo, dificultando a diferenciação das células floemáticas e xilemáticas das demais.

A desintegração tecidual observada pode estar associada à morte celular decorrente de estresse oxidativo, amplamente relatado na literatura em espécies vegetais expostas a concentrações tóxicas de As (Hartley-Whitaker et al., 2001; Mascher et al., 2002; Nascimento, 2007; Singh et al., 2007). Singh et al. (2007) atribuíram a redução nas taxas de crescimento radicular e os danos na estrutura anatômica à ocorrência de estresse oxidativo, resultando em danos às células. Existem relatos sobre a peroxidação de lipídios (Geng et al., 2006), que pode levar à destruição da maquinaria celular (Hartley-Whitaker et al., 2001; Mascher et al., 2002) e, conseqüentemente, à morte celular/tecidual, como verificado nas adjacências das raízes laterais na ZR e em porções situadas próximo a periferia da raiz, em ZA, ZP e ZR, onde ocorreu desintegração tecidual. Assim, a realização de trabalhos futuros será essencial para maiores esclarecimentos acerca dos efeitos do As sobre os mecanismos de antioxidação, como a avaliação da atividade de enzimas relacionadas a estresse.

É possível que as substâncias de coloração esverdeada acumuladas, principalmente, nas adjacências das raízes laterais sejam compostos fenólicos, reforçando a hipótese da ocorrência de estresse oxidativo, visto que estas substâncias

podem estar relacionadas com a defesa da planta contra fatores estressantes (Vaughn & Duke, 1984). Contudo, para a confirmação dessa hipótese, sugere-se a realização de um teste histoquímico específico para a detecção desses compostos, como realizado no experimento descrito no capítulo 2.

Sugere-se que o local de emissão das raízes laterais constitua a principal via de entrada do As nas plântulas de *C. cajan* expostas ao poluente em sistema hidropônico, pois observou-se, freqüentemente, desintegração do tecido parenquimático cortical ao longo da raiz recém-emitada.

Além das alterações anatômicas visualizadas através da anatomia qualitativa, foi possível notar, através da análise micromorfológica, aumento no diâmetro relativo do estelo, o qual indiretamente deve-se, principalmente, à redução na percentagem de espaços intercelulares no córtex. Verificou-se, também, redução na área, em secção transversal, dos elementos de vaso, o que pode ter prejudicado a eficácia do movimento de água no interior da planta. A análise micromorfológica constitui-se uma ferramenta muito eficiente na detecção de alterações em regiões aparentemente não afetadas pelo As, permitindo a detecção precoce da injúria.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDIN, M.J.; FELDMANN, J. & MEHARG, A.A. 2002. Uptake kinetics of arsenic species in rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Plant Physiology** 128: 1120-1128.
- 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: 171-180.
- 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: 45-51.
- 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: 167-176.
- CARTER, D.E. 1995. Oxidation-reduction reactions of metal ions. **Environmental Health Perspectives** 103: 17-19.
- CLEMENS, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta** 212: 475-486.

DAS, D.; CHATTERJEE, A.; MANDAL, B.K.; SAMANTA, G. & CHAKRABORTY, D. 1995. Arsenic in groundwater in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world. **Analyst** 120: 917-924.

DELNOMDEDIEU, M.; BASTI, M.M.; OTVOS, J.D. & THOMAS, D.J. 1993. Transfer of arsenite from glutathione to dithiols: A model of interaction. **Chemical Research in Toxicology** 6: 598-602.

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

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

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

GENG, C.N.; ZHU, Y.G.; HU, Y.; WILLIAMS, P. & MEHARG, A.A. 2006. Arsenate causes differential acute toxicity to two P-deprived genotypes of rice seedlings (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil** 279: 297-306.

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

HARTLEY-WHITAKER, A.J.; AINSWORTH, G. & MEHARG, A.A. 2001. Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. **Plant, Cell and Environment** 24: 713-722.

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

HOPENHAYN, C. 2006. Arsenic in drinking water: impact on human health. **Elements** 2: 103-107.

JAGER, J.W. & OSTOSKY-WEGMAN, P. 1997. Arsenic: a paradoxical human carcinogen. **Mutation Research** 386: 181-184.

KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. 2001. **Trace elements in soils and plants**. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press. 413p.

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

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: 803-809.

LIU, X.; ZHANG, S.; SHAN, X. & ZHU, Y. 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. **Chemosphere** 61: 293-301.

MACNAIR, M.R. 1993. The genetics of metal tolerance in vascular plants. **New Phytologist** 124: 541-559.

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

MARSCHNER, H. 1995. **Mineral nutrition of higher plants**, 2<sup>a</sup> ed. Londres, UK: Academic Press Ltd. 889 p.

MASCHER, R.; LIPPMANN, B.; HOLZINGER, S. & BERGMANN, H. 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. **Plant Science** 163: 961-969.

MEHARG, A.A. 2004. Arsenic in rice – understanding a new disaster for South-East Asia. **Trends in Plant Science** 9: 415-417.

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: 519-524.

MEHARG, A.A. & MACNAIR, M.R. 1994. Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv. that differ in their tolerance of arsenate. **Plant and Soil** 162: 99-106.

MEHARG, A.A. & RAHMAN, M.D.M. 2003. Arsenic contamination of Bangladesh paddy field soils: implications for rice contribution to arsenic consumption. **Environmental Science and Technology** 37: 229-234.

MELO, R.F. de. 2006. **Potencial de espécies vegetais para a fitorremediação de um solo contaminado por As**. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da Universidade Federal de Viçosa, MG. 107 p.

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, MG. 36 p.

O'BRIEN, T. P. & MC CULLY, M. E. 1981. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcaphi Pty. Ltd. 280 p.

PÄIVÖKE , A. 1983a. The short-term induced effects of zinc on the growth, anatomy and acid phosphatase activity of pea seedlings. **Annales Botanici Fennici** 20: 197-203.

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

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

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: 313-321.

SHARPLES, J.M.; MEHARG, A.A.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. 2000. Mechanisms of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenosyphus ericae*. **Plant Physiology** 124: 1327-1334.

SILVA, K.L.F. 2008. **Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio.** Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, MG. 98 p.

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

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: 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: 65-73.

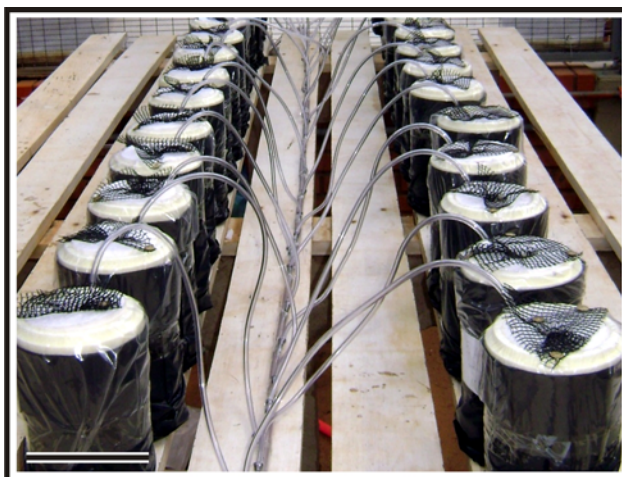
SMITH, A.H.; LINGAS, E.O. & RAHMAN, M. 2000. Contamination of drinking water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. **Bulletin of World Health Organization** 78: 1093-1103.

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: 3-13.

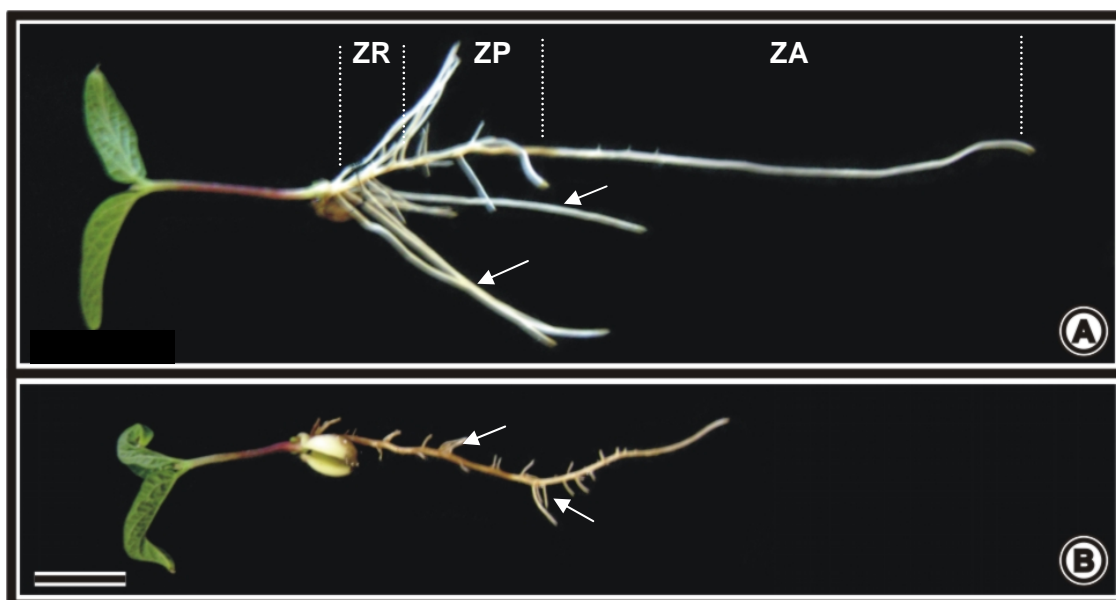
VAUGHN, K. & DUKE, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum** 60: 106-112.

VITÓRIA, 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: 561-568.

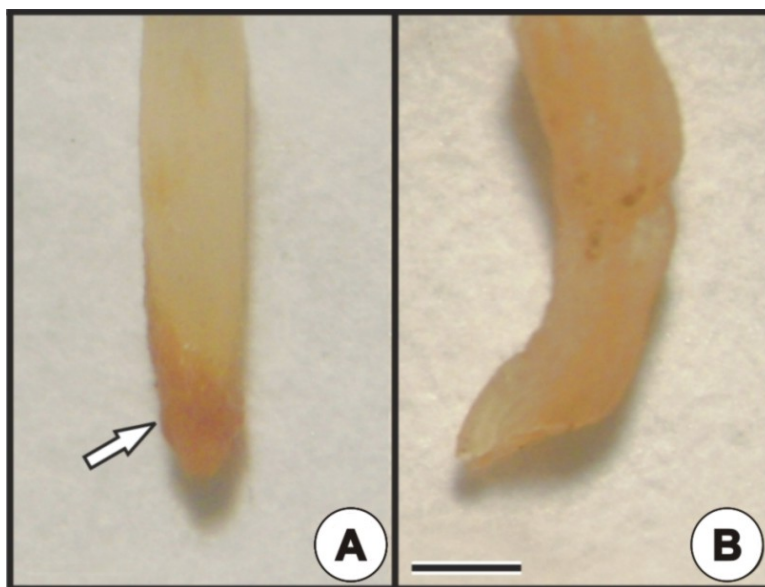
VITÓRIA, A.P.; CUNHA, M. & AZEVEDO, R.A. 2006. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany** 58: 47-52.



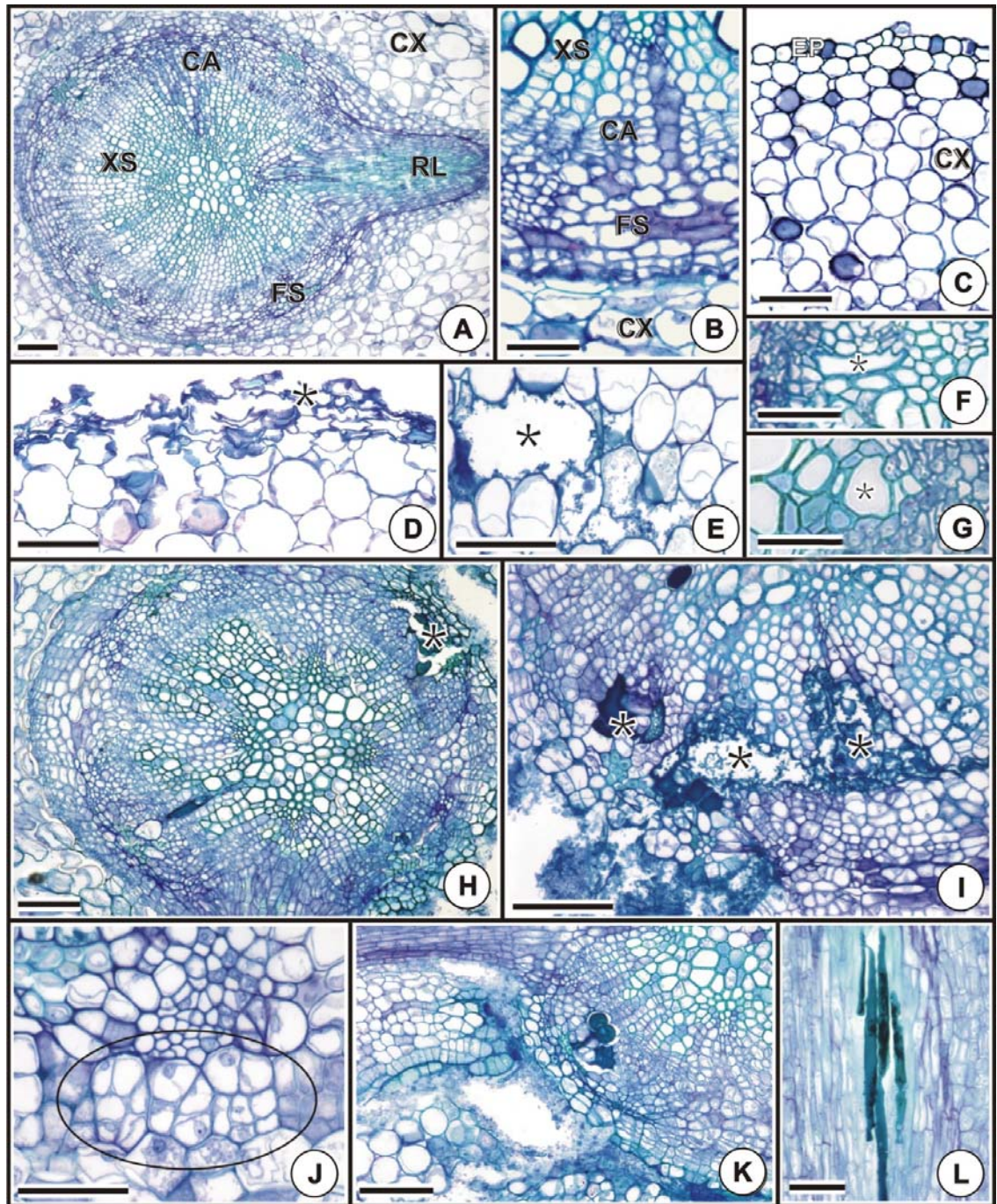
**Figura 1** – Sistema hidropônico utilizados para os experimentos. Frascos com capacidade de 0,7 L com sistema de aeração. As plântulas foram colocadas sobre uma malha para exposição aos tratamentos. Barra = 12 cm.



**Figura 2** - Efeitos do arsênio sobre as raízes de plântulas de *Cajanus cajan*, após dez dias consecutivos de exposição em sistema hidropônico. A - Controle. B - 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As. Raiz principal menos alongada, de coloração amarronzada. Notar que as raízes laterais (seta) são muito curtas e ocupam quase toda a extensão da raiz principal. Abreviaturas – ZA: zona de alongamento, ZP: zona pilífera, ZR: zona de ramificação. Barra = 2 cm.



**Figura 3** – Ápice radicular de plântulas de *Cajans cajan* após dez dias de exposição ao arsênio ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) em sistema hidropônico. A - Controle. Ápice radicular com formato retilíneo e coifa evidente (seta). B - Encurvamento do ápice radicular e coifa ausente. Barra = 5 mm.



**Figura 4** - Efeitos do arsênio na estrutura radicular de plântulas de *Cajanus cajan* (microscopia de luz, coloração com azul de toluidina). A-C – Controle. D-L –  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de As. A-K – Secção transversal. L – Secção longitudinal. A, B, F, H-L – Zona de ramificação. C – Zona de alongamento. D, E, G – Zona pilífera. D – Alteração no formato e desintegração da epiderme e das camadas mais externas do córtex. E – Desintegração das células do córtex (\*) e células com protoplasto retraído. F-G – Elementos de vaso com formato alterado (\*). H – Xilema secundário com conformação assimétrica. Desintegração tecidual e acúmulo de compostos fenólicos no floema secundário (\*). I – Desintegração tecidual e acúmulo de compostos fenólicos no floema e xilema secundários (\*). J – Periderme em formação, apresentando células com formato irregular. K – Acúmulo de compostos fenólicos e desintegração tecidual próximo a raiz lateral emergente. L – Acúmulo de compostos fenólicos nos elementos de vaso. Abreviaturas – CA:

câmbio, CX: córtex, FS: floema secundário, RL: raiz lateral, XS: xilema secundário. Barras: A-E; H-L = 100 µm; F-G = 50 µm.

**Tabela 1** - Comprimentos das raízes laterais e principal, número de raízes laterais (médias seguidas pelos respectivos desvios-padrão) e redução na taxa de crescimento (RTC) durante dez dias de exposição ao arsênio (controle e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As), em sistema hidropônico, sendo “dia 0” correspondente ao início da exposição ao poluente

Dia	Raiz principal			Raízes laterais		
	Controle	1,5	RTC	Controle	1,5	RTC
	cm		%	cm		%
0	4,2 ± 0,4 a	4,2 ± 0,4 a	0	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0
2	11,8 ± 0,7 a	7,7 ± 1,2 b	34,8	2,4 ± 0,7 a	0,8 ± 0,1 b	66,7
4	13,5 ± 0,6 a	8,2 ± 1,4 b	39,3	3,2 ± 1,2 a	0,9 ± 0,2 b	68,5
6	15,0 ± 0,9 a	8,6 ± 1,5 b	42,7	3,9 ± 1,6 a	0,9 ± 0,2 b	77,0
8	16,0 ± 0,9 a	8,9 ± 1,6 b	44,4	4,4 ± 1,8 a	1,0 ± 0,2 b	77,3
10	16,4 ± 1,2 a	9,1 ± 1,6 b	44,5	4,9 ± 1,9 a	1,1 ± 0,2 b	77,6

Médias seguidas por letras iguais, na horizontal, não diferem entre si, quando comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Tabela 2** - Efeito do arsênio (controle e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As) sobre parâmetros micromorfométricos da raiz de plântulas de *Cajanus cajan*, em secção transversal, após dez dias consecutivos de exposição ao poluente em sistema hidropônico

Região	Proporção do cilindro vascular na raiz		Proporção dos espaços intercelulares no córtex		Área dos elementos de vaso em secção transversal	
	%		%		µm <sup>2</sup>	
	Controle	1,5	Controle	1,5	Controle	1,5
ZA	25,2 ± 1,3 b	32,0 ± 1,6 a	7,2 ± 0,1 a	3,4 ± 0,3 b	260,5 ± 64,2 a	175,9 ± 35,3 a
ZP	27,2 ± 1,0 b	30,1 ± 1,3 a	8,3 ± 0,7 a	5,9 ± 0,4 b	1435,8 ± 251,3 a	978,2 ± 106,8 b
ZR	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	270,50 ± 40,7 a	167,7 ± 20,6 a

Médias seguidas por letras iguais, na horizontal, não diferem entre si, quando comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Abreviaturas: ZA (zona de alongamento), ZP (zona pilífera), ZR (zona de ramificação), N.A. (não avaliado).

## Capítulo II

### **Efeitos do arsênio, durante um curto período de exposição, no desenvolvimento inicial de raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (Fabaceae): caracterização estrutural, histoquímica e de genotoxicidade**

**Resumo:** O presente estudo objetivou avaliar os efeitos de concentrações crescentes de arsênio (As) sobre parâmetros anatômicos, fisiológicos e de genotoxicidade, em raízes de plântulas de *Cajanus cajan*, após um curto período de exposição ao elemento. Plântulas de *C. cajan* foram expostas, em solução nutritiva, às concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As, na forma de arsenato de sódio, durante três dias consecutivos. As raízes foram mensuradas antes da exposição ao poluente; ao término da exposição, as raízes foram fotografadas e os ápices radiculares coletados, para a determinação do índice mitótico. Fragmentos das demais regiões da raiz foram coletados para a caracterização anatômica, análises micromorfológicas e testes histoquímicos para detecção de compostos fenólicos e pectinas. Verificou-se que o crescimento da raiz principal foi extremamente prejudicado pela presença de As e na concentração mais elevada do poluente a raiz principal apresenta-se escura e com aspecto gelatinoso. O As promoveu redução na formação de raízes laterais, que não foram visualizadas no tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As. Contudo, microscopicamente, foi possível notar que os primórdios foram formados, mas permaneceram retidos no córtex. Nos tratamentos com 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As detectou-se redução no índice mitótico, em relação ao tratamento controle. As alterações anatômicas foram mais severas na zona de alongamento, seguida pela zona pilífera, e ocorreram, principalmente, na periferia da raiz, agravando-se, gradualmente, com o aumento da concentração do poluente na solução. As células epidérmicas e as do parênquima cortical apresentaram forma alterada, paredes sinuosas e aparente aumento no grau de adensamento celular. Na zona de alongamento, foi verificado que o comprimento das células parenquimáticas corticais diminuiu com o aumento da concentração do poluente na solução. Foi visualizado acúmulo de substâncias de natureza pécica ao redor da raiz, nas zonas de alongamento e pilífera, no tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As. A redução no índice mitótico e no alongamento celular em resposta ao As contribuíram para o decréscimo do comprimento da raiz principal e para o não desenvolvimento das raízes laterais. O acúmulo de compostos fenólicos foi freqüente na zona de ramificação, em todos os tratamentos com As, o que reforça a sensibilidade de *C. cajan* ao As, uma vez que essas substâncias estão relacionadas a situações de estresse.

**Palavras-chave:** alongamento celular, alterações anatômicas, compostos fenólicos, índice mitótico.

## Chapter II

### **Arsenic's effects, over a short term exposure, in the initial development of roots of *Cajanus cajan* (Fabaceae) seedlings: structural characterization, histochemistry and genotoxicity**

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the effects of increasing concentrations of arsenic (As) in anatomical, physiological and genotoxicity parameters in roots of *Cajanus cajan* seedlings, after a short period of exposure to the element. Seedlings of *C. cajan* were grown in nutrient solution at different concentrations of As (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup> As), in the form of sodium arsenate, for three consecutive days. Before exposure to the pollutant, the roots were measured and at the end of exposure, the roots were photographed and the root apices were collected for determination of mitotic index. Fragments of other regions of the root were also collected for anatomical characterization, micromorphometrical analysis and histochemical tests for detection of phenolic compounds and pectins. It was found that the growth of root was extremely affected by the presence of As and under the highest concentration of the pollutant (2.0 mg L<sup>-1</sup> As) the main root had darkish and gelatinous appearance. The As promoted reduction in the formation of lateral roots, which was not even seen in 2.0 mg L<sup>-1</sup> As treatment. However, microscopically, it was possible to note that the buds were formed, although they remained retained in the cortex. The seedlings grown under 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup> showed reduction in mitotic index, in comparison to control seedlings. The anatomical changes were more severe in the elongation zone, followed by hair zone, particularly, in the periphery of the root, where the changes were greater as the pollutant concentrations was increased. The epidermal cells and the cortical parenchyma showed altered form, sinuous walls and apparent increase in the degree of cellular density. In the zone of elongation it was found that the length of cortical parenchyma cells decreased as the concentration of the pollutant in the solution increased. The seedling grown under 2.0 mg L<sup>-1</sup> of As showed accumulation of pectic-like substances around the root along the elongation and hair zones. The reduction in mitotic index and cell elongation in response to As contributed to the decrease in length of the main root and to the absence of lateral roots development. The phenolic compounds accumulation was also frequent on the area of branching in all treatments and reinforcing the sensitivity of *C. cajan* to As, since these substances are related to situations of stress.

**Keywords:** cell elongation, anatomical changes, phenolic compounds, mitotic index.

## INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um elemento naturalmente existente na crosta terrestre, sendo também um dos poluentes mais tóxicos existentes (Dutré et al., 1998). O envenenamento por As, relatado em diversas partes do mundo, está geralmente associado à exposição crônica ao poluente, decorrente da ingestão de água contaminada (Anawar et al., 2002) e de vegetais cultivados sobre solos contaminados (Meharg, 2004; Saha & Ali, 2007).

Vários efeitos genotóxicos foram observados em células de seres vivos expostos ao As, tais como: aberrações em cromátides (Cortes & Mateos, 1991), trocas de cromátides irmãs (Kuglik & Slotova, 1991) e ocorrência de micronúcleos (Ma et al., 1995; Huilan et al., 2007). Por este motivo, estas alterações celulares, quando mensuráveis, podem ser utilizadas na avaliação da genotoxicidade causada por este poluente.

Ma et al. (1995) verificaram que o As promove a formação de micronúcleos em raízes de *Allium cepa* e *Vicia faba*, como resultado da exclusão de fragmentos acêntricos do núcleo após a mitose, interferindo na continuidade da ocorrência deste processo. Huilan et al. (2007), além de terem verificado alterações nas taxas de formação de micronúcleos, detectaram retardamento nas atividades mitóticas celulares nos ápices radiculares de *A. cepa* expostos ao As e acrescentaram que esses processos são dependentes da concentração do poluente no meio. Ressalta-se que, além de eficiente, a avaliação do índice mitótico (IM) é uma técnica simples e rápida de ser realizada e, quando aliada a outras metodologias, pode ser utilizada no diagnóstico da sensibilidade de espécies vegetais ao As e, ainda, em processos de biomonitoramento ambiental. Assim como a avaliação do IM, as análises anatômicas qualitativas e quantitativas, bem como as análises fisiológicas e de sintomatologia, têm se revelado adequadas para a avaliação da contaminação ambiental (Blamey et al., 1986; Sresty & Madhava Rao, 1999; Silva et al., 2000; Fornasiero, 2003; Vitória et al., 2003, 2006; Sant'Anna-Santos et al., 2006; Maksimovic et al., 2007).

A sensibilidade de *Cajanus cajan* ao As já foi comprovada por Melo (2006), Felipe (2007) e Silva (2008), mas ainda não se tem conhecimento da amplitude dos danos causados por este poluente, em diferentes concentrações, nas raízes de plântulas

dessa espécie. O fato de *C. cajan* ser uma espécie tropical, aliado a sua resposta rápida ao As, torna a espécie promissora em estudos de monitoramento ambiental no Brasil.

Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de concentrações crescentes de As sobre parâmetros anatômicos, fisiológicos e de genotoxicidade em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (Fabaceae), após um curto período de exposição ao elemento.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Plântulas de *C. cajan*, portando raízes com cerca de 3 cm de comprimento e contendo apenas os primórdios do primeiro par de folhas simples, foram transferidas para os recipientes com solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1938) à meia-força iônica, pH 6,0, com sistema de aeração, para a exposição ao As. A semeadura e o sistema de cultivo foram realizados como descrito no capítulo 1, tendo-se também utilizado uma planta por recipiente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições cada. No tratamento controle utilizou-se somente solução nutritiva e nos tratamentos com 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As adicionou-se arsenato de sódio (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As plântulas foram coletadas para as análises após três dias consecutivos de exposição ao As (de 22/11/08 a 25/11/08) e durante este período procedeu-se ao registro fotográfico das raízes. Toda a solução contaminada com As, resultante do experimento, foi processada de forma a obter-se uma pasta concentrada, com volume reduzido, destinada à incineração.

Antes e após a exposição ao poluente, mensurou-se o comprimento das raízes principais das plântulas, com auxílio de régua milimetrada, para comparação das taxas de alongamento radicular em função da concentração de As no meio externo. Os resultados foram expressos em “redução no comprimento relativo” (RCR), que corresponde ao percentual de redução do comprimento das plantas expostas ao As em comparação às plantas controle.

A avaliação dos efeitos genotóxicos do As sobre as raízes das plântulas de *C. cajan* foi feita através da determinação do índice mitótico (IM) no ápice radicular. Ápices radiculares com 1 mm de comprimento foram coletados no período da manhã (aproximadamente às 10 horas) e fixados em solução de metanol:ácido-acético (3:1 v/v) por 12 horas, a 4 °C e, em seguida, estocados em etanol 70%. Posteriormente realizou-se a reação de Feulgen (Gomori, 1952). Para tal, os ápices foram lavados em água destilada e submetidos à hidrólise ácida com ácido clorídrico 5 M, durante 30 minutos e novamente lavados em água destilada, para a interrupção deste processo. Em seguida, a coifa foi removida com auxílio de um pincel e os ápices foram imersos no reagente de Schiff, durante 45 minutos na ausência de luz, e lavados com água sulfurosa. Para a obtenção do controle do teste foi realizada metodologia semelhante, excluindo-se a hidrólise ácida. Os ápices radiculares foram depositados sobre lâminas histológicas, sobre as quais se gotejou ácido acético 45% e procedeu-se ao esmagamento com lamínula. As lâminas foram imediatamente observadas ao microscópio para contagem das células em divisão mitótica, identificadas por meio da coloração roxa adquirida pelo seu DNA. Foram confeccionadas cinco lâminas por tratamento e em cada uma amostradas cerca de 500 células. Os resultados foram expressos em número de células em mitose/100 células.

A metodologia adotada para a caracterização dos danos causados pelo As na estrutura anatômica, das raízes das plântulas, de *C. cajan* foi similar à descrita no capítulo 1; as análises foram também realizadas em cortes transversais e longitudinais, com 5 µm de espessura, nas três regiões da raiz principal: zona de alongamento (ZA), zona pilífera (ZP) e zona de ramificação (ZR). As análises micromorfométricas, para detecção de possíveis alterações no alongamento das células do parênquima cortical (em secção longitudinal) e quantificação da área ocupada pelo cilindro vascular na raiz (em secção transversal), foram realizadas em cortes de 5 µm de espessura, da ZA e ZP, como descrito no capítulo 1. Foi utilizado o programa de análise de imagens Image Pro-Plus versão 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento e selecionadas três lâminas para cada região da raiz, nas quais foram amostradas, aleatoriamente, três cortes. Para a determinação do comprimento das células parenquimáticas corticais foram mensuradas dez células por corte. Para quantificar a área em secção transversal ocupada pelo cilindro vascular na

raiz, foram realizadas quatro medições no diâmetro da raiz e quatro no diâmetro do cilindro vascular.

Os testes histoquímicos para detecção de compostos fenólicos e mucilagens foram realizados conforme metodologia proposta por Johansen (1940). Para compostos fenólicos, fragmentos da raiz principal foram coletados e fixados em solução aquosa de formalina (4%) com sulfato ferroso (10%), durante 24 h sob vácuo, lavados em água destilada, submetidos à desidratação em série etílica e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Para a obtenção do controle do teste procedeu-se a extração prévia dos compostos fenólicos das amostras, com metanol, por 72 h sob vácuo. Para a detecção de pectinas, fragmentos de raízes foram fixados em glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2, acrescido de cloreto de cálcio 5 mM (Karnovsky, 1965). Procedeu-se a desidratação em série etílica e inclusão das amostras em metacrilato; os blocos obtidos foram seccionados transversalmente e os cortes corados, por 1 h, em solução de vermelho de rutênio 0,001% (Johansen, 1940). Nos dois procedimentos, os cortes transversais, de 5 µm de espessura, foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Para montagem das lâminas, foram utilizados Permount, para o teste de compostos fenólicos, e água glicerinada, para o de detecção de pectinas.

As médias referentes às análises de crescimento radicular, índice mitótico e comprimento das células do parênquima cortical foram submetidas à análise de variância e comparação das médias pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância, empregando-se o programa SAEG – Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (Euclides, 1983).

## **RESULTADOS**

O crescimento da raiz principal das plântulas de *C. cajan* foi afetado pelas concentrações de As utilizadas neste estudo (Figuras 1A-D e 2), sendo inversamente relacionado com a concentração do poluente no meio externo: quanto maior a concentração do poluente, menores as taxas de crescimento radicular.

Após três dias de exposição ao poluente foi possível notar RCR maior que 30%, em relação às raízes das plantas controle, nas plantas expostas ao tratamento com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de As, chegando a atingir RCR de aproximadamente 40 e 60%, nos tratamentos com 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As, respectivamente (Figura 2; Tabela 1).

Ao contrário das raízes do tratamento controle, que permaneceram com coloração esbranquiçada após os três dias de experimento (Figura 1A), as raízes das plântulas expostas a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de As apresentaram um leve escurecimento em ZR (Figura 1B), ao passo que no tratamento com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As este efeito se estendeu por todo o comprimento da raiz principal (Figura 1C). O escurecimento foi ainda mais evidente no tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As, no qual toda a raiz adquiriu coloração amarronzada e aspecto gelatinoso. Nesta mesma concentração, observou-se que a semente também apresentou um forte escurecimento e adquiriu aspecto gelatinoso (Figura 1D).

A emissão de raízes laterais foi afetada pelas concentrações de As utilizadas (Figuras 1B-D), em comparação com o controle (Figura 1A). Na concentração com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de As notou-se redução na quantidade e comprimento das raízes laterais, que se tornou mais acentuada no tratamento com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As. Na concentração mais elevada do poluente, 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As, não foram visualizadas raízes laterais e nem mesmo primórdios.

A curta exposição ao As promoveu redução no IM nos ápices radiculares de *C. cajan* (Figura 3B e 4). Verificou-se diferença significativa neste parâmetro, em relação ao controle (Figura 1A e 4), nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As, com redução de 47,4 e 81,8%, respectivamente (Tabela 1). Raras células em mitose foram visualizadas no tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As. Não foi detectada diferença significativa no IM das plântulas expostas a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de As, em relação ao controle.

Após o curto período de exposição ao As, verificou-se a ocorrência de alterações anatômicas, principalmente na região mais periférica das raízes, na ZA e na ZP, em todas as concentrações do poluente utilizadas, tendo os danos se agravado gradualmente, com o aumento da concentração de As na solução nutritiva (Figura 5A-L).

Na ZA, no tratamento com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de As, as células epidérmicas, assim como as células parenquimáticas pertencentes às 2-3 camadas mais externas do córtex, adquiriram aspecto colapsado e formato achatado. As células das camadas mais internas do córtex apresentaram paredes ligeiramente sinuosas (Figuras 5D-F).

No tratamento com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As os danos foram similares, porém, mais drásticos (Figuras 5G-I). Foram observados sulcos na periferia da raiz, abrangendo a epiderme e as camadas mais externas do córtex (Figuras 5G/H) e achatamento das células epidérmicas (Figura 5I). No tratamento com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As os danos foram mais severos (Figuras 5J-L); na ZP, a periferia da raiz também foi a região mais afetada pelo As e os danos foram similares, porém, menos severos, se comparado à ZA. O depósito de uma substância corada em azul pelo azul de toluidina foi freqüente ao redor da superfície da raiz, assim como células parenquimáticas corticais com paredes anticliniais muito sinuosas (Figura 4L).

As análises micromorfológicas demonstraram que na ZA ocorreu redução no alongamento das células parenquimáticas corticais de 36,0; 39,7 e 68,3%, em relação ao controle, nos tratamentos com  $0,5$ ,  $1,0$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As, respectivamente; não houve diferença significativa entre os tratamentos com  $0,5$  e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As (Tabela 1). Em ZP não foi observada diferença significativa nesse parâmetro, entre nenhum dos tratamentos. Com relação à área, em secção transversal, ocupada pelo cilindro vascular na raiz, verificou-se redução nesse parâmetro somente no tratamento com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As, na ZA. Nas demais regiões da raiz não foram verificadas diferenças significativas. Em todos os tratamentos com As notou-se um aumento do adensamento das células corticais (Figuras 5A/D/G/J), ressaltando-se que este efeito foi muito marcante no tratamento com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As, dispensando a necessidade da análise quantitativa.

A análise microscópica evidenciou que, no tratamento com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As, os primórdios de raiz lateral foram formados, porém, ficaram retidos no córtex (Figuras 6B-C), ao contrário do que ocorreu no tratamento controle, no qual foram visualizadas raízes além dos limites do córtex (Figura 6A). Além disso, verificou-se a desintegração do tecido parenquimático, nas regiões adjacentes a esses primórdios, não observada nos demais tratamentos (Figura 6B).

O teste com vermelho de rutênio revelou que as substâncias acumuladas ao redor da superfície da raiz, coradas de azul pelo azul de toluidina, no tratamento com  $2,0 \text{ mg}$

L<sup>-1</sup> de As, apresentam natureza péctica (Figuras 7D/H). Vale ressaltar que isso ocorreu somente em ZA e ZP, não tendo sido observado em ZR. O resultado do teste para detecção de compostos fenólicos foi positivo, visualizando-se o acúmulo de substâncias de coloração amarronzada, principalmente no xilema secundário, nas regiões de ZR mais próximas à base da raiz (Figuras 8B-D), não tendo o mesmo ocorrido no tratamento controle (Figura 8A).

## DISCUSSÃO

Diferentes respostas dos órgãos vegetativos, tais como crescimento radicular e da parte aérea, acúmulo de biomassa radicular e/ou da parte aérea e biomassa total são passíveis de serem utilizados como indicadores da sensibilidade/tolerância de espécies vegetais a poluentes, inclusive ao As (Mascher et al., 2002; Liu et al., 2005; Geng et al., 2006; Singh et al., 2007). Dentre estes parâmetros de crescimento vegetal, Kapustka et al. (1995) consideraram a seguinte ordem de sensibilidade a poluentes: comprimento radicular > biomassa radicular > altura da parte aérea > biomassa total (raiz mais parte aérea) > biomassa da parte aérea > taxa de germinação. Assim como observado nas plântulas de *C. cajan* no presente estudo, Liu et al. (2005) verificaram, em plântulas de trigo expostas ao As, que o crescimento radicular é o parâmetro de crescimento mais sensível a esse poluente e que está inversamente relacionado à concentração de As no meio externo. A mesma resposta foi observada em plântulas de arroz (Abedin e Meharg, 2002).

O As pode interferir no crescimento radicular em consequência da redução das taxas respiratórias devido à substituição do fosfato pelo arsenato nos processos metabólicos de geração de energia, como a respiração celular (Sharples et al., 2000; Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Durante o experimento discutido neste capítulo, as plântulas ainda eram muito jovens e apresentavam sistema radicular pouco desenvolvido, sugerindo que o crescimento da raiz ainda era muito dependente das reservas contidas na semente (Arteca, 1995). Considerando-se que as sementes também foram bastante afetadas pelo As, apresentando escurecimento, aspecto gelatinoso e amolecimento, o processo amilolítico, juntamente com a respiração celular, pode também ter sido prejudicado pelo As, levando à queda nas taxas de alongamento

radicular devido à redução na atividade de amilases. As amilases são enzimas responsáveis por um dos primeiros passos no metabolismo de degradação de amido para a geração de energia durante a germinação e primeiras etapas do desenvolvimento do vegetal. Dessa forma, a menor atividade dessas enzimas pode reduzir a disponibilidade de energia para o crescimento radicular (Liu et al., 2005).

Há relatos da interferência do As no processo amilolítico, promovendo queda na atividade das  $\alpha$ -amilases e conseqüente redução no crescimento radicular em função do déficit energético (Abedin & Meharg, 2002; Liu et al., 2005). Castillo-Michel et al. (2007) expuseram plântulas de ervilha ao As e verificaram significativa redução nas taxas de alongamento radicular associada à redução na atividade amilolítica, de cerca de 50%, nas raízes.

As  $\alpha$ -amilases são enzimas ativadas pelas giberelinas, hormônios produzidos em maior quantidade por folhas jovens, cuja via metabólica de produção é altamente dependente de compostos fosfatados (Arteca, 1995). Dessa forma, a disponibilidade destes compostos, se afetada pelo As, pode ocasionar a redução nas taxas de produção desse hormônio, interferindo na ativação das  $\alpha$ -amilases. Entretanto, neste estudo, as folhas ainda eram primórdios durante a exposição ao As, sendo este efeito aplicável em plantas em estágio posterior de desenvolvimento. São raras as informações sobre os efeitos do As sobre a biossíntese e ação de fitorreguladores de crescimento, sugerindo-se a realização de trabalhos nesse âmbito, que seriam fundamentais para elucidar o mecanismo da ação do As sobre o crescimento vegetal. Sabe-se que alguns poluentes, como o alumínio (Massot et al., 2002) e o ozônio (Winwood et al., 2006) interferem na biossíntese e transporte de citocininas pelas plantas, acarretando danos nas divisões celulares e redução no alongamento radicular.

A citotoxicidade foi definida por Smaka-Kincl et al. (1996) como um decréscimo no índice mitótico causado por algum agente estressante e, de acordo com Ma et al. (1995), as células meristemáticas podem ser usadas de forma eficiente na detecção da mutagenicidade do ambiente. Pode-se dizer que a fitotoxicidade do As sobre *C. cajan* foi confirmada através dos parâmetros de crescimento avaliados neste estudo. Entretanto, o potencial genotóxico deste poluente sobre esta espécie ainda não é conhecido, e toxicidade nem sempre é sinônimo de genotoxicidade (Kovalchuck et al., 1998). Logo, o ensaio para avaliação do índice mitótico realizado neste estudo demonstrou que, além

de tóxico, o As é um poluente altamente genotóxico para *C. cajan*. Verificou-se também que a genotoxicidade do As está altamente relacionada com a concentração do poluente no meio externo. No tratamento com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As observou-se redução de quase 50% no índice mitótico, com relação ao tratamento controle e no tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As a redução neste parâmetro foi tão drástica que este efeito pode até mesmo ser comparado a uma decapitação do ápice radicular que, ao invés de física, seria uma decapitação fisiológica. Pouquíssimas células em mitose foram visualizadas, sugerindo a não-funcionalidade do meristema apical da raiz das plântulas submetidas a este tratamento. Sugere-se que seja investigado os efeitos do As sobre as enzimas de reparo do DNA, como possível causa da ocorrência de genotoxicidade em células expostas ao As, como sugerido por Schaumlöffel & Gebel (1998).

O efeito negativo do As sobre o índice mitótico no ápice radicular é um fator que elucidada a não-emergência de raízes laterais, no tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As. A redução observada nas taxas de alongamento das células parenquimáticas corticais pode também ter ocorrido nas células do primórdio radicular em formação, retardando seu crescimento. Após exposição de plantas de *C. cajan* ao As, Silva (2008) verificou que os primórdios eram formados, mas permaneciam retidos na raiz, assim como observado neste experimento. Acredita-se que antes da exposição ao As, os primórdios já tenham sido formados na região mais proximal da ZR, e o desenvolvimento posterior tenha sido prejudicado devido os efeitos do poluente sobre as taxas de alongamento e divisão celular. Entretanto, estudos complementares serão necessários para melhor esclarecer a interferência do As no processo de emissão e desenvolvimento de raízes laterais, com coletas periódicas ao longo do tempo.

Em todos os tratamentos com As, foram observadas células corticais e epidérmicas com aspecto colapsado, correspondente à perda de turgidez devido à ocorrência de déficit hídrico na raiz, assim como uma aparente redução nos espaços intercelulares. Uma tentativa de se mensurar os espaços intercelulares foi feita, porém, a compactação do córtex, em conjunto com a sinuosidade nas paredes celulares inviabilizou o processo, uma vez que praticamente não foi possível visualizar os espaços, tão característicos do parênquima. Ressalta-se que estas análises não foram realizadas na ZR por esta ser uma região em que o córtex está sendo naturalmente eliminado devido o crescimento secundário, inviabilizando as medições.

A redução na emissão de raízes laterais nas plantas expostas ao As é um fator que explica, pelo menos em parte, a baixa taxa de absorção de água em função da redução na área de absorção de água e nutrientes. Além disso, é possível que o efeito negativo do As sobre a respiração celular tenha ocasionado uma menor disponibilidade de energia para a raiz, comprometendo a manutenção do potencial hídrico e, conseqüentemente, a absorção de água. Cabe salientar que a absorção de água pela raiz é dependente da existência de um potencial osmótico negativo no interior do órgão em função da absorção de íons, o que envolve gasto de energia (Taiz & Zeiger, 1998). Logo, se a disponibilidade energética da raiz é prejudicada pelo As, a absorção de água pode ser afetada, o que explica a perda de turgidez das células do córtex, mesmo com as plantas sendo cultivadas em meio hidropônico. O conjunto de células com menor volume em função da perda de turgidez, por sua vez, torna o córtex menos desenvolvido, o que resultou no aumento relativo, na área em secção transversal, do cilindro vascular das raízes expostas ao As, no tratamento com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Na verdade, o As não proporcionou o aumento do cilindro vascular, mas sim a redução da área ocupada pelo córtex.

O alongamento celular ocorre em função da expansão da célula vegetal, a qual resulta de dois processos físicos independentes: pressão de turgor (dependente da absorção de água de forma eficiente) e produção de parede celular (McCann et al., 2001). Aparentemente, estes dois processos foram prejudicados nas raízes das plântulas de *C. cajan* expostas ao As, levando à redução no alongamento das células corticais. A possibilidade de ocorrência de déficit hídrico já foi apresentada. Com relação à expansão da parede celular, ressalta-se que na região mais periférica das raízes, principalmente do tratamento com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As, foi possível notar aumento no espessamento das paredes celulares, que se coraram intensamente com o azul de toluidina, indicando alterações. Além disso, o teste com vermelho de rutênio revelou o acúmulo de substâncias pécticas ao redor da periferia das raízes das plântulas expostas à concentração máxima de As utilizada, o que possivelmente resultou da mudança da composição da parede celular e/ou desintegração das mesmas.

O acúmulo de compostos fenólicos é mais um indicativo da sensibilidade de *C. cajan* ao As, visto que estas substâncias são componentes dos mecanismos de defesa não-enzimáticos contra fatores causadores de estresse (Vaughn & Duke, 1984). Alguns

compostos fenólicos podem atuar na interceptação do elemento estressor, ligando-se a este e inibindo sua ação oxidante, ou atuar no reparo, removendo intermediários reativos de oxigênio (Michalak, 2006), possivelmente gerados pela presença do As no meio intracelular.

Sugere-se a realização de estudos complementares para a avaliação da produção e acúmulo de compostos fenólicos, atividades enzimáticas e alterações micromorfológicas, visando à elucidação dos mecanismos de resposta de *C. cajan* ao As.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDIN, M.D.J. & MEHARG, A.A. 2002. Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil** 243: 57-66.

ARTECA, R.N. 1995. **Plant growth substances: principles and applications**. New York: Chapman & Hall. 332 p.

ANAWAR, H.M.; AKAI, J.; MOSTOFA, K.M.G.; SAFIULLAH, S. & TAREQ, S.M. 2002. Arsenic poisoning in groundwater: health risk and geochemical sources in Bangladesh. **Environmental International** 27: 597-604.

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: 171-180.

CASTILLO-MICHEL, H.; PARSONS, J.G.; PERALTA-VIDEA, J.R.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, A.; DOKKEN, K.M. & GARDEA-TORRESDEY. 2007. Use of X-ray absorption spectroscopy and biochemical techniques to characterize arsenic uptake and reduction in pea (*Pisum sativum*) plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 45: 457-463.

CORTES, F.P. & MATEOS, S. 1991. Premature onset of mitosis and potentiation of chromosome damage induced by poly-D-lysine in plant cells: evidence of G2 repair. **Mutation Research** 247: 147-151.

DUTRÉ, V.; KESTENS, C.; SCHAEF, J. & VANDECASTEELE, C. 1998. Study of the remediation of a site contaminated with arsenic. **Science of the Total Environment** 220: 185-194.

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

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

GENG, C.N.; ZHU, Y.G.; HU, Y.; WILLIAMS, P. & MEHARG, A.A. 2006. Arsenate causes differential acute toxicity to two P-deprived genotypes of rice seedlings (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil** 279: 297-306.

GOMORI, G. 1952. **Microscopic Histochemistry: Principles and Practice**. Chicago: The University of Chicago Press. 273 p.

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

HUILAN, Y.; WU, L. & JIANG, L. 2007. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleous assay. **Science of the Total Environment** 383: 232-236.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Paul B. Hoeber, Inc. 790 p.

KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. 2001. **Trace elements in soils and plants**. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press. 413p.

KAPUTSKA, L.A.; LIPTON, J.; GALBRAITH, H.; CACELA, D. & LEJEUNE, K. 1995. Metal and arsenic impacts to soils, vegetation communities and wildlife habitat in southwest Montana uplands contaminated by smelter emissions: II. Laboratory phytotoxicity studies. **Environmental Toxicology & Chemistry** 14: 1905-1912.

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

KOVALCHUK, O.; KOVALCHUK, I.; ARKHIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B. & KOVALCHUK, L. 1998. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research** 415: 47-57.

KUGLIK, P. & SLOTOVA, J. 1991. Different effects of pretreatment with tritiated thymidine (tritiated) on radiation-induced sister chromatid exchanges (SCEs) and micronuclei in *Vicia faba* root tip. **Biologia Plantarum** 33: 291-297.

LOCKHART, J.A. 1965. Na analysis of irreversible plant cell elongation. **Journal of Theoretical Biology** 8: 264-275.

LIU, X.; ZHANG, S.; SHAN, X. & ZHU, Y. 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. **Chemosphere** 61: 293-301.

MA, T.H.; ZHIDONG, X.; CHENGEN, X.; McCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A. & ZHANG, H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research** 334: 185-195.

MAKSIMOVIC, I.; KASTORI, R.; KRSTIC, L. & LUCOVIC, J. 2007. Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. **Biologia Plantarum** 51(3): 589-592.

MASCHER, R.; LIPPMANN, B.; HOLZINGER, S. & BERGMANN, H. 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. **Plant Science** 163: 961-969.

MASSOT, N.; NICANDER, B.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. & TILLBERG, E. 2002. A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede  $Al^{+3}$ -induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Growth Regulation** 37: 105-112.

MCCANN, M.C.; ROBERTS, K. & CARPITA, N.C. 2001. Plant cell growth and elongation. In: **Encyclopedia of life Sciences**. Chichester: John Wiley & Sons.

MEHARG, A.A. 2004. Arsenic in rice – understanding a new disaster for South-East Asia. **Trends in Plant Science** 9: 415-417.

MICHALAK, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies** 15(4): 523-530.

SAHA, G.C. & ALI, M.A. 2007. Dynamics of arsenic in agricultural soils irrigated with arsenic contaminated groundwater in Bangladesh. **Science of the Total Environment** 379: 180-189.

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: 313-321.

SCHAUMLOFFEL, N. & GEBEL, T. 1998. Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. **Mutagenesis** 13: 281-286.

SHARPLES, J.M.; MEHARG, A.A.; CHAMBERS, S.M. & CAIRNEY, J.W.G. 2000. Mechanism of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. **Plant Physiology** 124: 1327-1334.

SILVA, K.L.F. 2008. **Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio.** Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, MG. 98 p.

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

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: 65-73.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M. & TOMAN, M.J. 1996. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research** 368: 171-179.

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: 3-13.

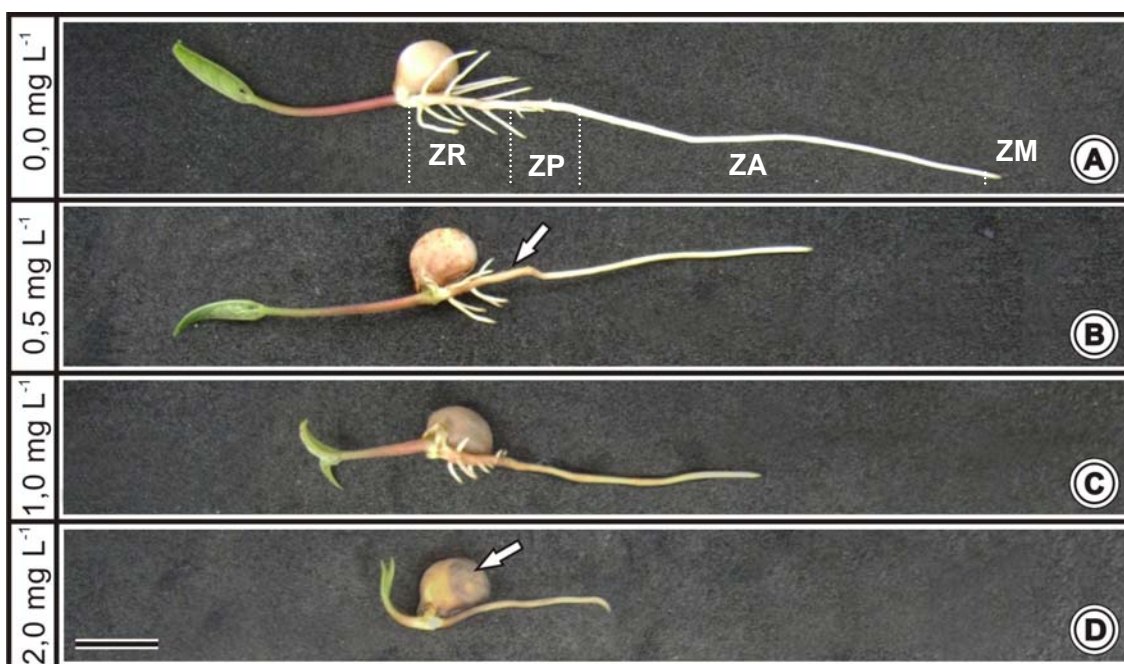
TAIZ, L. & ZEIGER, E. 1998. **Plant Physiology.** 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland. 792 p.

VAUGHN, K. & DUKE, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum** 60: 106-112.

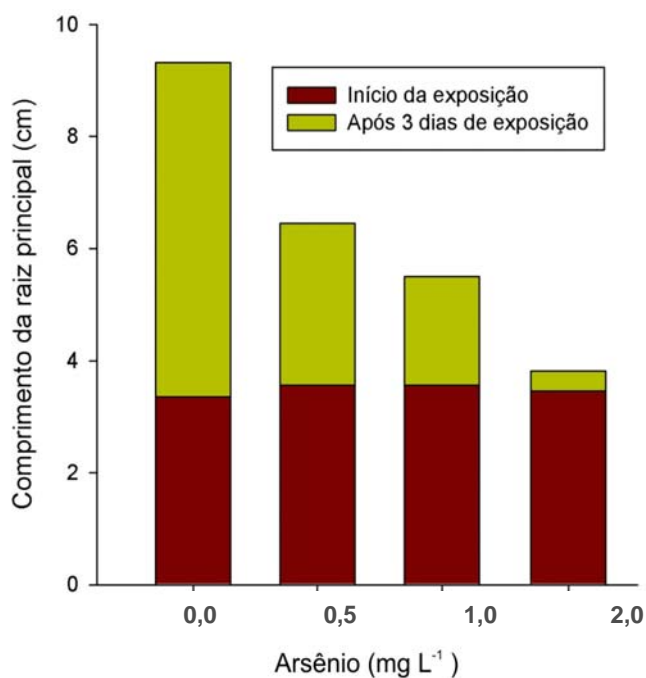
VITÓRIA, A.P.; RODRIGUEZ, A.P.M.; CUNHA, M.; LEA, P.J. & AZEVEDO, R.A. 2003. Structural changes in radish seedlings exposed to cadmium. **Biologia Plantarum** 47: 561-568.

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

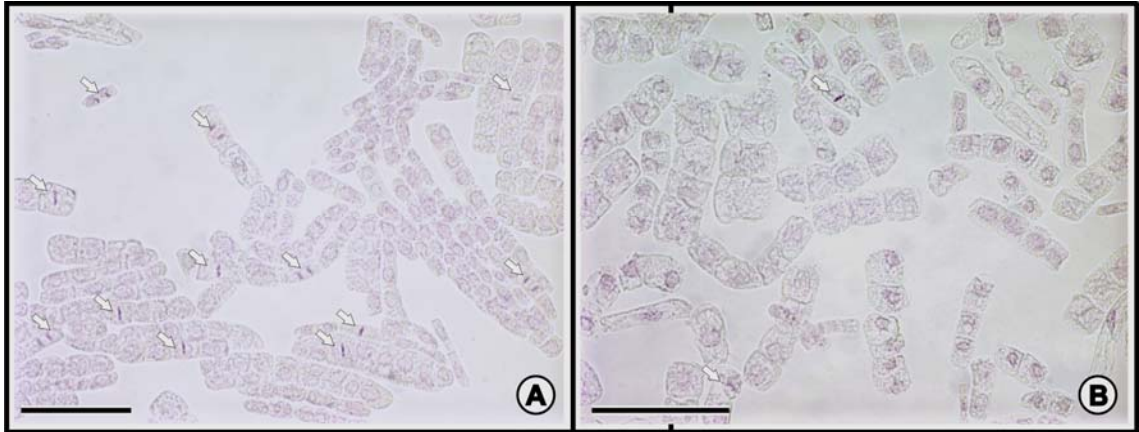
WINDWOO, J.; PATE, A.E.; PRICE, A.J. & HANKE, D.E. 2006. Effects of long-term, free-air ozone fumigation on the cytokinin content of mature beech trees. **Plant Biology** 9: 265-278.



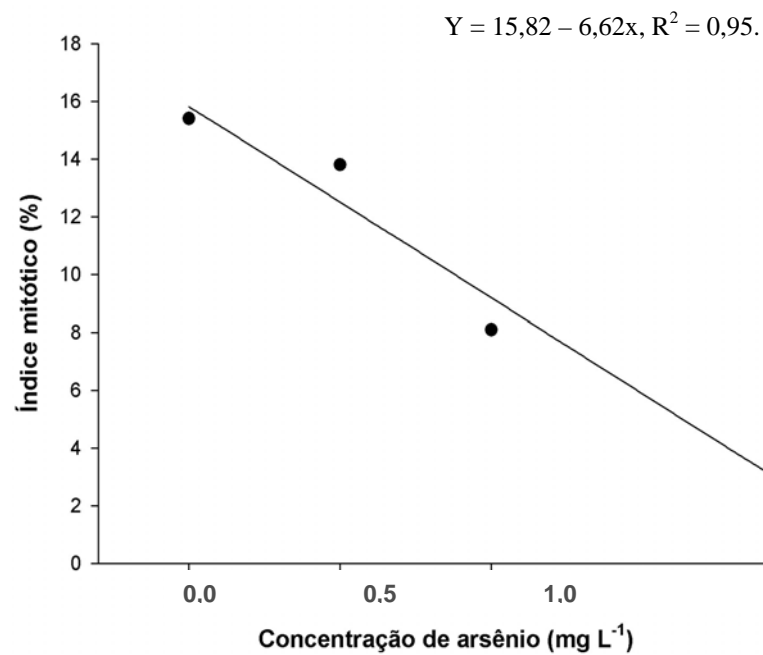
**Figura 1** – Crescimento e desenvolvimento radicular de plântulas de *Cajanus cajan*, após três dias consecutivos de exposição ao arsênio, em sistema hidropônico. A – Tratamento controle. B – Escurecimento na zona de ramificação da raiz (seta) e redução no comprimento da raiz principal e no número e comprimento das raízes laterais. C – Escurecimento da raiz principal e redução no número e comprimento das raízes laterais. D – Gelatinização e escurecimento da raiz e da semente (seta). Raízes laterais ausentes. Abreviaturas – ZA: zona de alongamento, ZP: zona pilífera, ZR: zona de ramificação. Barra = 2 cm.



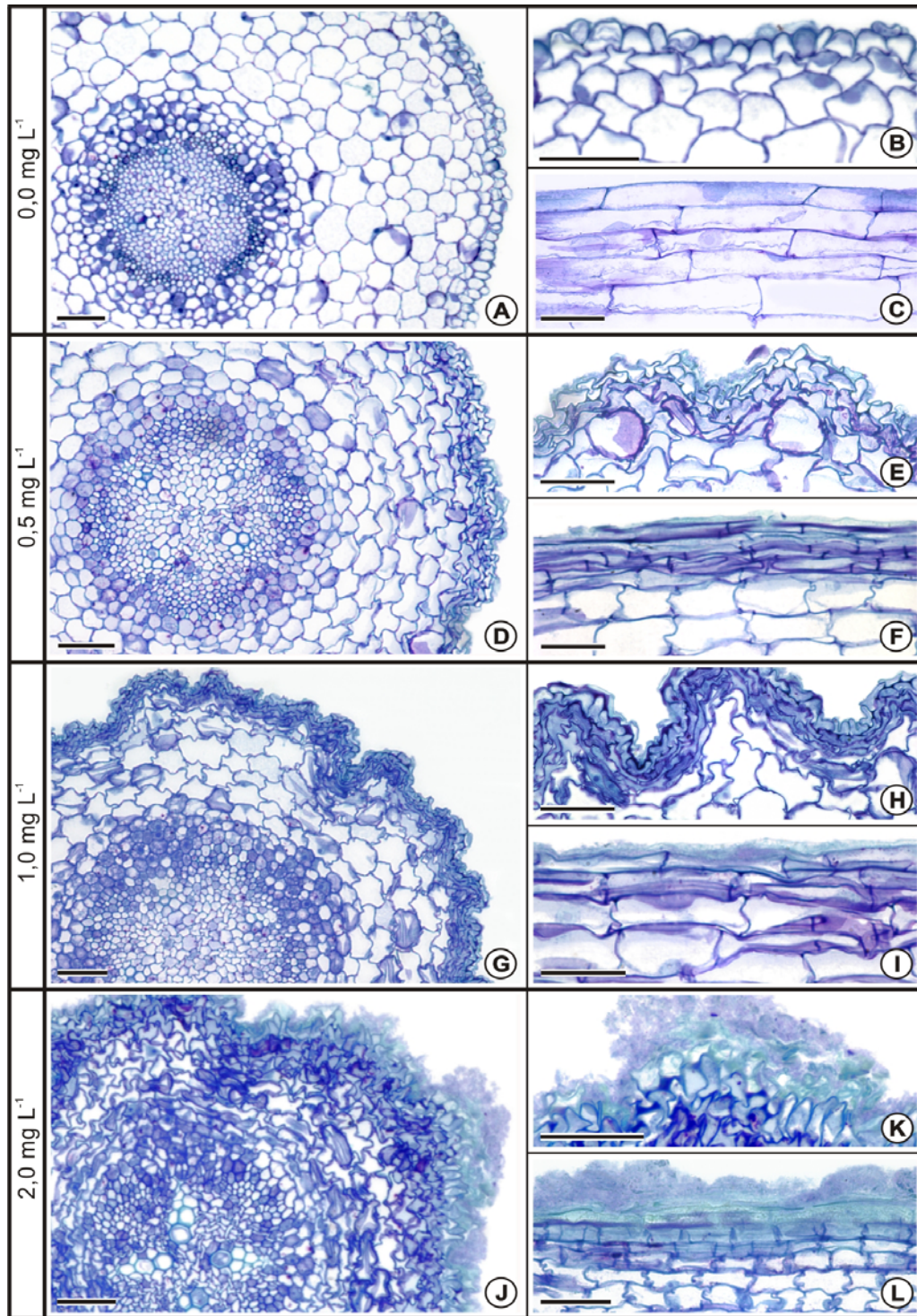
**Figura 2** - Comprimento da raiz principal de plântulas de *Cajanus cajan*, antes e após a exposição a concentrações crescentes de As, em sistema hidropônico, durante três dias consecutivos.



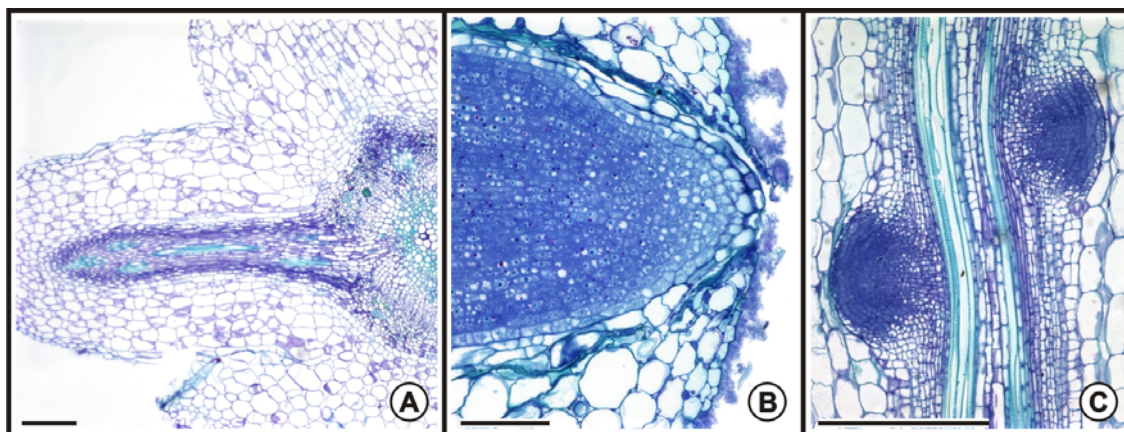
**Figura 3** – Efeitos do arsênio sobre o índice mitótico em raízes de plântulas de *Cajanus cajan*. A – Tratamento controle com um elevado número de células em mitose. B – Tratamento com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As, com poucas células em mitose. Barras = 100 μm.



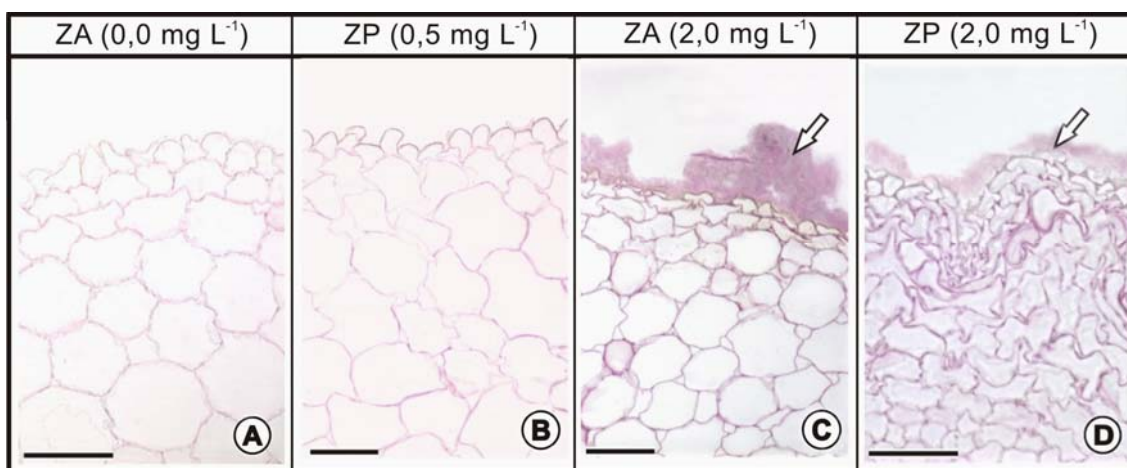
**Figura 4** - Índice mitótico em ápices radiculares de plântulas de *Cajanus cajan* expostas a diferentes concentrações de arsênio, por três dias consecutivos, em sistema hidropônico.



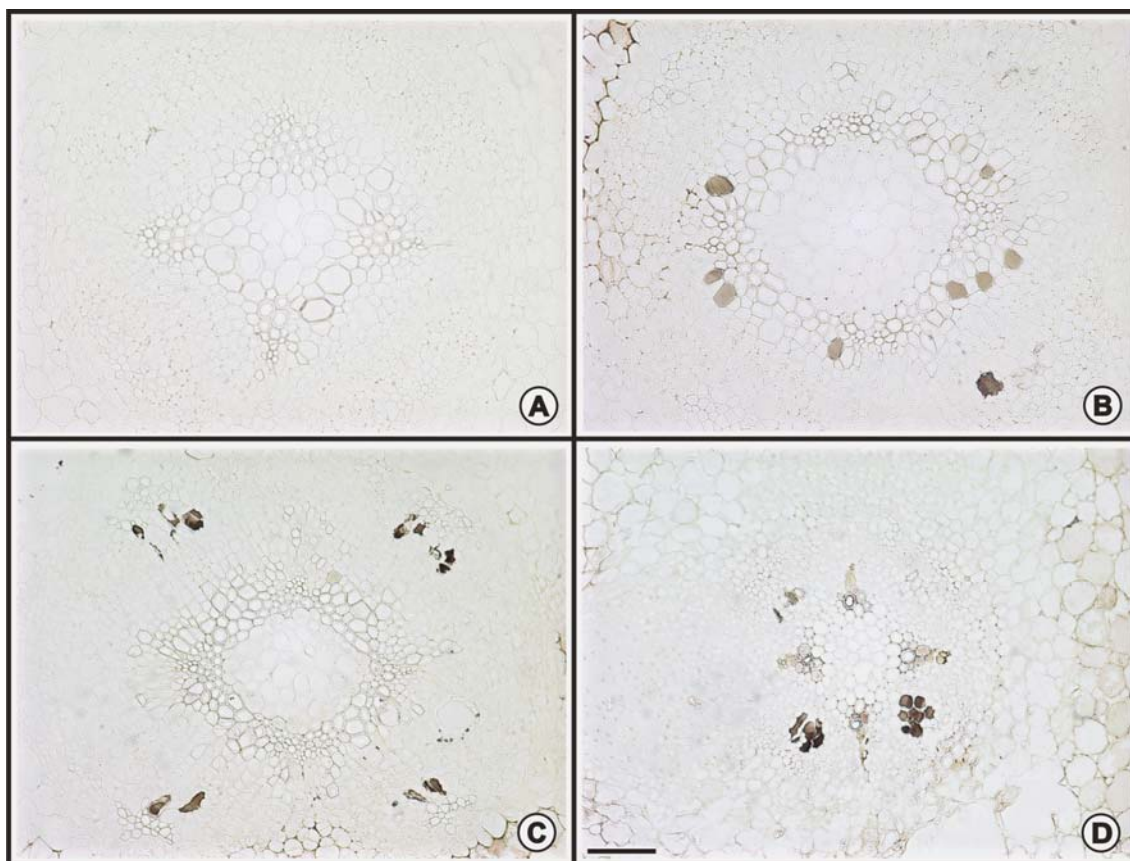
**Figura 5** - Efeitos de concentrações crescentes de arsênio na estrutura da zona de alongamento de raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (microscopia de luz, coloração com azul de toluidina). A-B/D-E/G-H/J-K – Secção transversal. C/F/I/L – Secção longitudinal. A-C – Tratamento controle. D - Perda de turgidez das células epidérmicas e das camadas mais externas do córtex. E – Região periférica da raiz levemente sulcada. F – Alterações no aspecto das células epidérmicas e corticais. G - Colapso das células das camadas periféricas da raiz e presença de sulcos. H – Detalhe do sulco na periferia da raiz. I – Células epidérmicas e corticais mais externas achatadas. Células corticais internas colapsadas. J – Córtex constituído por células colapsadas. K-L – Acúmulo de substâncias sobre a epiderme. Redução no comprimento das células do córtex, que apresentam paredes extremamente sinuosas. Barras = 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6** – Efeitos do arsênio na formação e emissão de raízes laterais (microscopia de luz, coloração com azul de toluidina). A – Tratamento controle (secção transversal). B-C – Tratamento com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As. As raízes foram formadas, mas permaneceram retidas no córtex. B – Secção transversal. C - Secção longitudinal. Barras =  $100 \mu\text{m}$ .



**Figura 7** - Região periférica das secções transversais das raízes expostas a diferentes concentrações de arsênio, submetidas ao teste para detecção de pectinas com vermelho de rutênio (microscopia de luz). A e B – Tratamento controle. C e D – Tratamento com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As. Acúmulo de substâncias pécicas externamente à epiderme (seta). Abreviaturas: ZA (zona de alongamento); ZP (zona pilífera). Barras =  $50 \mu\text{m}$ .



**Figura 8** – Localização dos compostos fenólicos (teste com sulfato ferroso) em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* submetidas a diferentes concentrações de arsênio (microscopia de luz, secções transversais). Teste A – Tratamento controle: Reação negativa para compostos fenólicos. B, C e D – Tratamentos com 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As, respectivamente. Reação positiva para compostos fenólicos. Barra = 100 µm.

**Tabela 1** - Comprimento da raiz principal, índice mitótico, área ocupada pelo cilindro vascular na raiz e comprimento das células do parênquima cortical da raiz de *Cajanus cajan* após três dias consecutivos de exposição a concentrações crescentes de arsênio, em sistema hidropônico

As (mg L <sup>-1</sup> )	CR (cm)	RCR (%)	CCP (µm)		ACV (%)	
			ZA	ZP	ZA	ZP
<b>0,0</b>	9,3 a (± 0,8)	0 a	47,9 a (± 9,3)	129,2 a (± 19,5)	26,2 c	29,3 a
<b>0,5</b>	6,5 b (± 0,6)	30,1 b	30,7 b (± 6,8)	133,7 a (± 20,2)	30,0 bc	27,4 a
<b>1,0</b>	5,5 c (± 0,1)	40,9 c	28,9 b (± 5,4)	126,4 a (± 17,6)	34,4 abc	27,1 a
<b>2,0</b>	3,8 d (± 0,2)	59,1 d	15,2 c (± 3,7)	123,4 a (± 18,2)	38,1 ab	26,0 a

Médias seguidas por letras iguais, na vertical, não diferem entre si, quando comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Abreviaturas: CCP = comprimento das células parenquimáticas; ACV = área do cilindro vascular, em secção transversal; CR = comprimento radicular; IM = índice mitótico; RCR = redução no comprimento relativo; ZA = zona de alongamento; ZP = zona pilífera.

## CONCLUSÕES GERAIS

- *Cajanus cajan* é uma espécie sensível ao arsênio (As), e esta sensibilidade é dependente do tempo de exposição e da concentração do poluente no meio externo, como evidenciado pelos dados obtidos.
- O crescimento e o desenvolvimento das raízes (laterais e principal) foram os parâmetros mais evidentemente afetados pelo As.
- O As alterou o índice mitótico nos ápices radiculares de *C. cajan*, o que caracteriza este poluente como um agente genotóxico para esta espécie.
- O acúmulo de substâncias de natureza péctica ao redor das raízes demonstra que o As promove alterações na parede celular das células situadas na periferia do órgão.
- O As promoveu alterações anatômicas nas raízes de *C. cajan*. Logo, a anatomia vegetal mostrou-se uma importante ferramenta na caracterização da sensibilidade de *C. cajan* ao poluente.
- Sugere-se que a região de emissão das raízes laterais constitua uma importante via de entrada para o As.
- O As interfere na diferenciação celular e estabelecimento do crescimento secundário em raízes de *C. cajan*.
- Além das alterações qualitativas, o As também promoveu alterações micromorfométricas em regiões aparentemente saudias ou não.
- Estudos posteriores serão necessários para elucidar os efeitos do As na ultra-estrutura de *C. cajan* e correlacionar as alterações com aspectos fisiológicos do desenvolvimento radicular.