

**SAMARA ARCANJO E SILVA**

***Borreria verticillata* (RUBIACEAE):  
CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E RESPOSTAS  
MORFOFISIOLÓGICAS AO ARSÊNIO**

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  
2013**

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

T

S586b  
2013

Silva, Samara Arcanjo e, 1989-

*Borreria verticillata* (Rubiaceae): caracterização nutricional e respostas morfofisiológicas ao arsênio / Samara Arcanjo e Silva. – Viçosa, MG, 2013.

xi, 50f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Aristéa Alves Azevedo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Borreria verticillata* - Anatomia. 2. *Borreria verticillata* - Fisiologia. 3. *Borreria verticillata* - Populações. 4. Arsênio. 5. Poluição. 6. Plantas - Nutrição. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.93

**SAMARA ARCANJO E SILVA**

***Borreria verticillata* (RUBIACEAE):  
CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E RESPOSTAS  
MORFOFISIOLÓGICAS AO ARSÊNIO**

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: 20 de março de 2013.**

---

Prof Dr. Cleberson Ribeiro

---

Prof Dr. Evaristo Mauro de Castro

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Aristéa Alves Azevedo  
(Orientadora)

Aos meus pais, meus verdadeiros mestres, pelo amor,  
educação e exemplo de vida;

Ao Sanzio, meu noivo, pelo amor, companheirismo e apoio,

**DEDICO**

“Um sonho sonhado sozinho  
é um sonho. Um sonho  
sonhado junto é realidade.”

Raul Seixas

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me conceder saúde e força para lutar pelos meus sonhos, e por não me deixar desistir nos momentos de provação.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, à CAPES e ao Programa Sisbiota pela oportunidade de continuar meus estudos e obter o título de mestre.

À minha orientadora, Aristéa Alves Azevedo, pelo exemplo de vida e de amor à profissão. Obrigada por tantos ensinamentos transmitidos em tão pouco tempo de convivência.

À professora Luzimar Campos da Silva por ter me orientado nos primeiros meses do mestrado e por sempre torcer pelas minhas conquistas.

Aos professores Jaime Wilson Vargas de Mello e Juraci Alves de Oliveira pela coorientação e disponibilidade em me atender.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, na pessoa do Prof. Fábio Murilo da Matta, por permitirem a utilização dos equipamentos e laboratórios sob sua coordenação.

Ao Rogério Gomide pelo auxílio na montagem dos experimentos, ao Carlos Torres (“Mi Vô”) pela ajuda com as digestões de material vegetal e ao Mário Pereira (DPS) pelo auxílio com as leituras no plasma.

Aos colegas de pós-graduação, Samuel (Samuca), Paulo Eduardo (Paulete), Kelly, Regiane e Cristiane, pelo esclarecimento de inúmeras das minhas dúvidas no trabalho prático.

Aos amigos do laboratório de anatomia vegetal, em especial à Dya, Carla (Mana), Luana, Carol, Valéria, Talita, Larisse, Gui, Aurora e Patrícia, pela ótima convivência e todas as conversas que tornaram os momentos difíceis alegres e divertidos.

Ao grupo do arsênio, Nay, Pri, Ivan e Alexandre, pela amizade e ajuda em cada um dos minutos deste trabalho. Essa conquista é de vocês também!

Aos amigos de Oliveira, de Lavras e de Viçosa pelo incentivo e por todas as experiências divididas.

À todos os meus familiares pelas palavras de incentivo e pela torcida sempre.

À tia Ilda pelo apoio e confiança em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pela educação e por sempre acreditarem na minha capacidade, encorajando-me e incentivando-me a dar novos passos na minha caminhada.

Ao Sanzio, meu noivo, pelo amor e carinho. Obrigada por toda a ajuda em casa e nos experimentos. Hoje você se torna mestre junto comigo!

E a todos que, de alguma maneira, contribuíram para essa vitória.

**Muito obrigada!**

## **BIOGRAFIA**

Samara Arcanjo e Silva, filha de Maurício Augusto da Silva e Solange de Fátima Arcanjo, nasceu em Oliveira/MG, em 12 de janeiro de 1989.

Cursou o ensino médio na E. E. Professor Pinheiro Campos, em Oliveira, concluindo em 2006.

Ingressou na Universidade Federal de Lavras em setembro de 2007 e concluiu o curso de bacharelado em Ciências Biológicas em julho de 2011.

Em agosto de 2011, iniciou o Mestrado em Botânica, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso com a defesa da dissertação intitulada “*Borreria verticillata* (Rubiaceae): Caracterização Nutricional e Respostas Morfofisiológicas ao Arsênio”, em março de 2013.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO 1 - Crescimento e nutrição mineral de plantas de <i>Borreria verticillata</i> (Rubiaceae) cultivadas em diferentes soluções nutritivas .....	6
Resumo.....	6
Abstract .....	7
1. Introdução .....	8
2. Material e Métodos .....	9
2.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	9
2.2. Implantação do experimento.....	10
2.3. Aspecto geral das plantas e análise do crescimento .....	10
2.4. Determinação do teor de macronutrientes nos tecidos .....	11
2.5. Determinação da eficiência de absorção, de uso e de translocação de macronutrientes.....	11
2.6. Análise estatística .....	11
3. Resultados .....	12
4. Discussão.....	13
5. Conclusões .....	16
6. Referências Bibliográficas .....	16
Anexos.....	19
CAPÍTULO 2 – Respostas morfofisiológicas ao arsênio em plantas de <i>Borreria verticillata</i> provenientes de sítio contaminado e não contaminado com As .....	23
Resumo.....	23
Abstract .....	24
1. Introdução .....	25
2. Material e Métodos .....	27
2.1. Obtenção, aclimação e exposição das plantas aos tratamentos.....	27
2.2. Análise do crescimento .....	27

2.3. Determinação dos teores de arsênio (As) e de macronutrientes nos tecidos e fatores de bioacumulação (FBA) de As e translocação (FT) de As e macronutrientes.....	28
2.4. Análise visual e microscópica.....	28
2.5. Determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido, catalase, peroxidase e polifenoloxidase.....	29
2.7. Determinação do teor de compostos tiolados .....	30
2.8. Análise estatística .....	31
3. Resultados .....	31
4. Discussão.....	33
5. Conclusões .....	37
6. Referências Bibliográficas .....	38
Anexos.....	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	50

## RESUMO

SILVA, Samara Arcanjo e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. ***Borreria verticillata* (Rubiaceae): Caracterização Nutricional e Respostas Morfofisiológicas ao Arsênio.** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo. Coorientadores: Jaime Wilson Vargas de Mello, Juraci Alves de Oliveira e Luzimar Campos da Silva.

O arsênio (As) é um elemento tóxico aos seres vivos liberado no ambiente por fontes naturais e antrópicas. A fitorremediação – utilização de plantas na recuperação de ambientes contaminados – requer a seleção de espécies tolerantes ao poluente. *Borreria verticillata* é encontrada em ambientes com alta concentração de As no solo, a exemplo do Morro do Galo (Nova Lima/MG). Estudos desenvolvidos em solução nutritiva de Hoagland constataram maior tolerância nas plantas provenientes do Morro do Galo do que em plantas oriundas de local sem o metaloide (Mata do Paraíso, Viçosa/MG). A escolha da solução nutritiva é um aspecto importante devido à competição entre o arsenato e o fosfato pelos mesmos transportadores de membrana. Este trabalho teve como objetivo estudar o desenvolvimento de plantas de *B. verticillata* nas soluções nutritivas de Hoagland e de Clark de modo a determinar a formulação mais indicada para estudos de suas respostas morfofisiológicas ao As com o intuito de elucidar mecanismos de tolerância presentes nas populações aclimatada e não aclimatada ao As. Plantas de *B. verticillata* das populações do Morro do Galo (MG) e da Mata do Paraíso (MP) foram cultivadas em solução de Hoagland e de Clark à ½ força durante 40 dias e o crescimento e a eficiência nutricional foram determinados. As plantas apresentaram respostas mais homogêneas quando cultivadas na solução de Clark. Quando cultivadas na solução de Hoagland as plantas da MP mostraram-se superiores no acúmulo de nutrientes e no crescimento e semelhantes às plantas do MG na eficiência nutricional. A solução de Clark mostrou-se mais indicada para o estudo da tolerância da espécie ao As devido à resposta semelhante das duas populações e à menor concentração de fósforo. Dessa forma, plantas de *B. verticillata* provenientes do MG e da MP foram cultivadas em solução de Clark à ½ força contendo 0,0 e 66,0 µM de As por 4 dias para a investigação dos mecanismos envolvidos na tolerância diferencial ao As nas duas populações. Para tal, estudou-se o acúmulo e a distribuição de As e macronutrientes e as respostas morfofisiológicas das plantas a este elemento. O maior acúmulo de As nas raízes foi responsável pela ocorrência de danos mais severos nesse órgão, no entanto, também foram observados sintomas de toxidez na parte aérea em ambas as populações.

A presença de As na solução nutritiva promoveu alterações nas características nutricionais das plantas do MG, como o aumento do acúmulo de cálcio nas raízes, redução do fator de translocação de fósforo, cálcio e enxofre, além de aumento na produção de idioblastos cristalíferos e fenólicos nas raízes, incremento na atividade da dismutase do superóxido e síntese de compostos tiolados nas folhas. Já as plantas da MP exibiram incremento no número de idioblastos fenólicos nas raízes e aumento na atividade da polifenoloxidase nas folhas. As estratégias de detoxificação de As apresentadas pelas plantas do MG conferiram a esta população maior tolerância ao metaloide, sugerindo a possível utilização na revegetação de ambientes contaminados.

## ABSTRACT

SILVA, Samara Arcanjo e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2013. ***Borreria verticillata* (Rubiaceae): Nutritional characterization and Morphophysiological Responses to Arsenic.** Adviser: Aristéa Alves Azevedo. Co-advisers: Jaime Wilson Vargas de Mello, Juraci Alves de Oliveira and Luzimar Campos da Silva.

Arsenic (As) is an element toxic to living beings which is released on the environment by natural and anthropic sources. Phytoremediation – the utilization of plants on the recovery of contaminated environments – requires selecting species that are tolerant to the pollutant. *Borreria verticillata* is found in environments with high concentrations of As in the soil, for example Morro do Galo (municipality of Nova Lima/MG). Studies developed in Hoagland nutrient solution found higher tolerance on plants from the Morro do Galo than plants from the site without metalloid (Mata do Paraíso, municipality of Viçosa/MG). Choosing the nutrient solution is an important aspect due to the competition between arsenate and phosphate for the same membrane transporters. This work aimed to study the development of plants of *B. verticillata* in Hoagland and Clark nutrient solutions, in order to determine the formulation more indicated for studies of their morphophysiological responses to As, with the objective of elucidating tolerance mechanisms present on populations acclimatized and non-acclimatized to As. Plants of *B. verticillata* of populations from Morro do Galo (MG) and Mata do Paraíso (MP) were cultivated in Hoagland and Clark solutions at ½ strength during 40 days, and growth and nutritional efficiency were determined. Plants showed more homogenous responses when cultivated in Clark solution. When cultivated in Hoagland solution, plants from MP were superior regarding nutrient accumulation and growth, and similar to plants from MG regarding nutritional efficiency. As such, Clark solution was more indicated for studying the tolerance of the species to As, due to the similar response of the two populations and to the lower phosphorous concentration. Therefore, plants of *B. verticillata* from MG and MP were cultivated in Clark solution at ½ strength containing 0.0 and 66.0 µM of As for 4 days, for investigation of the mechanisms that provide differential tolerance to As on the two populations. For this, accumulation and distribution of As and macronutrients, as well as morphophysiological responses of plants to this pollutant, were studied. The higher accumulation of As on roots was responsible for the occurrence of more severe damage on this organ, however, symptoms of toxicity were also observed on shoots of both populations. The presence of

As in the nutrient solution promoted alterations on the nutritional characteristics of plants from MG, such as increase on the accumulation of calcium on roots, reduction on the translocation factor of phosphorous, calcium and sulfur, as well as increase on the production of crystalliferous and phenolic idioblasts on roots, increment on the activity of superoxide dismutase and synthesis of thiolated compounds on leaves. Plants from MP, on the other hand, exhibited increment on the number of phenolic idioblasts on roots and increase on the activity of polyphenol oxidase on leaves. The As detoxification strategies presented by plants from MG provided this population with higher tolerance to the metalloid, suggesting possible utilization on revegetation of contaminated environments.

## INTRODUÇÃO GERAL

O arsênio (As) é o vigésimo elemento mais abundante na geosfera (Zhao et al., 2010; Vithanage et al., 2012), podendo ser encontrado na forma de arsenito ( $\text{As}^{+3}$ ), arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ), ácidos arsenosos, ácidos arsênicos e formas metiladas mais simplificadas (Kumaresan & Riyazuddin, 2001).

A contaminação ambiental com As pode resultar da atividade geológica natural, a partir do intemperismo das rochas que o contêm, como rochas ígneas e sedimentares ricas em minérios sulfetados (Ladeira et al., 2002; Rhodes, 2010). Contudo, a ação antrópica tem aumentado de forma significativa as concentrações de As no ambiente, principalmente devido às atividades industriais, liberação de esgotos, mineração, metalurgia, manufatura de vidros e aplicação de fertilizantes e pesticidas (Francisco et al., 2002; Nagajyoti et al., 2010).

No Brasil, a mineração e o refino de minério são as principais fontes antropogênicas de contaminação ambiental por As. No Quadrilátero Ferrífero (Minas Gerais), grande quantidade de As foi liberada como resultado da mineração secular do ouro e, juntamente com as fábricas de trióxido de arsênio, é responsável pela contaminação do solo e da água, ameaçando a saúde dos moradores das cidades de Ouro Preto, Mariana, Santa Bárbara e Nova Lima (Borba, 2002; Deschamps & Matschullat, 2007, Gilberti, 2012).

A via mais comum de exposição humana ao As é por meio da ingestão de água contaminada, entretanto, a inalação de gases e de poeira também é destacada (Matschullat, 2000; Figueiredo et al., 2006). Segundo a Agência de Proteção Ambiental, o As é um elemento carcinogênico do grupo A e pode causar câncer de pele, de bexiga e de pulmão, má formação e morte fetal em espécies animais, incluindo o homem (US-EPA, 1998), além de doenças de pele, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e diabetes (Barra et al., 2000; Hughes et al., 2009).

O As é um elemento bioacumulativo e, uma vez liberado no ambiente, não é degradado, o que agrava seus efeitos e torna necessária a adoção de técnicas eficientes na sua remoção (Mercedes et al., 2002). A recuperação de ambientes contaminados utilizando métodos convencionais (físico-químicos) apresenta desvantagens como custo elevado, produção de grande volume de material tóxico e alteração da estrutura e ecologia dos solos (Salt et al., 1995, Tangahu et al., 2011). A remediação de sítios impactados com uso de seres vivos (biorremediação) é considerada uma alternativa

economicamente viável e ecologicamente correta, por ser uma técnica de baixo custo e possuir baixo impacto ambiental (Cunningham & Ow, 1996; Tangahu et al., 2011).

Apesar da toxicidade do As, diferentes espécies vegetais são capazes de se desenvolver em ambientes contaminados. O desenvolvimento das plantas em relação à presença de As na rizosfera difere em função de sua concentração, da presença de outros íons e de fatores intrínsecos da espécie no que se refere à sua capacidade de tolerar o elemento (Gonzaga et al., 2006), o que permite o emprego da fitorremediação na recuperação de ambientes impactados. Entretanto, nem todas as plantas se prestam para tal fim.

Algumas características são determinantes para se classificar uma espécie com potencial para a fitorremediação, dentre elas: capacidade de absorção, acumulação e/ou metabolização e tolerância ao poluente; alta taxa de crescimento e produção de biomassa; fácil propagação; ocorrência natural em áreas poluídas; e capacidade de se desenvolver em ambientes diversificados (Salt et al., 1998, Vose et al., 2000, Pires et al., 2003; Dhankher et al., 2011). É necessário também avaliar a real tolerância da espécie ao estresse por meio do estudo de suas respostas morfofisiológicas, tendo em vista a concentração e o tempo de exposição ao poluente (Campos, 2011).

*Borreria verticillata* (L.) G.F.W. Mayer (Rubiaceae), conhecida popularmente como vassourinha ou erva-botão, é uma planta herbácea invasora de pastagens e áreas cultivadas (Modesto Júnior & Mascarenhas, 2001) devido ao seu crescimento rápido e fácil adaptação a diferentes ambientes. A espécie é nativa da América (Maynard et al., 1980) e possui ampla distribuição no Brasil (Dimitri, 1959). Sua ocorrência em local com alto teor de As no solo foi o primeiro indício da sua tolerância ao metaloide (Silva, 2008).

Os primeiros estudos sobre a tolerância de *B. verticillata* ao As, realizados por Silva (2008), demonstraram que a espécie é capaz de acumular quantidades expressivas de As em seus tecidos, apresentando mecanismos que conferem a ela certo grau de tolerância ao metaloide. Posteriormente, Campos (2011) investigou as respostas de plantas de duas populações ao As, a fim de verificar se a tolerância era decorrente de polimorfismo fenotípico ou genético. A autora confirmou a suspeita de que plantas que se desenvolvem em solos com altos teores de As apresentariam maior tolerância do que plantas que crescem em ambiente isento de contaminação por meio de estudos que evidenciaram os efeitos tóxicos do As combinado a diferentes doses de fósforo (P) em plantas dessas populações.

No entanto, algumas lacunas de conhecimento permaneceram após tais estudos. Dentre elas, qual seria a influência da concentração de nutrientes na solução nutritiva sobre a tolerância da espécie ao As. Esta preocupação é, principalmente, com relação ao P, devido à competição entre fosfato e arsenato pelos mesmos transportadores de membrana (Merharg & Macnair, 1992; Merharg & Hartley-Whitaker, 2002), o que pode diminuir a absorção de As pelas plantas e levar à interpretação superestimada da tolerância da espécie ao metaloide. Outra questão era estabelecer quais os mecanismos de detoxificação de As que proporcionam maior tolerância às plantas do Morro do Galo.

Visando sanar essas lacunas de conhecimento e fornecer subsídios para a avaliação do potencial de *Borreria verticillata* para a fitorremediação de arsênio, este trabalho foi desenvolvido com os objetivos específicos de: estudar o desenvolvimento de plantas de *B. verticillata*, provenientes de local contaminado (Morro do Galo) e não contaminado com As (Mata do Paraíso), em soluções nutritivas contendo diferentes concentrações de nutrientes de modo a determinar a formulação mais indicada para estudos das respostas ao As; e investigar as respostas morfofisiológicas desta espécie ao As com intuito de elucidar os mecanismos que proporcionam tolerância diferencial às populações aclimatada e não aclimatada ao As.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barra, C.M., Santelli, R.E., Abrão, J.J., Guardia, M. 2000. Especiação de arsênio, uma revisão. **Quím. Nova** 23: 58-70.
- Borba, R.P. 2002. **Arsênio em ambiente superficial: processos geoquímicos naturais e antropogênicos em uma área de mineração aurífera**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. 113 p.
- Campos, N.V. 2011. **Respostas morfofisiológicas em plantas de *Borreria verticillata* (Rubiaceae) expostas a diferentes doses de arsênio e fósforo**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 48p.
- Cunningham, S.D., Ow, D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiol.** 100: 715-719.
- Deschamps, E., Matsullat, J. 2007. **Arsênio antropogênico e natural. Um estudo em regiões do quadrilátero ferrífero**. Fundação Estadual do meio ambiente. Belo Horizonte. 330p.
- Dhankher, O.P., Pilon-Smits, E.A.H., Meagher, R.B., Doty, S. 2011. Biotechnology approaches for phytoremediation. In Altman, A., Hasegawa, P.M. **Plant Biotechnology and Agriculture**. Oxford, Academic Press. p. 309-328.

- Dimitri, S.B. 1959. Rubiaceae da cidade do Rio de Janeiro: tribo Spermaceae. **Rodriguésia** 22: 241-283.
- Figueiredo, B.R., Borba, R.P., Angélica, R.S. 2006. Arsênio no Brasil e exposição humana. In Silva, C.; Figueiredo, B.; Capitani, E.; Cunha, F. **Geologia médica no Brasil**. Rio de Janeiro, CPRM, p. 64-70.
- Francisco, F.R., Joni, M.B., Debby, F. 2002. Evaluation of a GPF reporter gene construct for environmental arsenic detection. **Talanta** 58: 181-188.
- Gilberti, L.H. 2012. **Potencial para o uso de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) na fitorremediação de áreas contaminadas por arsênio**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 68p.
- 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. **Environ. Poll.** 143: 254-260.
- Hughes, M.F., Thomas, D.J., Kenyon, E.M. 2009. Toxicology and Epidemiology of Arsenic and its Compounds. In Henke, K. (ed.). **Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment**. New Jersey, John Wiley & Sons, p. 237-275.
- Kumaresan, M., Riyazuddin, P. 2001. Overview of speciation chemistry of arsenic. **Curr. Sci.** 80: 837-846.
- Ladeira, A.C.Q., Ciminelli, V.S.T., Nepomuceno, A.L. 2002. Seleção de solos para a imobilização de arsênio. **Rev. Esc. Minas** 55: 215-221.
- Matschullat, J. 2000. Arsenic in the geosphere - a review. **Sci. Tot. Environ.** 249: 297-312.
- Maynard, G., Pousset, J.L., Mboup, S., Denis, F. 1980. Antibacterial effect of borreverine, an alkaloid isolated from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). **C. R. Seances Soc. Biol. Fil.** 174, 925-928.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. 1992. Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system, a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. **J. Exp. Bot.** 43: 519-524.
- Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytol.** 154: 29-43.
- Mercedes, D.R., Rafael, F., Concepcin, A. 2002. Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadamar river area after the toxic spill of the Aznalcollar mine. **J. Biotechnol.** 98: 125-137.
- Modesto Júnior, M.S., Mascarenhas, R.E.B. 2001. Levantamento da infestação de plantas daninhas associada a uma pastagem cultivada de baixa produtividade no nordeste paraense **Planta Daninha** 19: 11-21.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environ. Chem. Lett.** 8: 199-216.
- Pires, F.R., Souza, C.M., Silva, A.A., Procópio, S.O., Ferreira, L.R. 2003. Fitorremediação de solos contaminados por herbicidas. **Planta Daninha** 21: 335-341.

- Rhodes, V.P. 2010. **Distribuição de mercúrio e arsênio nos sedimentos de área afetada por garimpo de ouro – Rio Gualaxo do Norte, Mariana-MG.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Minas, Ouro Preto, MG, Brasil. 93p.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkoy, V., Ensley, B.D., Chet, I.; Raskin, I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Biotechnology** 13: 468-475.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. 1998. Phytoremediation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49: 643-668.
- Silva, K.L.F. 2008. **Avaliação de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 97p.
- Tangahu, B.V.; Abdullah, S.R.S.; Basri, H.; Idris, M.; Anuar, N.; Mukhlisin, M. 2011. A Review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **Int. J. Chem. Eng.** 2011: 1-31.
- US-EPA: Environmental Protection Agency. (1998). Guidelines for neurotoxicity risk assessment. **Federal Register** 63: 26926-26954.
- Vithanage, M., Dabrowska, B.B., Mukherjee, A.B., Sandhi, A., Bhattacharya, P. 2012. Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. **Environ. Chem. Lett.** 10: 217–224.
- Vose, J.M., Wayne, T.S., Harvey, G.J., Clinton, B.D.; Sobek, C. 2000. Leaf water relations and sapflow in Eastern cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.) trees planted for phytoremediation of a groundwater pollutant. **Int. J. Phytorem.** 2: 53-73.
- Zhao, F.J., McGrath, S.P., Meharg, A.A. 2010. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. **Annu. Rev. Plant Biol.** 61: 535–59.

## CAPÍTULO 1

### **Crescimento e nutrição mineral de plantas de *Borreria verticillata* (Rubiaceae) cultivadas em diferentes soluções nutritivas**

**RESUMO:** Estudos sobre o acúmulo de poluentes por vegetais são essenciais para a seleção de espécies fitorremediadoras. Tais estudos são comumente realizados em sistemas hidropônicos, entretanto, há carência de pesquisas sobre a influência do tipo de solução nutritiva nos resultados obtidos. O objetivo deste trabalho foi investigar o crescimento e o estado nutricional de plantas de *Borreria verticillata* provenientes das populações da Mata do Paraíso (MP) e Morro do Galo (MG), nas soluções nutritivas de Hoagland e de Clark, de modo a determinar a formulação mais indicada ao cultivo desta espécie para o posterior estudo de suas respostas morfofisiológicas ao arsênio (As). As soluções foram utilizadas à ½ força, com pH 5,5 e 5,8, respectivamente. A montagem do experimento foi em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 e 5 repetições. A análise do crescimento foi realizada semanalmente e a eficiência nutricional foi determinada ao final dos 40 dias de estudo. As duas soluções nutritivas foram adequadas ao cultivo das plantas. As plantas do MG apresentaram maior altura da parte aérea, enquanto as plantas da MP se mostraram mais ramificadas. Na solução de Clark, as populações apresentaram respostas mais homogêneas quanto ao crescimento e ao estado nutricional. Entretanto, quando cultivadas em solução de Hoagland, as plantas da MP exibiram maiores médias para volume das raízes e massa fresca e seca da parte aérea e da raiz, além de maior acúmulo de P, Ca, K, Mg e S. As plantas do MG apresentaram maior eficiência de absorção de P, entretanto, a eficiência de uso (EU) e de translocação (ET) deste nutriente foi menor nessa solução. Nas plantas da MP a EU-P também foi menor. Foi observada maior EU-S nas plantas da MP e maior ET-Mg nas plantas do MG. Diante dos resultados sugere-se a utilização da solução nutritiva de Clark em estudos sobre a tolerância de *B. verticillata* ao As, devido às respostas semelhantes das duas populações para os parâmetros estudados e à menor concentração de P na solução, o que reduz a competição com o As pelos sítios de absorção.

**Palavras-chave:** teor de macronutrientes, eficiência nutricional, alocação de biomassa.

## CHAPTER 1

### **Growth and mineral nutrition of plants of *Borreria verticillata* (Rubiaceae) cultivated in different nutrient solutions**

**ABSTRACT:** Studies on the accumulation of pollutants by plants are essential for selecting phytoremediator species. Such studies are commonly carried out in hydroponic systems, however, there is a lack of researches on the influence of the type of nutrient solution on the results obtained. The objective of this study was to investigate growth and nutritional state of plants of *Borreria verticillata* of populations from Mata do Paraíso (MP) and Morro do Galo (MG), in Hoagland and Clark nutrient solutions, in order to determine the formulation more indicated to the cultivation of this species, for the posterior study on its morphophysiological responses to arsenic (As). Solutions were used at ½ strength, with pH 5,5 and 5,8 respectively. The experimental design was completely randomized, in 2x2 factorial scheme and 5 replicants. Growth analysis was carried out weekly and nutritional efficiency was determined at the end of the 40 days of study. Both nutrient solutions were efficient for plant cultivation. Plants from MG presented higher shoot height, while plants from MP were more branched. In Clark solution, populations showed more homogenous responses regarding growth and nutritional state. However, when cultivated in Hoagland solution, plants from MP exhibited higher averages for roots' volume, and roots' and shoots' fresh and dry weigh, as well as higher accumulation of P, Ca, K, Mg and S. Plants from MG presented higher P absorption efficiency, however, use (UE) and translocation efficiency (TE) of this nutrient were lower in this solution. On plants from MP, UE-P was also lower. Higher UE-S on plants from MP and higher TE-Mg on plants from MG were observed. In the light of the results, the use of Clark nutrient solution on studies on As tolerance of *Borreria verticillata* is suggested, due to the similar responses of the two populations on the parameters studied and to the lower P concentration in the solution, which reduces the competition with As for absorption sites.

**Keywords:** macronutrients content, nutritional efficiency, biomass allocation

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos com o intuito de investigar os efeitos de poluentes como Cd, Pb, As e Hg em plantas são conduzidos principalmente em sistema hidropônico devido à menor complexidade do sistema quando comparado ao cultivo em solo, à maior facilidade de acesso às raízes para o estudo dos danos provocados pelo poluente e também por se conhecer a constituição exata da solução nutritiva (Franco & Prado, 2006; Prieto Martinez & Clemente, 2011).

A primeira solução nutritiva para o cultivo hidropônico de plantas foi proposta por Hoagland & Arnon em 1950 e, a partir de então, novas soluções foram propostas por outros autores com base em modificações nas concentrações de nutrientes visando adaptá-la ao cultivo de diferentes espécies (Franco & Prado, 2006). O cultivo de plantas sem solo vem sendo estudado desde a descoberta das exigências nutricionais de diferentes espécies e, atualmente, é utilizado comercialmente na produção de hortaliças e plantas ornamentais e também em pesquisas científicas (Prieto Martinez & Clemente, 2011).

A solução de Hoagland tem sido amplamente empregada no cultivo de plantas com o objetivo de avaliar a tolerância a metais pesados como Cd, Cu, Pb e Zn (Kováčik et al., 2009; Wang et al., 2009; El-Betagi & Mohamed, 2010). Entretanto, no caso do As, muitos autores utilizam a formulação proposta por Clark (1975) devido ao menor conteúdo de fósforo (P), uma vez que o arsenato e o fosfato competem pelos mesmos transportadores de membrana (Merharg & Macnair, 1992; Merharg & Hartley-Whitaker, 2002). Contudo, a carência de estudos sobre a influência do tipo de solução nutritiva empregada em pesquisas sobre os efeitos do As em plantas gera dificuldades na comparação dos resultados obtidos em tais investigações.

A ampla ocorrência de *Borreria verticillata* no Morro do Galo, um local com alto teor de As no solo devido ao depósito de rejeitos de mineração de ouro e das atividades de uma fábrica de trióxido de arsênio, em Nova Lima (MG, Brasil) (Deschamps & Matschullat, 2007), despertou a curiosidade de pesquisadores para a sua tolerância ao metaloide. O As é um elemento não essencial e tóxico às plantas, encontrado na superfície terrestre nas formas orgânica (formas metiladas) e inorgânica (p. ex. arsenato e arsenito) (Kumaresan & Riyazuddin, 2001).

Silva (2008) evidenciou a tolerância de *B. verticillata* ao As e Campos (2011) mostrou que plantas provenientes de sítio contaminado (Morro do Galo - MG) são mais

tolerantes ao As do que plantas que se desenvolvem em ambientes sem contaminação, como a Mata do Paraíso (MP) em Viçosa/MG. Em ambos os trabalhos, o cultivo das mudas foi realizado em sistema hidropônico com solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) contendo As. Por meio destes estudos foi possível observar também que plantas de *B. verticillata* se desenvolvem bem na solução de Hoagland. No entanto, essa solução apresenta grande concentração de P, o que pode interferir na absorção de As (Merharg & Macnair, 1992; Merharg & Hartley-Whitaker, 2002).

Apesar de a solução de Clark ser mais utilizada em estudos dos efeitos do As em plantas, não há relatos sobre a eficiência dessa solução para o cultivo de *B. verticillata*. Além da concentração de P, é necessário avaliar se a solução nutritiva escolhida possui a quantidade adequada de nutrientes para o desenvolvimento das plantas, uma vez que plantas com deficiência nutricional podem ter a resposta ao poluente afetada por tal estresse.

Dessa forma, este estudo objetivou comparar o crescimento e a eficiência nutricional de plantas de *B. verticillata* provenientes do Morro do Galo (MG) e da Mata do Paraíso (MP) nas soluções nutritivas de Hoagland e de Clark de modo a determinar a formulação mais indicada ao cultivo desta espécie para posterior estudo de suas respostas morfofisiológicas ao As.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal e condições de cultivo**

Plantas adultas de *Borreria verticillata* (L.) G.F.W. Mayer (Rubiaceae) foram coletadas na Mata do Paraíso e no Morro do Galo. A Mata do Paraíso está localizada no município de Viçosa/MG, nas coordenadas 20°38'07"S e 42°51'31"W, e não possui registros de contaminação com arsênio. O Morro do Galo situa-se no município de Nova Lima/MG, nas coordenadas 19°57'45"S e 43°51'07"W, e possui teor médio de As no solo igual a 10.975 mg Kg<sup>-1</sup> (Deschamps & Matschullat, 2007). Exemplares herborizados encontram-se incorporados ao Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC) com o número de registro VIC 32771.

As mudas foram obtidas a partir de estacas de cerca de 10 cm das plantas matrizes e cultivadas em areia lavada, recebendo irrigação diária e adubação semanal com solução nutritiva de Hoagland modificada para ½ força iônica (Hoagland & Arnon, 1950) e com pH ajustado em 5,5.

## 2.2. Implantação do experimento

Após atingirem cerca de 40 cm de altura, as mudas mais homogêneas foram retiradas dos vasos e as raízes lavadas em água corrente, para retirada da areia, e em solução de hipoclorito de sódio (10%) para desinfestação. Posteriormente, foram cultivadas em sistema hidropônico, em caixas de isopor com capacidade para 3 L (protegidas com plástico preto para evitar a entrada de luz), com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950, modificada) à ½ força e pH 5,5 e solução de Clark (1975, modificada) à ½ força e pH 5,8 sob aeração constante, conforme apresentado no quadro 1. As soluções foram renovadas semanalmente durante 40 dias. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e uma planta por repetição.

**Quadro 1.** Concentração de nutrientes nas soluções nutritivas de Hoagland e de Clark à meia força, conforme utilizadas neste trabalho.

Macronutrientes (mmol L <sup>-1</sup> )	Solução nutritiva		Micronutrientes (µmol L <sup>-1</sup> )	Solução nutritiva	
	Hoagland	Clark		Hoagland	Clark
<b>Ca</b>	2,0	1,3	<b>Fe</b>	45	45
<b>K</b>	3,0	0,9	<b>B</b>	23	9,5
<b>NH<sub>4</sub></b>	0,5	0,5	<b>Zn</b>	0,65	1,0
<b>NO<sub>3</sub></b>	7,0	3,5	<b>Cu</b>	0,15	0,25
<b>Mg</b>	1,0	0,3	<b>Mn</b>	6,3	3,5
<b>S</b>	1,0	0,3	<b>Mo</b>	0,05	0,3
<b>P</b>	0,5	0,0345	<b>Cl</b>	-	0,25

## 2.3. Aspecto geral das plantas e análise do crescimento

O aspecto geral da parte aérea e das raízes foi observado a cada 2 dias de modo a detectar possíveis sintomas causados pela toxidez e/ou deficiência de nutrientes.

Semanalmente a altura da parte aérea foi medida com auxílio de régua, sempre no ramo de maior altura, e foi determinado o volume da raiz com o auxílio de proveta e de pipeta graduada. O volume da proveta foi ajustado em 1 L com água desionizada antes das raízes serem mergulhadas. O volume de água que ultrapassou a marcação de 1 L foi retirado e medido em pipeta graduada, correspondendo ao volume da raiz.

A massa fresca das raízes e da parte aérea foi determinada ao final do período experimental com auxílio de balança de precisão. Para a determinação da massa seca, as plantas foram secas em estufa de ventilação forçada a 70 °C até peso constante e pesadas.

#### 2.4. Determinação do teor de macronutrientes nos tecidos

Após secas, raiz e parte aérea de *B. verticillata* foram trituradas em moinho do tipo Wiley. Amostras de 100 mg de matéria seca das raízes e da parte aérea foram adicionadas a tubos contendo 2 mL de HNO<sub>3</sub> 70% e mantidas em pré-digestão em temperatura ambiente por 14 horas. Posteriormente, os tubos foram colocados em bloco digestor com temperatura controlada e aquecidos a 100 °C por 2 horas. Após resfriamento, adicionou-se 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seguindo-se reaquecimento a 130 °C por 6 horas (adaptado de Manhas Verbi Pereira et al., 2006). Tubos contendo apenas ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, submetidos aos mesmos procedimentos das amostras vegetais foram utilizados como branco e para o preparo da curva padrão. Os teores de P, Ca, K, Mg e S foram determinados em espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES modelo Optima 7300 DV PerkinElmer, Inc. Shelton, CT, USA) e expressos em mg KgMS<sup>-1</sup>.

#### 2.5. Determinação da eficiência de absorção, de uso e de translocação de macronutrientes

As eficiências de absorção (I), de translocação (II) e de utilização (III) de P, Ca, K, Mg e S foram calculadas com base no conteúdo dos mesmos e na massa seca das plantas (Siddiqi & Glass, 1981; Li et al., 1991; Swiader et al., 1994).

$$EA \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{conteúdo total do nutriente na planta}}{\text{massa seca das raízes}} \quad \text{(I)}$$

$$ET \text{ (\%)} = \frac{\text{conteúdo do nutriente na parte aérea}}{\text{conteúdo total do nutriente na planta}} \times 100 \quad \text{(II)}$$

$$EU \text{ (g}^2 \text{ mg}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{matéria seca total})^2}{\text{conteúdo total do nutriente na planta}} \quad \text{(III)}$$

#### 2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial (2x2 - duas populações e duas soluções nutritivas) com o auxílio do programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância) (Ferreira, 2000). O teste de significância foi realizado a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS

Não foram observados sintomas de toxidez e/ou deficiência de nutrientes na parte aérea ou nas raízes das plantas de ambas as populações.

Ao se comparar o efeito de cada solução nutritiva no desenvolvimento das populações individualmente, ao fim de 40 dias de cultivo, observou-se que as plantas do Morro do Galo (MG) apresentaram altura da parte aérea (APA), volume das raízes (VR), massa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA, respectivamente) e das raízes (MFR e MSR, respectivamente) estatisticamente iguais nas soluções de Clark e de Hoagland, enquanto as plantas da Mata do Paraíso (MP) mostraram aumento significativo nestes parâmetros na solução de Hoagland (Tabela 1), com exceção da MSR.

Quando se comparou o desenvolvimento das populações na mesma solução nutritiva, observou-se que as plantas da MP e do MG não exibiram diferenças quanto ao VR, MFPA, MFR, MSPA e MSR quando cultivadas na solução de Clark (Tabela 1). As plantas da MP cultivadas em solução de Hoagland apresentaram maiores médias para VR, MFPA, MFR, MSPA e MSR quando comparadas com as plantas do MG (Tabela 1); e em ambas as soluções, as plantas do MG apresentaram maior APA. As plantas da MP exibiram arquitetura da parte aérea diferente, em ambas as soluções, com maior número de ramificações laterais do que as plantas do MG (Figura 1).

Estudando-se o crescimento em altura da parte aérea ao longo dos 40 dias de tratamento, observou-se que as plantas do MG e da MP cultivadas na solução de Hoagland apresentaram crescimento linear. Quando cultivadas em solução de Clark, as plantas de ambas as populações apresentaram crescimento mais acentuado a partir do 20º dia de cultivo (Figura 2A-C). O volume das raízes das plantas da MP aumentou linearmente na solução de Hoagland (Figura 2D), enquanto nas plantas do MG o crescimento foi mais acentuado nos primeiros 25 dias de cultivo (Figura 2B). Já quando cultivadas em solução de Clark, as raízes das plantas de ambas as populações apresentaram maior crescimento nos primeiros 15 dias de tratamento (Figura 2B-D).

Não foi observada diferença significativa no acúmulo total de P, K, Mg e S ao se comparar o acúmulo dos macronutrientes pelas populações em cada solução nutritiva separadamente, ou seja, no desdobramento de população em solução nutritiva. Já o teor de Ca foi maior nas plantas do MG cultivadas na solução de Clark quando comparado com as plantas da MP cultivadas nesta mesma solução (Tabela 2).

Comparando-se então o efeito de cada solução nutritiva no acúmulo dos nutrientes pelas populações separadamente, isto é, o desdobramento das soluções nutritivas dentro de cada população, observou-se que o conteúdo total dos macronutrientes e o conteúdo na parte aérea e nas raízes das plantas do MG não diferiram devido ao cultivo nas soluções de Clark e de Hoagland. No entanto, as plantas da MP mostraram maior teor total de todos os nutrientes quando cultivadas em solução de Hoagland; na parte aérea houve aumento nos conteúdos de P, Ca, K e Mg e nas raízes o houve maior acúmulo de P, K e Mg (Tabela 2).

As eficiências de absorção (EA), de uso (EU) e de translocação (ET) de P, Ca, K, Mg e S não diferiram entre as populações quando as plantas foram cultivadas na solução de Clark. Quando cultivadas na solução de Hoagland, as plantas do MG apresentaram maior EA-P do que quando cultivadas em solução de Clark, entretanto, a EU e a ET deste nutriente foi menor nessa solução. As plantas da MP também apresentaram menor EU-P na solução de Hoagland e, além disso, foi observada maior EU-S nas plantas da MP e maior ET-Mg nas plantas do MG (Tabela 3).

#### **4. DISCUSSÃO**

O suprimento inadequado de minerais essenciais ao desenvolvimento das plantas resulta em distúrbios nutricionais que se manifestam na forma de sintomas característicos de deficiência ou de toxidez (Taiz & Zeiger, 2010) que, conseqüentemente, afetam o crescimento. As soluções nutritivas de Hoagland e de Clark foram adequadas ao cultivo das plantas de ambas as populações de *B. verticillata*, uma vez que não foram observados sintomas de deficiência e/ou excesso de nutrientes.

No entanto, o maior acúmulo de biomassa nas plantas da MP na solução de Hoagland é um indicativo de que o uso desta solução em estudos sobre a tolerância ao As pode influenciar os resultados obtidos. Acredita-se que o cultivo em solução de Hoagland possa aumentar a tolerância ao metaloide devido à maior concentração de P na solução, reduzindo a absorção de As pelas plantas, uma vez que fosfato e arsenato competem pelos mesmos transportadores (Merharg & Macnair, 1992; Merharg & Hartley-Whitaker, 2002). Adicionalmente, a taxa P:As nos órgãos tende a ser mantida elevada, desfavorecendo o As na competição pelos sítios de fosfato nas moléculas e contribuindo para a tolerância ao mesmo (Liu et al., 2005; Smith et al., 2010). Os efeitos da concentração de nutrientes na solução nutritiva sobre a tolerância ao Al foram

muito estudados na década de 1980, em espécies como *Sorghum bicolor*, *Oriza sativa* e *Triticum aestivum* (Furlani & Clark, 1981; Camargo e Oliveira, 1981; Camargo, 1984; Camargo, 1985). Camargo (1984), por exemplo, observou que o aumento na concentração de sais, principalmente de Ca, na solução implica em aumento da tolerância ao Al em algumas cultivares de arroz. Por meio dos resultados dessas pesquisas, ficou claro que a concentração de nutrientes na solução nutritiva pode influenciar a tolerância das plantas ao Al, no entanto, há carência de trabalhos sobre este efeito na tolerância ao As.

A diferença na arquitetura observada nas plantas do MG e da MP se mostrou uma característica constitutiva, uma vez que, mesmo as plantas não estando em seu ambiente natural, as características foram mantidas. Essa diferença está relacionada às condições ambientais em que estas populações se desenvolvem originalmente, tendo em vista que estas normalmente competem pela luz solar e apresentam mecanismos que aumentam a eficácia na interceptação de luminosidade (Taiz & Zeiger, 2010). As plantas do MG crescem em um ambiente aberto e altamente impactado que é o Morro do Galo em Nova Lima/MG, onde há domínio de plantas herbáceas. Nesses ambientes, o investimento no crescimento em altura é uma característica vantajosa devido à ocorrência de competição pela luminosidade entre plantas do mesmo estrato. As plantas da MP, pelo contrário, estão originalmente localizadas em ambiente com luminosidade difusa, na Mata do Paraíso (Viçosa/MG), o que requer estratégias que promovam aumento na interceptação de luz solar, neste caso, o investimento em ramificações.

A alta concentração de nutrientes na solução de Hoagland proporcionou maior incremento na biomassa nas plantas da MP, o que está de acordo com o maior acúmulo de todos os macronutrientes nessas plantas, enquanto as plantas do MG não apresentaram resposta. De acordo com Chapin (1980), ecótipos (populações geneticamente distintas adaptadas a diferentes ambientes) de sítios férteis crescem mais rapidamente do que os ecótipos de locais inférteis e com o aumento da disponibilidade de nutrientes apresentam maior incremento na taxa de crescimento. Esta relação mostrou-se verdadeira nas plantas do MG e da MP, considerando-se sítio infértil aquele com alta concentração de As no solo (Morro do Galo) e sítio fértil aquele isento de contaminação pelo metaloide (Mata do Paraíso), apesar da fertilidade dos solos do Morro do Galo e da Mata do Paraíso não terem sido analisadas. No entanto, trabalhos mostram que os solos do Quadrilátero Ferrífero, região onde se encontra o Morro do Galo, possuem baixa

fertilidade natural (Deschamps & Matschullat, 2007), enquanto ambientes de mata, como a Mata do Paraíso, geralmente apresentam solos mais férteis.

A ausência de resposta das plantas do MG parece estar relacionada à sua menor exigência nutricional, decorrente da aclimação à baixa disponibilidade de nutrientes, característica dos solos do Quadrilátero Ferrífero, e aos altos teores de As no solo do Morro do Galo (teor médio  $10.975 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) (Deschamps & Matschullat, 2007). Assim, a reserva de nutrientes na rizosfera não é exaurida e a taxa de crescimento é mantida por períodos prolongados (Chapin, 1980). Resultados semelhantes foram observados por Specht & Groves (1966), quando foi fornecida uma dose de fósforo inicial e se comparou as respostas de plantas australianas e espécies introduzidas com maior requerimento de fósforo. As espécies introduzidas cresceram rapidamente no início do experimento e mostraram senescência antes do final da experiência; as espécies nativas continuaram a crescer ao longo do experimento e produziram tanto quanto ou mais do que as espécies introduzidas (Specht & Groves, 1966), demonstrando que a taxa de absorção de nutrientes é geneticamente determinada e pode variar entre espécies e ecótipos.

As eficiências nutricionais e a concentração de minerais nas plantas variam em função da espécie e da constituição genética da planta (Tomaz et al., 2003; Rozane et al., 2007; Broadley & White, 2012), além do estágio de desenvolvimento da mesma. Neste estudo, observou-se que apesar das plantas da MP acumularem mais nutrientes e biomassa do que as plantas do MG quando cultivadas em solução de Hoagland, a eficiência nutricional de ambas é semelhante, considerando-se como eficiência nutricional a junção das eficiências de absorção, uso e translocação dos nutrientes. Sabe-se que metais pesados podem interferir no metabolismo vegetal, afetando a absorção de elementos essenciais (Cao et al., 2004; Tu & Ma, 2005), como relatado para o As em espécies como *Pisum sativum*, *Lemna gibba*, *Salvinia minima* e *Baccharis dracunculifolia* (Päivöke & Simola, 2001; Leão, 2010, Gilberti, 2012). Sendo assim, sugere-se avaliar a possível relação entre as diferenças na absorção de nutrientes e a tolerância diferencial ao As nas duas populações de *B. verticillata* por meio do estudo do efeito deste metaloide na nutrição mineral destas plantas.

A formulação proposta por Clark é a mais indicada para o estudo sobre a tolerância de *B. verticillata* ao As devido às respostas semelhantes das plantas das duas populações em todos os parâmetros estudados e à menor concentração de fósforo na solução nutritiva, o que reduz a competição com o arsênio pelos sítios de absorção.

## 5. CONCLUSÕES

1. As soluções nutritivas propostas por Hoagland & Arnon e por Clark mostraram-se adequadas para o cultivo de plantas de *Borreria verticillata*, como foi evidenciado pela ausência de sintomas de deficiência e/ou toxidez de nutrientes.
2. As plantas provenientes do Morro do Galo e da Mata do Paraíso apresentaram respostas mais homogêneas quando cultivadas na solução de Clark. Na solução de Hoagland, as plantas da Mata do Paraíso acumularam mais nutrientes e biomassa, mas a eficiência nutricional foi semelhante à das plantas do Morro do Galo.
3. A solução nutritiva mais indicada para o cultivo de plantas de *B. verticillata* com a finalidade de investigar sua tolerância ao arsênio é a solução de Clark, devido às respostas semelhantes das populações e também à menor concentração de fósforo na formulação, o que reduz a competição deste elemento com o As pelos sítios de absorção.

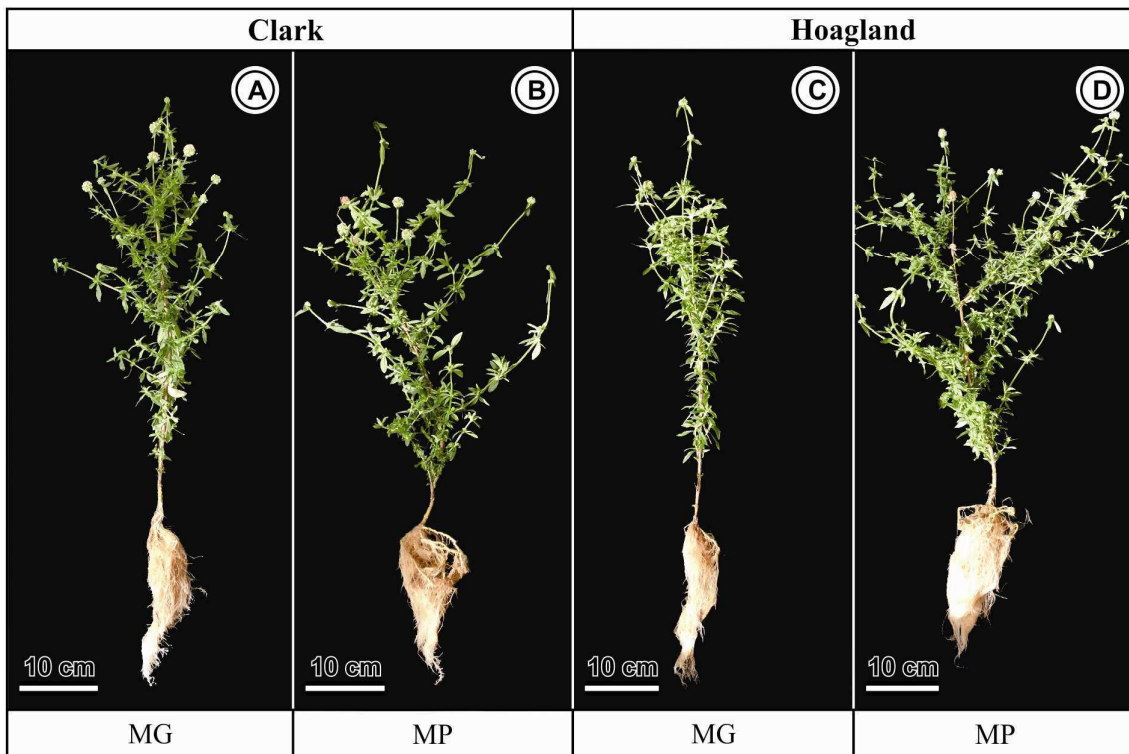
## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Broadley, M., White, P.J. 2012. Plant minerals. In Salter, A., Wiseman, H., Tucker, G. **Phytonutrients**. 6 ed. Oxford, Blackwell Publishing Ltda, p. 254-277.
- Camargo, C.E.O., Oliveira, O.T. 1981. Efeito de diferentes concentrações de sais em solução nutritiva na tolerância de cultivares de trigo à toxicidade de alumínio. **Bragantia** 40(8): 93-101.
- Camargo, C.E.O. 1984. Tolerância de cultivares de arroz a dois níveis de alumínio em soluções nutritivas contendo diferentes concentrações de sais. **Bragantia** 43(2): 381-388.
- Camargo, C.E.O. 1985. Efeitos de níveis de cálcio combinados com diferentes concentrações de sais na tolerância de trigo à toxicidade de alumínio, em solução nutritiva. **Bragantia** 44(2): 659-668.
- Campos, N.V. 2011. **Respostas morfofisiológicas em plantas de *Borreria verticillata* (Rubiaceae) expostas a diferentes doses de arsênio e fósforo**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 48p.
- Cao, X., Ma, L.Q., Tu, C. 2004. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). **Environ. Pollut.** 128: 317-325.
- Chapin, F.S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 11: 233-260.
- Clark, R.B. 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric. Food Chem.** 23: 458-460.

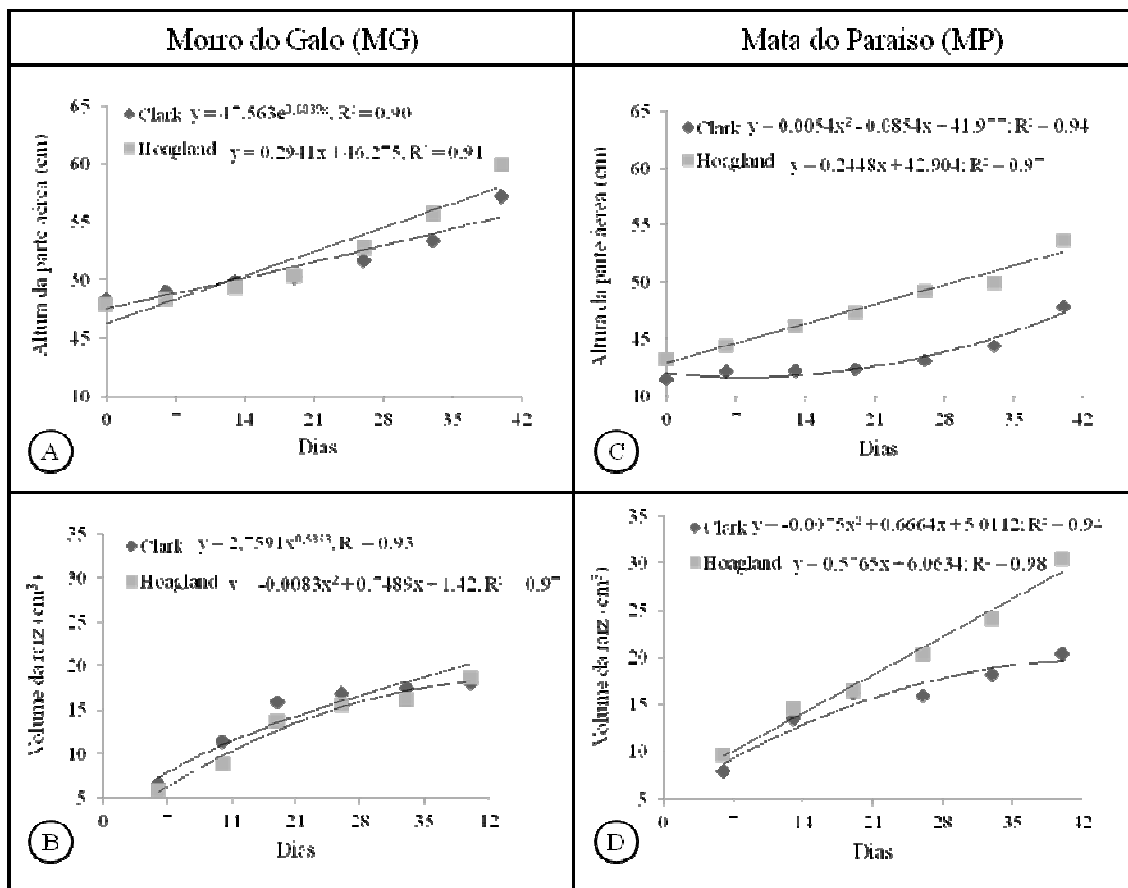
- Deschamps, E., Matsullat, J. 2007. **Arsênio antropogênico e natural. Um estudo em regiões do quadrilátero ferrífero.** Fundação Estadual do meio ambiente. Belo Horizonte. 330p.
- El-Beltagi, H.S., Mohamed, A.A. Changes in non protein thiols, some antioxidant enzymes activity and ultrastructural alteration in radish plant (*Raphanus sativus* L.) grown under lead toxicity. **Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.** 38(3): 76-85.
- Ferreira, D.F. 2000. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0.** In 45 Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, p.255-258.
- Franco, C.F., Prado, R.M. 2006. Uso de soluções nutritivas no desenvolvimento e no estado nutricional de mudas de goiabeira: macronutrientes. **Acta Sci. Agron.** 28: 199-205.
- Furlani, P.R., Clark, R.B. Screening sorghum for aluminum tolerance in nutrient solutions. 1981. **Agron. J.** 73(4): 587-594.
- Gilberti, L.H. 2012. **Potencial para o uso de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) na fitorremediação de áreas contaminadas por arsênio.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 68p.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil.** Berkeley, CA: California Agricultural Experiment Station. 32p.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Štork, F., Bačkor, M. 2009. Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. **Plant Soil** 320: 231-242.
- Kumaresan, M., Riyazuddin, P. 2001. Overview of speciation chemistry of arsenic. **Curr. Sci.** 80: 837-846.
- Leão, G.A. 2010. **Arsênio em plantas aquáticas: absorção, toxicidade, nutrição e metabolismo da glutatona.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 46p.
- Li, B., McKeand, S.E., Allen, H.L. 1991. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Sci.** 37: 613-626.
- Liu, X., Zhang, S., Shan, X., Zhu, Y.G. 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination seedling growth and amylolytic activity of wheat. **Chemosphere** 61: 293-301.
- Manhas Verbi Pereria, F., Pereira-Filho, E. F., Bueno, M.I.M.S. 2006. Development of a methodology for calcium, iron, potassium, magnesium, manganese, and zinc quantification in teas using X-ray spectroscopy and multivariate calibration. **J. Agric. Food Chem.** 54: 5723-5730.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. 1992. Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system, a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. **J. Exp. Bot.** 43: 519-524.
- Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytol.** 154: 29-43.
- Päivöke, A.E.A., Simola, L.K. 2001. Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** 49: 111-121

- Prieto Martinez, H.E., Clemente, J.M. 2011. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa**. Viçosa, MG, Editora UFV. 76p.
- Rozane, D.E., Prado, R.M., Franco, C.F., Natale, W. 2007. Eficiência de absorção, transporte e utilização de macronutrientes por porta-enxertos de caramboleira, cultivados em soluções nutritivas. **Ciênc. Agrotec.** 31(4): 1020-1026.
- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M. 1981. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient efficiency in plants. **J. Plant Nutr.** 4: 289-302.
- Silva, K.L.F. 2008. **Avaliação de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 97p.
- Specht, R.L., Groves, R.H. 1966. A comparison of the phosphorus nutrition of Australian heath plants and introduced economic plants. **Aust. J. Bot.** 14: 201-221.
- Swiader, J.M., Chyan, Y., Freiji, F.G. 1994. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **J. Plant Nutr.** 17: 1687-1699.
- Smith, S.E., Christophersen, H.M., Pope, S., Smith, F.A. 2010. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. **Plant Soil** 327: 1-21.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2010. **Plant Physiology**. Sunderland, MA, Sinauer Associates. 623p.
- Tomaz, M.A., Silva, S.R., Sakiyama, N.S., Martinez, H.E.P. 2003. Eficiência de absorção, translocação e uso de cálcio, magnésio e enxofre por mudas enxertadas de *Coffea arabica*. **R. Bras. Ci. Solo** 27: 885-892.
- Tu, C., Ma, L.Q. 2005. Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Environ. Pollut.** 135: 333-340.
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Zhang, W.J., Li, W., Lin, Z.P. 2009. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere** 75: 1468-1476.

## ANEXOS



**Figura 1.** Aspecto geral de plantas de *Borreria verticillata* provenientes do Morro do Galo (MG, sítio contaminado com As) e da Mata do Paraíso (MP, local isento de contaminação com As) cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e de Clark por 40 dias.



**Figura 2.** Parâmetros de crescimento de plantas de *Borreria verticillata* provenientes das populações do Morro do Galo (sítio contaminado com As) e da Mata do Paraíso (sítio não contaminado com As) cultivadas nas soluções nutritivas de Hoagland e de Clark, por 40 dias.

**Tabela 1.** Crescimento e acúmulo de biomassa em plantas de *Borreria verticillata*, populações provenientes do Morro do Galo (MG, sítio contaminado com As) e da Mata do Paraíso (MP, sítio não contaminado com As), cultivadas nas soluções nutritivas de Hoagland e de Clark, durante 40 dias.

População	Solução	APA (cm)	VR (cm <sup>3</sup> )	-----(g)-----			
				MFPA	MFR	MSPA	MSR
MG	Clark	57,20 aA	18,04 aA	24,22 aA	13,14 aA	6,12 aA	1,38 aA
	Hoagland	61,20 aA	18,56 bA	20,73 bA	12,96 bA	5,37 bA	0,92 bA
MP	Clark	47,82 bB	20,38 aB	21,54 aB	12,41 aB	5,36 aB	1,40 aA
	Hoagland	53,68 bA	30,42 aA	32,83 aA	21,53 aA	7,40 aA	1,91 aA

APA – altura da parte aérea, VR – volume da raiz, MFPA – massa fresca da parte aérea, MFR – massa fresca da raiz, MSPA – massa seca da parte aérea, MSR – massa seca da raiz. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação das populações dentro de cada solução nutritiva e letras maiúsculas comparam as soluções nutritivas dentro de cada população.

**Tabela 2.** Teor de macronutrientes na parte aérea, nas raízes e total em plantas de *Borreria verticillata*, populações provenientes do Morro do Galo (MG, sítio contaminado com As) e da Mata do Paraíso (MP, sítio não contaminado com As), cultivadas nas soluções nutritivas de Hoagland e de Clark, durante 40 dias.

População	Solução	Parte aérea (mg KgMS <sup>-1</sup> )				
		P	Ca	K	Mg	S
MG	Clark	2131,86 aA	9993,23 aA	14932,08 aA	2132,14 aA	2431,28 aA
	Hoagland	2955,78 aA	8908,53 bA	14528,05 aA	2395,80 aA	2836,41 aA
MP	Clark	1752,40 aB	9215,57 aB	13176,54 aB	1530,95 aB	2147,51 aA
	Hoagland	3657,77 aA	12453,98 aA	16220,31 aA	2600,39 aA	2498,26 aA

População	Solução	Raiz (mg KgMS <sup>-1</sup> )				
		P	Ca	K	Mg	S
MG	Clark	2658,75 aA	12236,69 aA	22547,73 aA	1142,67 aA	1798,77 aA
	Hoagland	8517,35 aA	11405,03 aA	24225,49 aA	1396,64 bA	1901,55 aA
MP	Clark	2576,56 aB	7436,27 aA	20145,76 aB	1033,98 aB	1892,54 aA
	Hoagland	10762,00 aA	11363,65 aA	29313,31 aA	2342,47 aA	2292,15 aA

População	Solução	Total (mg KgMS <sup>-1</sup> )				
		P	Ca	K	Mg	S
MG	Clark	4790,61 aA	22229,92 aA	37479,80 aA	3274,82 aA	4230,05 aA
	Hoagland	11473,14 aA	20313,56 aA	38753,54 aA	3792,44 aA	4737,96 aA
MP	Clark	4328,97 aB	16651,84 bB	33322,29 aB	2564,93 aB	4040,05 aB
	Hoagland	14419,77 aA	23817,63 aA	45533,62 aA	4942,87 aA	4790,41 aA

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam a comparação das populações dentro de cada solução nutritiva e letras maiúsculas comparam as soluções nutritivas dentro de cada população.

**Tabela 3.** Eficiência de absorção, de uso e de translocação de P, Ca, K, Mg e S em plantas de *Borreria verticillata*, populações do Morro do Galo (MG, sítio contaminado com As) e da Mata do Paraíso (MP, sítio não contaminado com As), cultivadas nas soluções nutritivas de Hoagland e de Clark, durante 40 dias.

População	Solução	Eficiência de absorção (mg g <sup>-1</sup> )				
		P	Ca	K	Mg	S
MG	Clark	25,77 aB	122,64 aA	206,61 aA	17,97 aA	22,99 aA
	Hoagland	108,02 aA	187,29 aA	348,97 aA	34,99 aA	44,99 aA
MP	Clark	20,38 aA	80,36 aA	160,36 aA	12,42 aA	19,40 aA
	Hoagland	71,35 aA	116,88 aA	225,40 aA	24,18 aA	23,54 aA
População	Solução	Eficiência de uso (g <sup>2</sup> mg <sup>-1</sup> )				
		P	Ca	K	Mg	S
MG	Clark	1,64 aA	0,35 aA	0,21 aA	2,32 aA	1,79 aA
	Hoagland	0,55 aB	0,33 aA	0,16 aA	1,71 aA	1,33 bA
MP	Clark	1,65 aA	0,41 aA	0,20 aA	2,62 aA	1,69 aA
	Hoagland	0,74 aB	0,40 aA	0,20 aA	1,94 aA	1,97 aA
População	Solução	Eficiência de translocação (%)				
		P	Ca	K	Mg	S
MG	Clark	36,38 aA	37,36 aA	32,51 aA	52,79 aA	46,55 aA
	Hoagland	22,53 aB	38,83 aA	32,68 aA	53,85 aA	51,09 aA
MP	Clark	31,96 aA	43,56 aA	31,07 aA	47,13 aA	42,05 aA
	Hoagland	21,85 aA	42,51 aA	28,58 aA	41,99 bA	41,85 aA

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam as populações dentro da solução nutritiva e letras maiúsculas comparam a solução nutritiva dentro de cada população.

## CAPÍTULO 2

### **Respostas morfofisiológicas ao arsênio em plantas de *Borreria verticillata* provenientes de sítio contaminado e não contaminado com As**

**RESUMO:** O arsênio (As) é um elemento tóxico aos seres vivos, no entanto, plantas que crescem em ambientes contaminados podem exibir estratégias de tolerância. A restrição da absorção de As e a detoxificação intracelular são os principais mecanismos de tolerância observados em plantas. Os objetivos deste trabalho foram: comparar as respostas morfofisiológicas ao As em plantas de *Borreria verticillata* provenientes de sítio contaminado (Morro do Galo - MG) e não contaminado com As (Mata do Paraíso - MP) com o intuito de elucidar os mecanismos responsáveis pela tolerância diferencial nestas duas populações; e fornecer subsídios para avaliar o potencial da espécie para a fitorremediação de arsênio. Plantas de *B. verticillata* foram cultivadas por 4 dias em solução nutritiva de Clark contendo 0,0 e 66,0  $\mu\text{M}$  de As. Ao final do experimento, as plantas apresentaram sintomas de toxidez na parte aérea e nas raízes e o crescimento das plantas da MP foi negativamente afetado pelo As. O maior acúmulo de As ocorreu nas raízes, o que explica a severidade dos danos na morfologia e na estrutura interna desses órgãos, principalmente nas plantas da MP. As plantas do MG retiveram mais P nas raízes quando expostas ao As, mantendo a taxa P:As alta, o que conferiu maior tolerância às mesmas. Além disso, apresentaram menor translocação de As para a parte aérea e maior acúmulo de Ca nas raízes, o que pode ter levado ao aumento da quelatção do metaloide na estrutura dos idioblastos cristalíferos e à manutenção da integridade das barreiras apoplásticas. Houve incremento também no número de idioblastos fenólicos nas raízes, nas plantas do MG e da MP. Adicionalmente ao menor fator de translocação de As, as plantas do MG exibiram aumento na atividade da dismutase do superóxido (SOD) e na síntese de tióis nas folhas o que está relacionado com sua maior resistência. As plantas da MP apresentaram redução na atividade da SOD e aumento na atividade da polifenoloxidase nas folhas em resposta ao As. Ficou demonstrado que as populações apresentam estratégias distintas de detoxificação de As e que as plantas provenientes do Morro do Galo são mais resistentes e, portanto, mais adequadas para a revegetação de áreas contaminadas com esse elemento.

**Palavras-chave:** acúmulo de nutrientes, mecanismos de detoxificação, compostos antioxidantes.

## CHAPTER 2

### **Morphophysiological responses to arsenic in plants of *Borreria verticillata* from As-contaminated and not contaminated sites**

**ABSTRACT:** Arsenic is an element toxic to living beings, however, plants that grow on contaminated environments can exhibit tolerance strategies. The restriction of As absorption and intracellular detoxification are the main tolerance mechanisms observed in plants. The objectives of this study were: to compare morphophysiological responses to arsenic in plants of *Borreria verticillata* from As-contaminated (Morro do Galo - MG) and not contaminated sites (Mata do Paraíso - MP), in order to elucidate the mechanisms responsible for differential tolerance on these two populations; and to provide subsidies for the evaluation of the arsenic phytoremediation potential of the species. Plants of *Borreria verticillata* were cultivated for 4 days in Clark's nutrient solution containing 0.0 and 66.0  $\mu\text{M}$  of As. At the end of the experiment, plants showed symptoms of toxicity on shoots and roots, and growth on plants from MP was negatively affected by As. The higher As accumulation took place on roots, which explains the severity of damage on morphology and internal structure of these organs, mainly on plants from MP. Plants from MG retained more P on roots when exposed to As, maintaining P:As rate high, which gave them higher tolerance. Furthermore, they presented lower As translocation to shoots due to higher Ca accumulation on roots, which could have led to increase in the chelation of the metalloid on the structure of the crystalliferous idioblasts, and to maintenance of the integrity of apoplastic barriers. There was increment also on the number of phenolic idioblasts on roots, on plants from MG and MP. Additionally to the lower As translocation factor, plants from MG exhibited increase on the activity of superoxide dismutase (SOD) and on synthesis of thiols on leaves, which rendered them higher resistance. Plants from MP presented reduction on the activity of SOD and increase on the activity of polyphenol oxidase on leaves in response to As. It was demonstrated that the populations have distinct As detoxification strategies and that plants from Morro do Galo are more resistant and thus more suitable for the revegetation of areas contaminated with this element.

**Keywords:** nutrient accumulation, detoxification mechanisms, antioxidant compounds.

## 1. INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um elemento não essencial e tóxico às plantas, que pode ocorrer no ambiente nas formas orgânica e inorgânica (Kumaresan & Riyazuddin, 2001). Sua fitotoxicidade depende, dentre outros fatores, da forma química e da concentração (Patra et al., 2004). As formas inorgânicas, arsenito ( $\text{As}^{+3}$ ) e arsenato ( $\text{As}^{+5}$ ), são cerca de 100 vezes mais tóxicas que as formas orgânicas (metiladas) (Barra et al., 2000).

O  $\text{As}^{+3}$  é absorvido via aquaporinas (Merharg & Jardine, 2003; Ali et al., 2009), e é mais citotóxico que o  $\text{As}^{+5}$  por se ligar a grupos sulfídricos de enzimas e proteínas, resultando em disfunção e morte celular (Hughes, 2002; Rosen, 2002; Requejo & Tena, 2005).

O  $\text{As}^{+5}$  é um análogo não funcional do fosfato. Dessa forma, é absorvido via transportadores de fosfato (Merharg & Macnair, 1992; Merharg & Hartley-Whitaker, 2002). Sua toxidez está relacionada à sua interferência na absorção de fosfato e nas reações de fosforilação, provocando alterações no fluxo energético celular (Hughes, 2002; Dhankher et al., 2011). Após ser absorvido, é reduzido a  $\text{As}^{+3}$  pela ação da enzima arsenato redutase, um passo fundamental para a complexação do As com peptídeos ricos em tióis (Bleeker et al., 2006).

Os efeitos do As nas plantas podem então ser diretos, decorrentes da atuação do  $\text{As}^{+5}$  como análogo não funcional do fosfato ou da reação do  $\text{As}^{+3}$  com os grupos  $-\text{SH}$  das enzimas; e indiretos, devido ao comprometimento do funcionamento das raízes e redução na absorção e translocação de nutrientes e água para a parte aérea (Carbonell-Barrachina et al., 1997; Silva, 2008).

Apesar de ser tóxico, plantas de diferentes espécies são capazes de sobreviver em ambientes com altos teores de As (Hartley-Whitaker et al., 2001; Ma et al., 2001; Rascio & Navari-Izzo, 2011). A tolerância a este elemento varia de acordo com a concentração, o tempo de exposição e a espécie. Os mecanismos de tolerância ao As envolvem tanto respostas constitutivas quanto adaptativas (Meharg, 1994). De acordo com Inouhe (2005), os dois principais mecanismos observados em plantas e microrganismos são: a restrição da absorção de As, um mecanismo que possibilita a redução do influxo de arsenato a níveis que as plantas são capazes de detoxificar (Meharg & Macnair, 1990; Meharg and Macnair 1992; Meharg, 1994; Fujiwara et al., 2000; Bleeker et al. 2003); e a detoxificação intracelular (Edmonds & Francesconi, 1981; Kaise et al., 1988).

Os mecanismos de detoxificação de As podem ser divididos em primários e secundários (Tripathi et al., 2012a). A detoxificação primária envolve estratégias que operam mantendo a concentração celular de As livre em nível mínimo por meio de sua complexação com peptídeos ricos em tióis, principalmente glutatona e fitoquelatinas, e armazenamento do complexo no vacúolo (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Hall, 2002; Logoteta et al., 2009; Zhao et al. 2010). Contudo, a exposição das plantas ao As promove o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que danificam macromoléculas, afetam a permeabilidade da membrana e inibem o crescimento da planta (Hartley-Whitaker et al., 2001; Singh & Ma, 2006; Talukdar, 2012). Sendo assim, o segundo tipo de detoxificação consiste na prevenção e/ou reparo destes danos pela ação de enzimas antioxidantes (p. ex. dismutase do superóxido, catalase e peroxidase) e agentes não-enzimáticos (p. ex. carotenoides, ascorbato e compostos fenólicos) (Meharg, 1994; Sinha et al., 2010; Garg & Singla, 2011).

Os compostos fenólicos são importantes moléculas antioxidantes que atuam na neutralização de radicais livres e na quelação de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Shahidi et al., 1992; Michalak, 2006). Outro possível mecanismo de sequestro de metais pesados é a sua incorporação na estrutura de cristais, como as drusas (Choi et al., 2001; Silva et al., 2001; Mazen et al., 2004).

Populações distintas de uma mesma espécie podem apresentar grau variado de tolerância ao As, de acordo com as pressões seletivas presentes nos ambientes onde elas se desenvolvem (Patra et al., 2004; Campos, 2011). Segundo Campos (2011), plantas de *Borreria verticillata* provenientes de local contaminado com arsênio, como o Morro do Galo situado no município de Nova Lima/MG, apresentam maior tolerância ao metaloide do que plantas oriundas de sítio isento de contaminação com tal poluente, como a Mata do Paraíso situada em Viçosa/MG.

Visando fornecer subsídios para avaliar o potencial de *B. verticillata* para a fitorremediação de arsênio, os objetivos deste trabalho foram: avaliar o crescimento, o estado nutricional, a atividade de enzimas do sistema antioxidativo, o conteúdo de compostos tiolados e as alterações estruturais em plantas provenientes do Morro do Galo (MG) e da Mata do Paraíso (MP) expostas ao arsênio; e contribuir para a elucidação dos mecanismos responsáveis pela tolerância diferencial nestas duas populações.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção, aclimação e exposição das plantas aos tratamentos**

As plantas matrizes de *Borreria verticillata* (L.) G.F.W. Mayer (Rubiaceae) foram coletadas na Mata do Paraíso e no Morro do Galo, conforme descrito no capítulo anterior. As mudas foram obtidas por meio de estaquia e cultivadas em areia lavada com irrigação diária e adubação semanal com solução nutritiva de Hoagland à ½ força e pH 5,5 (Hoagland e Arnon, 1950). Após atingirem cerca de 40 cm de altura, as mudas foram retiradas dos vasos e suas raízes foram lavadas em água corrente, para retirada da areia, e em hipoclorito de sódio 10% para desinfestação. Então foram transferidas para sistema hidropônico contendo solução nutritiva de Clark à ½ força e pH 5,8 (Clark, 1975) sob aeração constante, em caixas de isopor com capacidade para 3L (protegidas com plástico preto para evitar a entrada de luz).

Os tratamentos foram iniciados após três semanas de aclimação das plantas ao cultivo hidropônico. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com duas populações (MG e MP), dois tratamentos (0,0 e 66,0 µM de As, na forma de Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e quatro repetições e uma planta por repetição (Figura 1A). As concentrações de As utilizadas foram baseadas nos trabalhos desenvolvidos por Silva (2008) e Campos (2011) com a mesma espécie. O período experimental foi de quatro dias, sendo que o pH da solução nutritiva foi ajustado diariamente para 5,8.

### **2.2. Análise do crescimento**

Os parâmetros de crescimento foram mensurados no primeiro e no último dia do período experimental. A altura da parte aérea (APA) foi medida com auxílio de régua, sempre no ramo com maior comprimento. O volume das raízes (VR) foi determinado com o auxílio de proveta e de pipeta graduada. Para tal, o volume da proveta foi completado com 1 L de água desionizada e as raízes foram mergulhadas. O volume de água que ultrapassou a marcação de 1 L foi retirado e medido com pipeta graduada, correspondendo ao volume da raiz. A massa fresca total (MFT) das plantas foi determinada com auxílio de balança de precisão.

Ao final do período experimental, foi calculado o crescimento real das plantas durante o período de tratamento por meio da diferença entre os valores final e inicial da APA, do VR e da MFT.

### **2.3. Determinação dos teores de arsênio (As) e de macronutrientes nos tecidos e fatores de bioacumulação (FBA) de As e translocação (FT) de As e macronutrientes**

Ao final do período experimental, as plantas foram separadas em parte aérea e raízes, secas em estufa de ventilação forçada à 70°C até peso constante e moídas em moinho do tipo Wiley.

Para a determinação do acúmulo de As, P, Ca, K, Mg e S, amostras de cerca de 0,2 g de parte aérea e 0,1 g de raízes foram pré-digeridas em tubos contendo 2 mL de solução nitroperclórica (3:1) à temperatura ambiente, por um período de 14 h. Posteriormente, os tubos foram transferidos para bloco digestor e a temperatura foi aumentada gradativamente até atingir 180°C, permanecendo até a completa digestão da matéria orgânica (Tedesco et al., 1995). Após o resfriamento, o conteúdo dos tubos foi completado para 10 ml com água desionizada.

A determinação das concentrações de As e de macronutrientes foi feita em espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES modelo Optima 7300 DV PerkinElmer, Inc. Shelton, CT, USA), e estas foram expressas em mg KgMS<sup>-1</sup>.

O FBA (I) de As e os FT (II) de As e dos macronutrientes foram determinados com base nos teores desses elementos nos tecidos (Tu et al., 2002; Fayiga & Ma, 2005; Huang et al., 2006).

$$\text{FBA} = \frac{\text{concentração de As na planta}}{\text{concentração de As na solução nutritiva}} \quad (\text{I})$$

$$\text{FT} = \frac{\text{concentração do elemento na parte aérea}}{\text{concentração do elemento na raiz}} \quad (\text{II})$$

### **2.4. Análise visual e microscópica**

A evolução dos sintomas visuais causados pela exposição ao As na parte aérea e nas raízes foi observada diariamente e, ao final do período experimental, essas alterações foram documentadas com auxílio de câmera digital.

Para as análises anatômicas, amostras da zona de ramificação das raízes e da lâmina de folhas do 3º nó a partir do ápice foram coletadas e fixadas em Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas, em série etílica, e incluídas em metacrilato

(Historesin, Leica Instruments). Secções transversais de 7  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas com auxílio de micrótomo rotativo de avanço manual (Spencer 820), coradas em azul de Toluidina 0,05% em tampão fosfato 0,1M e pH=6,8 por 10 minutos (adaptado de O'Brien et al., 1965), e montadas entre lâmina e lamínula com Permout (Fisher Scientific Permout Mounting Medium). As observações e a documentação fotográfica foram feitas em fotomicroscópio (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmara digital acoplada (modelo Zeiss AxioCam HR3, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha).

A contagem dos idioblastos fenólicos e cristalíferos foi feita em secções transversais de folhas e raízes. Para cada repetição foram feitos 3 blocos e a partir destes 9 lâminas. Em cada lâmina foram fotografadas 3 secções, totalizando 27 campos por repetição e 108 contagens por tratamento por população.

## **2.5. Determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido, catalase, peroxidase e polifenoloxidase**

Amostras de 0,1 g de folhas e raízes congeladas à  $-86^{\circ}\text{C}$  foram maceradas em almofariz à  $4^{\circ}\text{C}$  contendo 2 mL de tampão de extração (tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8, EDTA 0,1 mM, PMSF 0,1 mM e PVPP 1%) (Peixoto et al., 1999). Em seguida, o material foi centrifugado a 12000 xg por 15 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD EC 1.15.1.1), catalase (CAT EC 1.11.1.6), peroxidase (POX EC 1.11.1.7) e polifenoloxidase (PPO EC 1.10.3.1).

Para a determinação da atividade da SOD foi utilizado 4,95 mL de meio de reação (tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 7,8, metionina 13 mM, EDTA 0,1 mM, riboflavina 2,0  $\mu\text{M}$  e NBT 75,0  $\mu\text{M}$ ) e 0,05 mL do extrato enzimático, totalizando 5 mL (Giannopolitis & Ries, 1977). A reação foi realizada em câmara com luz fluorescente de 15 watts por 5 minutos. A produção fotoquímica de azul de formazana foi determinada em espectrofotômetro (modelo Cary 100, Varian, Maryland, USA) a 560 nm. O branco consistiu de um meio de reação idêntico ao anterior mantido no escuro. Considerou-se que 1 U de SOD corresponde à quantidade da enzima capaz de inibir a redução do NBT em 50%. O resultado foi expresso em  $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Havir & McHale (1987). Para o preparo da reação foram utilizados 2,8 mL de tampão de reação composto por tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0 e  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5  $\mu\text{M}$  e 0,2 mL do extrato

enzimático. O decréscimo na absorvância a 240 nm foi medido em espectrofotômetro (modelo Cary 100, Varian, Maryland, USA) durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson et al., 1995) e o resultado foi expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

A atividade da POX foi determinada utilizando-se 5 mL de meio de reação contendo 4,8 mL de tampão de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0, pirogalol 20 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM) e 0,2 mL do extrato enzimático (adaptado de Kar & Mishra, 1976). A queda na absorvância a 420 nm foi mensurada em espectrofotômetro (modelo Cary 100, Varian, Maryland, USA) durante o primeiro minuto de reação a  $25^\circ\text{C}$  e foi acompanhada para o cálculo da atividade enzimática. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o cálculo da atividade da enzima (Chance e Maehley, 1955) e o resultado foi expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

Para a determinação da atividade da PPO foi utilizado 4,8 mL de tampão de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0 e pirogalol 20 mM e 0,2 mL do extrato enzimático (adaptado de Ryan et al., 1982). O decréscimo na absorvância a 420 nm foi medido em espectrofotômetro (modelo Cary 100, Varian, Maryland, USA) durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Chance e Maehley, 1955). O resultado foi expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

A determinação do conteúdo de proteína foi realizada segundo o método proposto por Bradford (1976). A reação foi feita utilizando-se 2  $\mu\text{L}$  do extrato proteico (diluído 20 vezes), 198  $\mu\text{L}$  de água mili-Q e 1000  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford. A curva padrão foi preparada utilizando-se quantidades conhecidas de albumina do soro bovino (BSA) na faixa de 0 a 16  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . A absorvância foi lida a 595 nm em espectrofotômetro leitor de microplaca (modelo Asys UVM 340, Sunnyvale, California, USA).

## **2.6. Determinação do teor de compostos tiolados**

Para a determinação do conteúdo de tióis, 0,1 g de folhas e raízes foi macerado em almofariz à  $4^\circ\text{C}$  contendo 2 mL de meio de extração (tris-HCl 0,1 M pH 8,0; EDTA 1 mM; ácido ascórbico 1% p/v) e o extrato foi centrifugado a 10000 xg por 10 minutos.

O sobrenadante foi utilizado para a quantificação dos tióis solúveis totais, tióis não proteicos e tióis proteicos.

Os tióis totais foram determinados em um meio de reação contendo 0,1 mL do extrato e 0,3 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M e pH 8,2, 0,02 mL do reagente Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)) 0,01 M e 1,58 mL de metanol PA. Após 15 minutos de reação a 37 °C, foi lida a absorvância a 412 nm em espectrofotômetro leitor de microplaca (modelo Asys UVM 340, Summyvale, California, USA). O conteúdo de tióis totais foi calculado utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 13100 M cm<sup>-1</sup>. O resultado foi expresso em nM SH KgMF<sup>-1</sup> (Sedlak & Lindsay, 1968).

O teor de tióis não proteicos foi determinado por meio da adição de alíquotas de 1,0 mL do extrato a 200 µL de TCA 50% (p/v) e 800 µL de água destilada. Após 1 hora de repouso em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos. Então, 400 µL do sobrenadante foram adicionados a 800 µL de tampão fosfato de potássio 0,4 M e pH 8,9 e 100 µL de reagente de Ellman 0,01 M. Após 5 minutos em temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro leitor de microplaca (modelo Asys UVM 340, Summyvale, California, USA). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 13100 M cm<sup>-1</sup>. O resultado foi expresso em nM SH Kg<sup>-1</sup> MF (Sedlak & Lindsay, 1968).

O teor de tióis proteicos foi obtido pela diferença entre o teor de tióis solúveis totais e o teor de tióis não proteicos.

## **2.7. Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos à análise de variância com o auxílio do programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância) (Ferreira, 2000). O teste de significância (teste F) foi realizado a 5% de probabilidade.

## **3. RESULTADOS**

Após 24 horas de tratamento com arsênio, as plantas da MP apresentaram leve murcha foliar nas horas mais quentes do dia e em seguida se recuperavam. Ao término do experimento, as plantas da MP expostas ao As apresentaram severa murcha na parte aérea e necroses nas folhas mais jovens, já nas plantas do MG a murcha foi mais discreta. As raízes das plantas de ambas as populações apresentaram escurecimento

(Figura 1B-F). Os danos foram mais severos no sistema radicular, além da coloração amarronzada também foi observado aspecto gelatinoso, inibição do desenvolvimento de raízes laterais e necrose (Figura 1G-H). Os efeitos fitotóxicos do As foram intensificados de acordo com o tempo de exposição e foram mais drásticos nas plantas da MP.

Danos na morfologia interna das plantas de ambas as populações também foram observados, de forma mais intensa nas plantas da MP. A folha de *B. verticillata* apresenta epiderme unisseriada, estômatos nas duas faces e mesofilo dorsiventral com duas camadas de parênquima paliçádico e duas a três de parênquima esponjoso. Idioblastos fenólicos e cristalíferos com ráfides e drusas são comumente encontrados no parênquima clorofiliano e associados aos feixes vasculares, os quais são colaterais (Figura 2A-D). Na região mediana do mesofilo, entre os parênquimas paliçádico e esponjoso, são observadas células alongadas no plano paralelo à superfície, caracterizando um parênquima paravenal (Silva, 2008; Campos, 2011). Nas plantas expostas ao As pôde-se observar desintegração celular (Figura 2E), retração do protoplasto e desorganização do mesofilo (Figura 2G) e colapso das células epidérmicas e do parênquima adjacente (Figura 2F e H).

O sistema radicular foi mais severamente afetado, principalmente nas plantas da MP. As raízes de *B. verticillata* apresentam estrutura e crescimento secundário típico de eudicotiledôneas, com a formação de um câmbio vascular responsável pela produção dos tecidos vasculares secundários (Figura 3A-B) e de um felogênio que se diferencia mais tardiamente e produz a periderme. Como nas raízes das demais eudicotiledôneas com crescimento secundário, ocorre o destacamento do córtex à medida que ocorre o aumento em diâmetro do órgão (Silva, 2008). Após exposição ao As, as plantas de ambas as populações apresentaram retração do protoplasto, colapso e desintegração das células do córtex (Figura C-D). Nas plantas do MG foi possível observar obliteração de elementos (Figura 3E), enquanto as plantas da MP apresentaram deformação dos elementos de vaso do xilema secundário (Figura 3D) e produção exacerbada de compostos fenólicos na endoderme (Figura 3F).

O As promoveu incremento no número de idioblastos fenólicos nas raízes das plantas de ambas as populações. O número de idioblastos cristalíferos quase triplicou nas raízes das plantas do MG (Figura 3 e Tabela 1).

Os parâmetros de crescimento foram influenciados pela presença do As nas plantas da MP (Tabela 2). A altura da parte aérea apresentou crescimento cerca de

140% menor nas plantas tratadas com As em comparação com as plantas do controle, e a biomassa fresca total sofreu redução entre o início e o final do experimento nas plantas expostas ao As.

O conteúdo de As foi maior nas plantas tratadas com As e não diferiu entre as plantas do MG e da MP (Tabela 3). O fator de bioacumulação de As foi menor que um e não diferiu entre as populações. O metaloide foi mais acumulado nas raízes do que na parte aérea, sendo que o fator de translocação (FT) das plantas da MP foi maior do que o das plantas do MG, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 4).

O As promoveu alterações nas características nutricionais das plantas do MG apenas. Houve incremento de cerca de 70% e 30% no conteúdo de Ca e S nas raízes, respectivamente. Também foi observada redução significativa no FT de P, Ca e S nas plantas expostas ao metaloide. O acúmulo e o FT dos macronutrientes (P, Ca, K, Mg e S) não foram afetados nas plantas da MP (Tabelas 3 e 5).

O conteúdo de compostos tiolados nas raízes não diferiu entre os tratamentos em ambas as populações. No entanto, o teor de tióis aumentou significativamente nas folhas das plantas do MG tratadas com As (Tabela 6): o teor de tióis totais apresentou incremento de 114,33%, sendo que os tióis proteicos foram os que apresentaram maior aumento (102,67%).

As enzimas catalase e peroxidase não apresentaram mudanças significativas em sua atividade em resposta ao As. A atividade da dismutase do superóxido nas folhas das plantas do MG exibiu aumento de cerca de 130% após 4 dias de tratamento com 66,0  $\mu\text{M}$  de As, quando comparada com o tratamento controle. Já nas plantas da MP, a exposição ao As promoveu redução significativa na atividade desta enzima e aumento de 64,68% na atividade da polifenoloxidase nas folhas. Nas raízes, a atividade destas enzimas não foi afetada pelo As (Tabela 7).

#### **4. DISCUSSÃO**

*Borreria verticillata* não se caracteriza como uma espécie hiperacumuladora de As, uma vez que apresentou fatores de translocação e de bioacumulação de As menores que 1 (um) e acúmulo total de As menor que 1000 mg KgMS<sup>-1</sup>. Plantas que não hiperacumulam As tendem a reduzir a translocação deste metaloide para a parte aérea (Marin et al., 1992), reduzindo também seus efeitos prejudiciais nos tecidos

fotosintetizantes, o que confere maior tolerância às mesmas (Melo et al., 2010; Gomes et al., 2012). Nos estudos realizados por Silva (2008) e Campos (2011), em que o período experimental foi maior e houve renovação periódica da solução nutritiva, observou-se que *B. verticillata* apresentou capacidade de acumular quantidades expressivas de As, chegando à cerca de 700 mg KgMS<sup>-1</sup> nas raízes, caracterizando-se como uma espécie acumuladora de As (Campos, 2011).

A baixa translocação de As nas plantas do MG pode estar relacionada ao maior acúmulo de Ca nas raízes destas plantas. O Ca é essencial na manutenção da integridade da parede celular e das funções da membrana plasmática (Tu & Ma, 2005), o que o torna um elemento importante na manutenção da integridade das barreiras apoplásticas nas raízes. Estas barreiras limitam a passagem de poluentes do córtex em direção aos tecidos vasculares, reduzindo assim sua distribuição pelo corpo da planta e, conseqüentemente, seus efeitos prejudiciais (Enstone et al., 2003; Lux et al., 2004; Marques et al., 2011, Silva et al., 2013).

O incremento no número de idioblastos cristalíferos nas raízes das plantas do MG está em consonância com o aumento no teor de Ca neste órgão e pode ser uma resposta dessas plantas aos altos níveis de As no solo. A formação de cristais tem sido descrita como um mecanismo de quelação de metais pesados (Choi et al., 2001; Mazon et al., 2004). Alguns autores têm constatado a distribuição celular similar do Ca e do As e apontado que o Ca desempenha importante papel no acúmulo e na detoxificação de As, em consequência da precipitação de arseniato e arsenito de cálcio no apoplasto, sob altas concentrações de As (Chen et al., 2003; Li et al., 2006). Assim, sugere-se que a quelação do As em cristais de arseniato de cálcio nas raízes possa reduzir a distribuição para os demais órgãos da planta. A investigação da composição química dos cristais observados nas células do córtex se faz necessária para comprovar esta hipótese.

O aumento na concentração de fenóis em resposta a metais pesados tem sido relatado por diversos autores (Tripathi et al., 1999; Campos 2011; Prado et al., 2012). Os compostos fenólicos são importantes agentes antioxidantes que podem atuar na complexação de As nas raízes e restrição do transporte para a parte aérea (Schmöger et al., 2000; Hartley-Whitaker et al., 2002; Michalak, 2006). O aumento no número de idioblastos fenólicos nas raízes das plantas do MG e da MP também pode estar relacionado à tolerância ao As. A presença de diferentes estratégias de restrição da translocação de As nas plantas do MG foi responsável pelo menor conteúdo deste metaloide na parte aérea e pela maior resistência destas plantas.

O maior FT de As nas plantas da MP, apesar de não ser significativo, promoveu maior translocação do metaloide nos órgãos aéreos, o que causou os danos mais acentuados na morfologia e na estrutura interna desses órgãos quando comparados àqueles observados nas plantas do MG. Adicionalmente ao menor FT de As, as plantas do MG exibiram aumento na síntese de tióis nos tecidos foliares. Os compostos tiolados são importantes antioxidantes que desempenham papel crucial na detoxificação de As em plantas não hiperacumuladoras (Zhao et al., 2010). A glutathione é o principal tiol não proteico, um dos principais compostos antioxidantes solúveis encontrados nas células vegetais (El-Beltagi & Mohamed, 2010) e o substrato para a síntese das fitoquelatinas (Yadav, 2010). A indução da produção destes compostos em resposta a agentes xenobióticos é amplamente relatada e pode variar de acordo com o genótipo das plantas. Tripathi et al. (2012a, b) observaram maior atividade de enzimas relacionadas com a síntese de tióis e maior conteúdo de fitoquelatinas em plantas de arroz de um cultivar tolerante ao As quando comparado a um cultivar sensível.

A tolerância de um tecido ao As pode ser parcialmente explicada pela taxa P:As (Liu et al., 2005), pois quando esta taxa é mantida alta o  $As^{+5}$  é desfavorecido na competição com fosfato pelos sítios de P nas moléculas (Smith et al., 2010). A redução no FT de P nas plantas do MG expostas ao As foi responsável pelo maior acúmulo deste nutriente nas raízes (apesar de não significativo) e aumento de aproximadamente 40% na taxa P:As, o que pode ter colaborado para a sua maior tolerância ao As, evidenciada pela menor severidade dos danos no sistema radicular.

As alterações morfoanatômicas mais acentuadas observadas nas raízes foram promovidas pelo maior acúmulo de As nesse órgão. O escurecimento, a gelatinização e a redução no número e tamanho das raízes laterais observados em plantas de *B. verticillata*, expostas ao As, foram também relatos por Campos (2011). A maior severidade dos sintomas nas plantas da MP sugere sua maior sensibilidade ao As. Conforme relatado por outros autores, o As promove inibição do crescimento e da ramificação radicular (Finnegan & Chen, 2012).

As alterações observadas nas raízes das plantas da MP, além de demonstrarem a maior sensibilidade do genótipo ao metaloide, podem ter ocasionado déficit hídrico indireto. Os severos danos observados na estrutura das raízes provavelmente afetaram a absorção de água, culminando com a forte murcha na parte aérea e a redução na biomassa fresca das plantas (Tabela 2). Silva (2008) também observou murcha em plântulas de *B. verticillata* expostas ao As nas horas mais quentes do dia com posterior

recuperação. O mesmo sintoma foi observado por Campos (2011) em plantas da MP cultivadas em solução nutritiva de Hoagland contendo 132  $\mu\text{M}$  de As. Neste trabalho, o surgimento de murcha nas plantas do MG e da MP, na concentração de 66  $\mu\text{M}$  de As, pode estar indiretamente relacionado à menor concentração de P, na solução de Clark, que promove o aumento na absorção e toxidez do As, uma vez que o fosfato compete com o arsenato pelos sítios de absorção (Merharg & Macnair, 1992; Merharg & Hartley-Whitaker, 2002; Zhao et al., 2010).

Campos (2011) estudou os efeitos do As associado a diferentes doses de P na solução nutritiva de Hoagland e observou que o baixo nível de P (0,5 mM) associado à presença de As ocasionou redução no acúmulo de biomassa, efeitos drásticos na morfoanatomia das raízes e murcha foliar em plantas da MP. A redução no crescimento em plantas expostas ao As é um sintoma comumente relatado por diversos autores (Felipe et al., 2009; Shri et al., 2009; Gomes et al., 2012). O  $\text{As}^{+5}$  é uma análogo não funcional do fosfato, sendo assim é capaz de ocupar os sítios o P nas moléculas, mas não de desenvolver a função desse elemento. Como consequência, há interferência em processos metabólicos como a fosforilação oxidativa, levando à diminuição na síntese de ATP, além de redução na taxa fotossintética e do incremento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando prejuízo no crescimento das plantas (Caille et al., 2005; Tripathi et al., 2007; Gomes et al., 2012).

As enzimas do sistema antioxidativo removem as ROS e combatem o estresse oxidativo causado pelas mesmas (Wang et al., 2009; Finnegan & Chen, 2012). O incremento na atividade da SOD nas folhas das plantas do MG é uma resposta positiva ao estresse causado pelo As, enquanto sua redução nas plantas da MP é mais um indicativo da maior sensibilidade do genótipo ao metaloide. A SOD é uma das principais enzimas que atuam no combate às ROS e sua atividade pode ser aumentada pela exposição a diferentes metais/metaloides como cádmio (Shah et al., 2001), arsênio (Mylona et al., 1998), cromo (Prado et al., 2012) e manganês (Zhao et al., 2012).

O As promoveu aumento na atividade da PPO nas folhas das plantas da MP. Esta enzima atua na oxidação e polimerização de polifenóis, os quais são capazes de quelar metais pesados e combater as ROS (Lavid et al., 2001a). Lavid et al. (2001b), ao estudar as respostas de plantas de *Nymphaea* sp. e *Nymphoides peltata* ao Cd, observaram que, apesar de haver aumento na atividade da PPO, *N. peltata* mostrou-se mais sensível ao poluente, enquanto *Nymphaea* sp., que exibiu maior atividade da POX e a altos teores de polifenóis, se mostrou uma espécie tolerante. Segundo os autores, é

possível que os produtos oxidados formados em *N. peltata* sejam diferentes daqueles formados em *Nymphaea*, uma vez que os fenóis e as enzimas envolvidas são diferentes. Para o melhor entendimento da sensibilidade das plantas da MP ao As, sugere-se estudos posteriores que visem a quantificação e a caracterização dos polifenóis produzidos em resposta ao metaloide e também dos produtos de sua oxidação e polimerização pela PPO.

Os resultados deste trabalho corroboram a tolerância ao arsênio da população de *Borreria verticillata* proveniente do Morro do Galo (sítio contaminado com o metaloide). Entretanto, as plantas da Mata do Paraíso (sítio não contaminado) mostraram-se sensíveis à presença do metaloide. Estudos que identifiquem os mecanismos e os sítios de detoxificação interna de As são imprescindíveis para a compreensão exata dos mecanismos que proporcionam tolerância ao As em populações de *B. verticillata* já adaptadas à presença do poluente no solo.

## 5. CONCLUSÕES

1. O maior acúmulo de arsênio nas raízes foi responsável pela ocorrência de danos mais severos nesse órgão, no entanto, também foram observados sintomas de toxidez na parte aérea das plantas de ambas as populações.
2. Apesar de apresentarem aumento no número de idioblastos fenólicos nas raízes e na atividade da polifenoloxidade nas folhas, as plantas da Mata do Paraíso se mostraram mais sensíveis ao As e exibiram danos mais acentuados em decorrência da exposição ao metaloide.
3. A presença de As na solução nutritiva promoveu alterações nas características nutricionais das plantas do Morro do Galo, como redução da translocação de Ca, P e S nas raízes, o que contribuiu para a maior tolerância destas plantas ao As.
4. As plantas do Morro do Galo apresentaram diversos mecanismos de detoxificação e tolerância ao As, como aumento na produção de idioblastos cristalíferos e fenólicos nas raízes, incremento na atividade da dismutase do superóxido e síntese de compostos tiolados nas folhas. A associação desses mecanismos foi responsável pela maior tolerância ao metaloide.
5. Apesar de demonstrarem sintomas de toxidez, as plantas de *B. verticillata* provenientes do Morro do Galo mostraram-se tolerantes ao As, sugerindo a possibilidade de sua utilização na revegetação de áreas contaminadas com arsênio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, W., Isayenkov, S.V., Zhao, F.J., Maathuis, F.J.M. 2009. Arsenite transport in plants. **Cell. Mol. Life Sci.** 66: 2329–2339.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiol.** 109(4): 1247-1257.
- Barra, C.M., Santelli, R.E., Abrão, J.J., Guardia, M. 2000. Especificação de arsênio, uma revisão. **Quim. Nova** 23: 58-70.7
- Bleeker P.M., Schat H., Vooijs R., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. 2003. Mechanisms of arsenate tolerances in *Cystisus striatus*. **New Phytol.** 157: 33–38.
- Bleeker, P.M., Henk, W.J., Hakvoort, H.W.J., Blik, M., Souer, E., Schat, H. 2006. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. **Plant J.** 45: 917-929.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Caille, N., Zhao, F.J., McGrath, S.P. 2005. Comparison of root absorption, translocation and tolerance of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata* and hyperaccumulator *Pteris tremula*. **New Phytol.** 165: 755-761.
- Campos, N.V. 2011. **Respostas morfofisiológicas em plantas de *Borreria verticillata* (Rubiaceae) expostas a diferentes doses de arsênio e fósforo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 48p.
- Carbonell-Barrachina, A.A., Burló, F., Burgos-Hernández, A., López, E., Mataix, J. 1997. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Sci. Hort.** 71: 167-176.
- Chance, B., Maehley, A.C. Assay of catalases and peroxidase. 1955. **Method. Enzymol.** 2: 764-775.
- Chen, T.B., Huang, Z.C., Huang, Y.Y., Xie, H., Liao, X.Y. 2003. Cellular distribution of arsenic and other elements in hyperaccumulator *Pteris nervosa* and their relations to arsenic accumulation. **Chin. Sci. Bull.** 48: 1586-1591.
- Choi, Y., Harada, E., Wada, M., Tsuboi, H., Morita, Y., Kusano, T., Sano, H. 2001. Detoxification of cadmium in tobacco plants, formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. **Planta** 213: 45-50.
- Clark, R.B. 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric. Food Chem.** 23: 458-460.
- Cobbett C., Meagher R. 2002. Phytoremediation and the *Arabidopsis* proteome. In Somerville, C. (ed). **Arabidopsis**. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 1-22.

- Dhankher, O.P., Pilon-Smits, E.A.H., Meagher, R.B., Doty, S. 2011. Biotechnology approaches for phytoremediation. *In* Altman, A., Hasegawa, P.M. **Plant Biotechnology and Agriculture**. Oxford, Academic Press, p. 309-328.
- Edmonds, J.S., Francesconi K.A. 1981. Arseno-sugars from brown kelp (*Ecklonia radiata*) as intermediates in cycling of arsenic in a marine ecosystem. **Nature** 289: 602-604.
- El-Beltagi, H.S., Mohamed, A.A. 2010. Changes in non protein thiols, some antioxidant enzymes activity and ultrastructural alteration in radish plant (*Raphanus sativus* L.) grown under lead toxicity. **Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj**. 38(3): 76-85.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., Ma, F.S. 2003. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. **J. Plant Growth Regul.** 21(4): 335-351.
- Fayiga, A.O., Ma, L.Q. 2005. Arsenic uptake by two hyperaccumulator ferns from four arsenic contaminated soils. **Water, Air, Soil Pollut.** 168: 71-89.
- Felipe, R.T.A., Leão, G.A., Oliveira, J.A. 2009. Crescimento e teores de arsênio em plântulas de *Leucaena leucocephala* e *Sesbania grandiflora*. **Rev. Ceres** 56(2): 219-224.
- Ferreira, D.F. 2000. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0**. *In* 45 Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, p.255-258.
- Finnegan, P.M., Chen, W. 2012. Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. **Front. Physiol.** 3: 1-14
- Fujiwara, S., Kobayashi, I., Hoshino, S., Kaise, T., Shimogawara, K., Usuda, H., Tsuzuki, M. 2000. Isolation and characterization of arsenate-sensitive and resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Cell Physiol.** 41: 77-83.
- Garg, N., Singla, P. 2011. Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. **Environ. Chem. Lett.** 9: 303-321.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. 1977. Superoxide Dismutases. **Plant Physiol.** 59: 309-314.
- Gomes, M.P., Duarte, D.M., Miranda, P.L.S., Barreto, L.C., Matheus, M.T., Garcia, Q.S. 2012. The effects of arsenic on the growth and nutritional status of *Anadenanthera peregrina*, a Brazilian savanna tree. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** 175: 466-473.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **J. Exp. Bot.** 53(366): 1-11.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A.A. 2001. Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. **Plant Cell Environ.** 24: 713-722.
- Hartley-Whitaker, J., Woods, C., Meharg, A.A. 2002. Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*? **New Phytol.** 155: 219-225.
- Havir, E.A., McHale, N.A. 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol.** 84: 450-455.

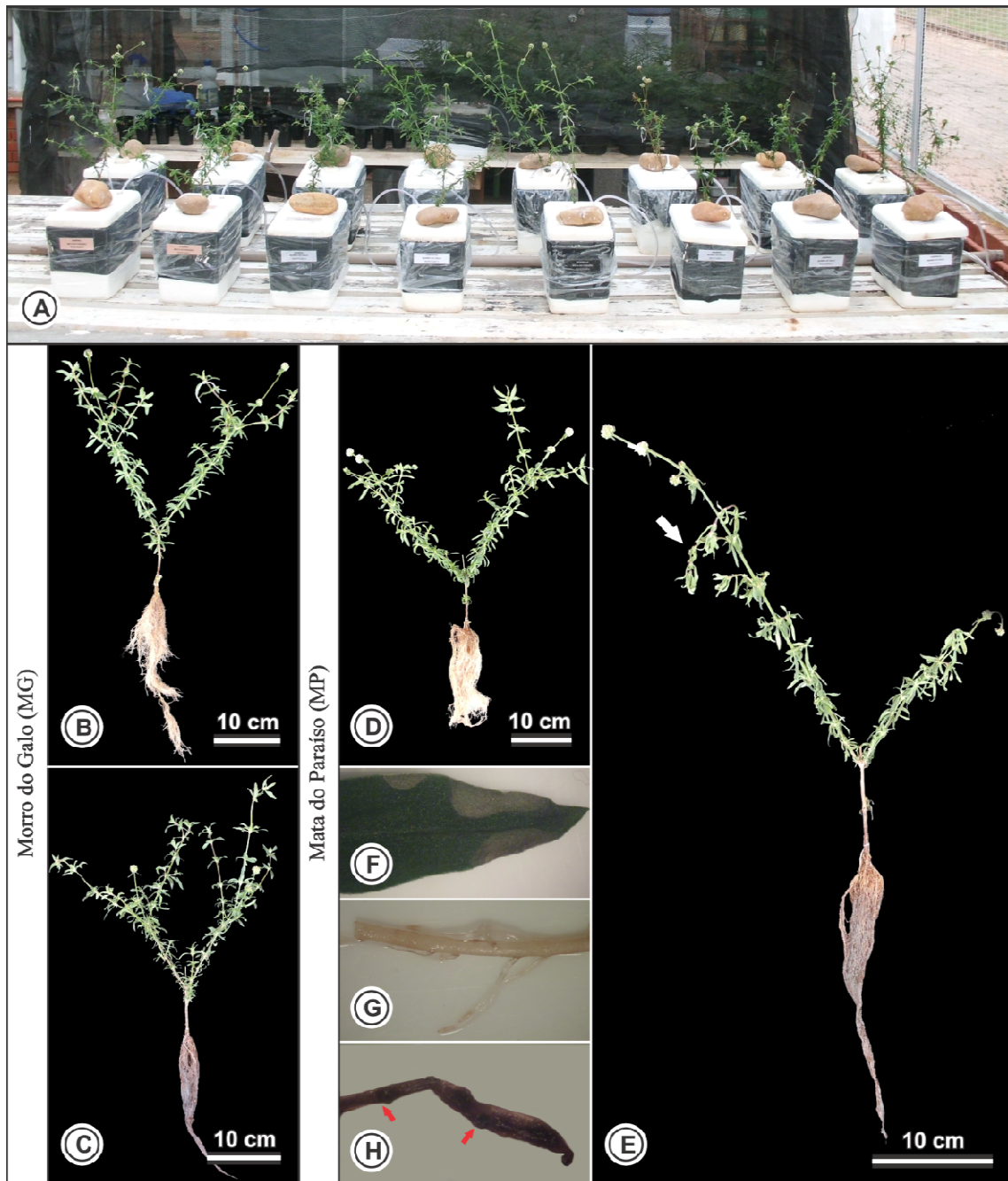
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA, California Agricultural Experiment Station. 32p.
- Huang, R.Q., Gao, S.F., Wang, W.L., Staunton, S., Wang, G. 2006. Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, Southeast China. **Sci. Total Environ.** 368: 531-541.
- Hughes, M.F. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. **Toxicol. Lett.** 133: 1-16.
- Inouhe, M. 2005. Phytochelatins. **Braz. J. Plant Physiol.** 17: 65-78.
- Kaise, T., Hanaoka, K., Tagawa, S., Hirayama, T., Fukui, S. 1988. Distribution of inorganic arsenic and methylated arsenic in marine organisms. **Appl. Organomet. Chem.** 2: 539-546.
- Kar, M., Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiol.** 57(2): 315-319.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.** 27: 137-138.
- Kumaresan, M., Riyazuddin, P. 2001. Overview of speciation chemistry of arsenic. **Curr. Sci.** 80: 837-846.
- Lavid, N., Schwartz, A., Yarden, O., Tel-Or, E. 2001a. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). **Planta** 212: 323-331.
- Lavid, N., Schwartz, A., Lewinsohn, E., Tel-Or, E. 2001b. Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae) and *Nymphaeae* (Nymphaeaceae). **Planta** 214: 189-195.
- 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.G. 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination seedling growth and amylolytic activity of wheat. **Chemosphere** 61: 293-301.
- Logoteta, B., Xu, X.Y., Macnair, M.R., McGrath, S.P., Zhao, F.J. 2009. Arsenite efflux is not enhanced in the arsenate-tolerant phenotype of *Holcus lanatus*. **New Phytol.** 183: 340-48.
- Lux, A., Sottníková, A., Opatrná, J., Greger, M. 2004. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. **Physiol. Plant.** 120(4): 537-545.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelley, E.D. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature** 409: 579.
- Marin, A.R., Masscheleyn, P.H., Patrick, W.H.Jr. 1992. The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. **Plant Soil.** 139: 175-183.

- Marques, T.C.L.L.S.M., Soares, A.M., Gomes, M.P., Martins, G. 2011. Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de eucalipto expostas ao cádmio. **Rev. Árvore** 29(5): 997–1006.
- Mazen, A., Zhang, D.Z., Franceschi, V.R. 2004. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*, Physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. **New Phytol.** 161: 435-448.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. 1990. An altered phosphate uptake system in arsenate tolerant *Holcus lanatus*. **New Phytol.** 16: 29-35.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. 1992. Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system, a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. **J. Exp. Bot.** 43: 519-524.
- Meharg, A.A. 1994. Integrated tolerance mechanisms-constitutive and adaptive plant-responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant Cell Environ.** 17: 989-993.
- Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytol.** 154: 29-43.
- Meharg, A.A., Jardine, L. 2003. Arsenite transport into paddy rice (*Oriza sativa*) roots. **New Phytol.** 157: 39-44.
- Melo, R.F., Dias, L.E., Mello, J.W.V., Oliveira, J.A. 2010. Behavior of *Eucalyptus grandis* and *E. cloeziana* seedlings grown in arsenic-contaminated soil. **R. Bras. Ci. Solo** 34: 985-992.
- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Pol. J. Environ. Stud.** 15: 523-530.
- Mylona, P.V., Polidoros, A.N., Scandalios, J.G. 1998. Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. **Free Radical Biol. Med.** 25: 576–585.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M. 1965. Polychromatic staining of cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** 59(2): 368-373.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environ. Exp. Bot.** 52, 199-223.
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'ana, R., Mosquim, R.R., Moreira, M.A. 1999. Aluminium effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** 11: 137-143.
- Prado, C., Pagano, E., Prado, F., Rosa, M. 2012. Detoxification of Cr(VI) in *Salvinia minima* is related to seasonal-induced changes of thiols, phenolics and antioxidative enzymes. **J. Hazard. Mater.** 239-240: 355-361.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant Sci.** 180(2): 169-181.
- Requejo, R., Tena, M. 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. **Phytochemistry** 66: 1519-1528.
- Rosen, B.P. 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. **Febs. Lett.** 529: 86-92.

- Ryan, J.D., Gregory, P., Tingey, W.M. 1982. Phenolic oxidase activity in glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. **Phytochemistry** 21: 1885-1887.
- Schmöger, M.E.V., Oven, M., Grill, E. 2000 Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiol.** 122: 793-801.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.** 25:192-205.
- Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S., Dubey, R.S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Sci.** 161: 1135–1144.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. **Cr. Rev. Food Sci. Nutr.** 32: 67-103.
- Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Tuli, R. 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** 72(4): 1102-1110.
- Silva, I.R., Smytz, T.J., Raper, C.D., Carter, T.E., Rufty, T.W. 2001. Differential aluminium tolerance in soybean, an evaluation of the role of organic acids. **Plant Physiol.** 112: 200-210.
- Silva, K.L.F. 2008. **Avaliação de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 97p.
- Silva, S.A., Techio, V.H., Castro, E.M., Faria, M.R., Palmieri, M.J. 2013. Reproductive, cellular, and anatomical alterations in *Pistia stratiotes* L. plants exposed to cadmium. **Water, Air, Soil Pollut.** doi 10.1007/s11270-013-1454-z.
- Singh, N., Ma, L.Q. 2006. Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis* L. **Environ. Pollut.** 141: 238-246.
- Sinha, S., Sinam, G., Mishra, R.K., Mallick, S. 2010. Metal accumulation, growth, antioxidants and oil yield of *Brassica juncea* L. exposed to different metals. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** 73, 1352–1361.
- Smith, S.E., Christophersen, H.M., Pope, S., Smith, F.A. 2010. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. **Plant Soil** 327: 1–21.
- Talukdar, D. 2012. Arsenic-induced oxidative stress in the common bean legume, *Phaseolus vulgaris* L. seedlings and its amelioration by exogenous nitric oxide. **Physiol. Mol. Biol Plants** doi 10.1007/s12298-012-0140-8.
- Tedesco, M.J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H., Volkweiss, S.J. 1995. **Análise de solo, plantas e outros materiais.** Porto Alegre, UFRGS. 174p.
- Tripathi, A.K., Sadhna, T., Tripathi, S. 1999. Changes in some physiological and biochemical characters in *Albizia lebbek* as bio-indicators of heavy metal toxicity. **J. Environ. Biol.** 20: 90-98.

- Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D.K., Maathuis, F.J.M. 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. **Trends Biotechnol.** 25: 158-164.
- Tripathi, P., Mishra, A., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Singh, R.P., Tripathi, R.D. 2012a. Differential response of oxidative stress and thiol metabolism in contrasting rice genotypes for arsenic tolerance. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** 79: 189-198.
- Tripathi, P., Tripathi, R.D., Singh, R.P., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Adhikari, B. 2012b. Arsenite tolerance in rice (*Oriza sativa* L.) involves coordinated role of metabolic pathways of thiols and amino acids. **Environ. Sci. Pollut. Res.** doi 10.1007/s11356-012-1205-5.
- Tu, C., Ma, L.Q., Bondada, B. 2002. Plant and environmental interactions: Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. **J. Environ. Qual.** 31: 1671-1675.
- Tu, C., Ma, L.Q. 2005. Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Environ. Poll.** 135: 333-340.
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Zhang, W.J., Li, W., Lin, Z.P. 2009. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere** 75: 1468-1476.
- Yadav, S.K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: As overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metals stress tolerance of plants. **S. Afr. J. Bot.** 76: 167-179.
- Zhao, F.J., McGrath, S.P., Meharg, A.A. 2010. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. **Annu. Rev. Plant Biol.** 61: 535–59.
- Zhao, H., Wu, L., Chai, T., Zhang, Y., Tana, J., Ma, S. 2012. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **J. Plant Physiol.** 169: 1243– 1252.

## ANEXOS



**Figura 1.** Aspecto geral de plantas de *Borreria verticillata*, após 4 dias de exposição ao arsênio. (A) - Sistema hidropônico; (B-C) - Plantas do Morro do Galo; (D-H) - Plantas da Mata do Paraíso; B, D e G - 0,0 μM de As e C, E, F, e H - 66,0 μM de As. Seta branca - murcha; setas vermelhas - inibição do desenvolvimento de raízes laterais.