

ROBERTO JUNIO GOMES

**INFLUÊNCIA DE FOSFATO E SULFATO NA FITOTOXICIDADE DE
ARSÊNIO EM *Crambe abyssinica* Hochst.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G633i
2014
Gomes, Roberto Junio, 1988-
Influência de fosfato e sulfato na fitotoxicidade de
arsênio em *Crambe abyssinica* Hochst. / Roberto Junio
Gomes. - Viçosa, MG, 2014.
vii, 73f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Luiz Eduardo Dias.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.44-53.

1. Fitorremediação. 2. Solos - Descontaminação.
3. Arsênio. 4. Hidroponia. 5. *Crambe Abyssinica* Hochst.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Solos.
Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas.
II. Título.

CDD 22.ed. 628.5

ROBERTO JUNIO GOMES

**INFLUÊNCIA DE FOSFATO E SULFATO NA FITOTOXICIDADE DE
ARSÊNIO EM *Crambe abyssinica* Hochst.**

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

APROVADA: 27 de outubro de 2014

Renildes Lúcio Ferreira Fontes

Paulo Roberto Gomes Pereira

Igor Rodrigues de Assis
(Coorientador)

Luiz Eduardo Dias
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas bênçãos, e a Nossa Senhora, pelo amparo nos momentos difíceis.

Aos meus pais Roberto e Maria e aos meus irmãos Rafael e Ricardo pelo porto seguro, pelo estímulo e por acreditarem em mim.

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

Ao Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de cursar o mestrado e por ter favorecido o contato com pessoas incríveis.

Ao grande Professor Luiz Eduardo Dias, orientador desta dissertação, pelo convívio sereno e equilibrado. Obrigado pela ajuda e incentivo na elaboração deste trabalho e pelas orientações precisas.

Ao Prof. Igor pelos apontamentos decisivos na execução dos experimentos.

Aos professores do Departamento de solos da Universidade Federal de Viçosa pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Solos, principalmente a secretária Luciana e aos técnicos Júlio, Geovani, Carlos Fonseca, Pablo e Lula que sempre estiveram à disposição para ajudar.

A Ritinha pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos amigos Luciano, Clarice e Michell pelo incentivo durante todo o caminho.

Ao grupo da festa nunca termina (Cristiano, Guilherme, Luísa, Patente, Renato, Silmara e Tocantins), pelos maravilhosos momentos de distração que vivemos, que aliviavam as pressões do dia a dia, e pela grande ajuda na execução dos experimentos.

A vocês serei eternamente grato!

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1.....	4
Fitotoxicidade de arsênio em plantas de <i>Crambe abyssinica</i> Hochst.....	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	7
RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
CONCLUSÕES	15
CAPITULO 2.....	16
Fitotoxicidade de arsênio em plantas de <i>Crambe abyssinica</i> Hochst submetidas a diferentes concentrações de fosfato e sulfato.....	16
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
CONCLUSÕES	32
CAPITULO 3.....	33
Trocias gasosas e fluorescência de clorofila α em <i>Crambe abyssinica</i> Hochst em diferentes concentrações de fosfato, sulfato e arsenato.....	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES	42
CONCLUSÕES GERAIS	43
LITERATURA CITADA	44
ANEXOS	54

RESUMO

GOMES, Roberto Junio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Influência de fosfato e sulfato na fitotoxicidade de arsênio em *Crambe abyssinica* Hochst.** Orientador: Luiz Eduardo Dias. Co-orientador: Igor Rodrigues de Assis.

Um grande esforço é empregado na seleção de espécies para a fitorremediação de áreas contaminadas com arsênio. O comportamento das plantas em relação à presença de arsênio na região da rizosfera pode diferir, entre outros fatores, em função da concentração do metaloide, da presença de outros íons e de fatores intrínsecos da espécie. Por isso, tão importante quanto a seleção de espécies tolerantes ao arsênio é o desenvolvimento de métodos que favoreçam o crescimento de plantas sobre o substrato, otimizando o processo de recuperação de uma área contaminada por esse metalóide. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial da espécie *Crambe abyssinica* Hoscht para a utilização em programas de revegetação de áreas contaminadas com arsênio e a fitotoxicidade do arsenato nessas plantas em diferentes concentrações de fosfato e sulfato. Para alcançar esses objetivos foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação. Inicialmente plantas de crambe, cultivadas em solução nutritiva, foram expostas ao arsênio nas concentrações: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 e 1,2 mmol L⁻¹; fornecido na forma de arsenato de sódio (Na₂HAsO₄+7H₂O), por duas semanas. Após este período, avaliaram-se a altura e a área foliar das plantas e quantificou-se a matéria seca e a concentração de As, P e S na raiz e na parte aérea. As plantas toleraram o estresse causado pelo As durante todo o período experimental, pois não foi observada a morte das plantas e, além disso, absorveram e armazenaram expressivas quantidades de arsênio, especialmente na raiz, indicando o potencial de uso da espécie *Crambe abyssinica* como espécie fitoestabilizadora de arsênio. Em outro experimento, plantas de crambe foram cultivadas em meio hidropônico, com solução de Hoagland e Arnon, meia força, durante duas semanas. Após esse período, aplicaram-se os tratamentos, que consistiram em três concentrações de fosfato (0,4; 0,8; 1,2 mmol L⁻¹), sulfato (0,8; 1,6; 2,4 mmol L⁻¹) e arsenato (0,0; 0,3; 0,6 mmol L⁻¹), fornecidos nas formas de ácido fosfórico (H₃PO₄), ácido sulfúrico

(H₂SO₄) e arsenato de sódio (Na₂HAsO₄+7H₂O), respectivamente, configurando um esquema fatorial 3 x 3 x 3, com três repetições. Duas semanas após a aplicação dos tratamentos aferiram-se as trocas gasosas (taxa fotossintética, condutância estomática, concentração interna de CO₂ e taxa transpiratória), os parâmetros de fluorescência de clorofila α (fluorescência mínima, fluorescência máxima e o rendimento quântico potencial do fotossistema II), a matéria seca e a concentração de As, P e S na raiz e na parte aérea das plantas. De maneira geral, foi observado que concentrações mais elevadas de fosfato amenizaram os efeitos tóxicos de As em plantas de *Crambe abyssinica*. Por outro lado, em concentrações mais elevadas de sulfato os teores de As nas raízes das plantas foram maiores e, no geral, não contribuíram para a diminuição da toxicidade do As. Para as trocas gasosas, maiores concentrações de fosfato minimizaram o efeito tóxico do arsênio e aumentaram a taxa fotossintética. As doses de arsenato, fosfato e sulfato utilizadas não afetaram as variáveis relacionadas à clorofila α. Os resultados encontrados indicam que a toxicidade do arsênio em *Crambe abyssinica* está relacionada, principalmente, a danos no sistema radicular, e que concentrações crescentes de fosfato minimizam os efeitos tóxicos do arsênio nesta espécie.

ABSTRACT

GOMES, Roberto Junio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2014. **Phosphate and sulfate influence on arsenic phytotoxicity in *Crambe abyssinica* Hochst.** Adviser: Luiz Eduardo Dias. Co-Adviser: Igor Rodrigues de Assis.

A huge effort has been applied to select species for the phytoremediation of arsenic contaminated areas. Plants behavior with respect to arsenic presence on the rhizosphere region can differ due to the metalloid concentration, the presence of other ions and intrinsic factors of the species. Hence, as important as the selection of arsenic tolerant species, is the development of methods that favor plants growth over the substrate, optimizing the recovery process of the contaminated area. So, the aim of this study was to evaluate the potential use of the species *Crambe abyssinica* Hoscht in revegetation programs in As contaminated areas and the arsenate phytotoxicity under different contents of phosphate and sulphate. To achieve this aim two experiments were conducted in greenhouse. Firstly, crambe plants, grown in nutrient solution, were exposed to arsenic under different concentrations: 0,00; 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 and 1,2 mmol L⁻¹, provided as sodium arsenate (Na₂HAsO₄+7H₂O), for two weeks. After this period, it was evaluated the height and the leaf area and it was quantified the dry matter and the contents of As, P and S in the root and in the aerial part. The plants tolerated the stress caused by As during the entire experimental period, since no plant death was observed. Besides that, the plants absorbed and stored large quantities of As, especially on the root, what indicates the potential use of the species *Crambe abyssinica* in recovery programs of As contaminated areas. In the second experiment, crambe plants were grown in hydroponic solution with half strength, during two weeks. Thereafter, it was added the treatments, that consisted of three concentrations of phosphate (0,4; 0,8; 1,2 mmol L⁻¹), sulphate (0,8; 1,6; 2,4 mmol L⁻¹) and arsenate, provided as phosphoric acid (H₃PO₄), sulfuric acid (H₂SO₄) and sodium arsenate (Na₂HAsO₄+7H₂O), respectively. It was adopted the 3 x 3 x 3 factorial, with three trials. Two weeks after the treatments addition, it was gauged the gas exchanges (photosynthetic rate, stomatal conductance, internal CO₂ concentration and transpiration rate), α

chlorophyll fluorescence parameters (minimum fluorescence, maximum fluorescence and the potential quantum yield of photosystem II), dry matter and the contents of As, P e S in the root and in the aerial part. In general, it was observed that higher concentrations of phosphate softened the As toxic effects in *Crambe abyssinica* plants. On the other hand, higher concentrations of sulphate increased As contents in the roots and, in general, did not contributed to decrease the As toxicity. In gas exchanges, higher concentrations of phosphate decreased the toxic effect of As and increased the photosynthetic rate. The arsenate, phosphate and sulphate doses did not affected the variables related to α chlorophyll. The results indicate that As toxicity in *Crambe abyssinica* is related, mainly, to damage to the root system, and that increasing concentrations of phosphate minimize the toxic effects of arsenic in this species.

INTRODUÇÃO GERAL

O arsênio é um metaloide pertencente ao grupo 5A da tabela periódica, com propriedades químicas semelhantes às do fósforo. Está associado principalmente a minerais sulfetados, sendo o 20º elemento mais abundante na crosta terrestre. É altamente tóxico para os seres humanos e mesmo baixos níveis de exposição a esse elemento pode provocar diversas patologias, incluindo carcinogênese (Mandal & Suzuki, 2002).

As formas inorgânicas do arsênio, As(III) e As(V), são as mais comuns e ocorrem como oxianions arsenito (AsO_3^{3-}) e arsenato (AsO_4^{3-}). A ocorrência relativa dessas formas é função do pH e do potencial redox (Eh) do meio (Masscheleyn et al., 1991). O arsenato predomina em ambientes sem limitações de oxigênio, enquanto que o arsenito é a forma mais estável sob condições redutoras, sendo o As(III) mais solúvel, móvel e tóxico que o As(V) (Mandal & Suzuki, 2002; Grossl et al., 2004).

Teores elevados de As no solo podem ser resultantes de ações antropogênicas, por meio do uso de agrotóxicos, fertilizantes e combustão de carvão (Smith et al., 1998; Baird, 2002). Em áreas de mineração de Au, Cu, U e Ni em que existe grande revolvimento de material rico em sulfetos, como a arsenopirita (AsFeS), a drenagem ácida (Mello et al., 2003), e o As podem representar um grave problema ambiental (Bundschuh et al., 2008).

Visando à remediação de solos e substratos contaminados com As, muitos métodos têm sido desenvolvidos (USEPA, 2002). Dentre eles, destaca-se a fitorremediação, que consiste no uso de plantas para remover contaminantes do ambiente e ou imobiliza-los em formas menos tóxicas (Salt et al., 1998; Pulford & Watson, 2003). A fitorremediação pode ser aplicada em substratos com grau moderado de contaminação e quando a remediação não é requerida a curto prazo. Por ser um processo in situ e muitas vezes prescindir de uso intensivo de maquinário, é menos onerosa do que métodos convencionais de engenharia (USEPA, 2002).

Um grande esforço é empregado na seleção de espécies adequadas para a fitorremediação (ou revegetação) de áreas contaminadas com As, englobando desde samambaias (Francesconi et al., 2002; Visoottiviseth et al., 2002; Zhao et al., 2002, Oliveira, 2012), que normalmente acumulam grande quantidade de As na parte aérea, até espécies de gramíneas e arbóreas (Madejón et al., 2004; French et al., 2006; Melo, 2006; Vazquez et al., 2006; Tlustoš et al., 2007; King et al., 2008; Melo et al., 2009; Cipriani et al., 2011).

Para que a Fitorremediação seja eficaz, a espécie a ser utilizadas deve se estabelecer na presença do contaminante e absorver quantidades significativas do mesmo. Neste sentido, Artus (2006) descreve a espécie *Crambe abyssinica* Hochst com potencial para ser utilizada na descontaminação de áreas contaminadas por metais pesados e metalóides.

O comportamento das plantas em relação à presença de As na região da rizosfera pode diferir em função de sua concentração, da presença de outros íons e de fatores intrínsecos da espécie no que se refere à sua capacidade de tolerar o elemento (Gonzaga et al., 2006). Por isso, tão importante quanto a seleção de espécies tolerantes ao arsênio é o desenvolvimento de métodos que possibilitem ou favoreçam o crescimento das plantas em substratos contaminados, otimizando o processo de recuperação da área. Dentre esses métodos, baseando-se nas interações entre os elementos químicos no solo e na planta, inclui-se a fertilização do substrato visando reduzir os efeitos tóxicos do As.

Em estudos de nutrição mineral de plantas, o solo constitui-se em um meio altamente complexo e interativo para que sejam analisados os efeitos de um dado nutriente ou elemento no desenvolvimento da planta. Assim, meios artificiais mais simples, que permitem um melhor controle das proporções dos diversos nutrientes disponíveis tem sido propostos. No Brasil, soluções nutritivas arejadas, contendo os macro e micronutrientes necessários ao crescimento vegetal são bastante utilizadas para este fim.

Não existe uma solução nutritiva ideal para todas as espécies vegetais e condições de cultivo, uma vez que a absorção de um nutriente é muito influenciada pela concentração dos demais nutrientes em solução, pela espécie

vegetal e condições ambientais. Contudo, algumas soluções como as propostas por Hoagland e Arnon (1950), Clark (1975), Sarruge (1975), Castellane e Araújo (1995) e Furlani et al. (1999) são muito utilizadas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a fitotoxicidade de arsênio em plantas de *Crambe abyssinica* Hochst em solução nutritiva e o efeito de diferentes concentrações de fosfato e de sulfato no crescimento dessas plantas quando na presença de arsênio.

CAPÍTULO 1

**Fitotoxicidade de arsênio em plantas de *Crambe abyssinica*
Hochst.**

INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um metaloide tóxico que possui efeitos carcinogênicos nos seres humanos e está presente naturalmente na atmosfera, nos ambientes aquáticos e terrestres, sendo liberado no meio ambiente através de atividades geológicas e antropogênicas (Mandal & Suzuki, 2002).

Altos níveis de As no solo e na água potável tem sido relatados em todo o mundo (Semedley & Kinniburgh, 2002) e em alguns locais o As na água pode ultrapassar $10 \mu\text{g L}^{-1}$, que é o limite máximo estabelecido pela Organização Mundial da Saúde.

A presença de As no solo e na água, mesmo sob baixas concentrações, pode provocar grandes danos à saúde humana e, por isso, vem sendo investido grandes esforços na busca de metodologias que permitam a redução da toxicidade deste elemento no processo de recuperação de áreas contaminadas. Devido ao elevado potencial de contaminação do solo, cursos d'água e lençol freático por As, este problema ambiental é grave e necessita de efetiva solução tecnológica (WHO, 2001, Ferreccio & Sancha, 2006, Zhao et al., 2010).

Existem diversas metodologias para a recuperação de áreas degradadas pela contaminação por As, que vão desde o uso de técnicas de engenharia baseadas em processos físico-químicos (Cheng et al., 1987) ao uso de seres vivos tolerantes que possuem a capacidade de absorver e armazenar este elemento em sua biomassa. A técnica de fitorremediação, que consiste no uso de plantas no processo de recuperação de áreas contaminadas, tem recebido grande atenção por parte da comunidade científica, empresas e instituições públicas.

A fitorremediação pode ser sub-dividida em 5 grupos principais: Fitoextração (remoção do contaminante do solo e acumulação nos tecidos); Fitodegradação (degradação de contaminantes orgânicos); Rizofiltração (absorção de contaminantes de efluentes); Fitoestabilização (redução da mobilidade e da disponibilidade do contaminante por imobilização) e

Fitovolatilização (volatilização do contaminante para a atmosfera através da planta).

Para que a fitorremediação seja eficaz, é necessário, em primeiro lugar, que as espécies a serem plantadas sejam capazes de se estabelecerem na presença do contaminante, sendo desejável também, que elas consigam absorver grandes quantidades do mesmo. Uma vez absorvido, a disponibilidade do contaminante para outras espécies e a possibilidade de contaminação do lençol freático são reduzidas.

As plantas comportam-se de forma diferenciada quando na presença de arsênio. Os vegetais desenvolveram basicamente duas estratégias que os permitiram sobreviver e reproduzir em ambientes ricos em As: excluir ou acumular este elemento (Whiting et al., 2005; Nascimento & Xing, 2006). A estratégia de exclusão consiste em restringir a translocação do As das raízes para a parte aérea, sendo esta a mais comum entre as plantas (Deschamps & Matschullat, 2007), enquanto que a estratégia de acumulação envolve a concentração do metalóide em órgãos específicos da parte aérea (Reeves, 2006).

Várias espécies de plantas, especialmente membros do grupo das pteridófitas e da família Brassicaceae, têm sido identificadas como promissoras para a fitorremediação (Ma et al., 2001; Salido et al., 2003). Outros benefícios podem ser alcançados no processo de fitorremediação, especialmente se as espécies utilizadas puderem ser aproveitadas economicamente.

Nesse sentido, o Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst), uma espécie pertencente à família Brassicaceae, apresenta grande potencial para uso em programas de fitorremediação, pois é uma planta com ciclo de vida curto, com alta produção de biomassa, e que se adapta bem a diversas condições edafoclimáticas. Além disso, esta espécie vem ganhando grande importância no Brasil devido a sua aptidão para a produção de biodiesel e pelo seu alto teor de óleo (Machado et al., 2007).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de matéria seca de plantas de *Crambe abyssinica* Horscht, bem como os teores, o acúmulo

e a distribuição de arsênio nos órgãos das plantas cultivadas em doses crescentes de As.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Crambe abyssinica* Hochst, cedidas pela Fundação Mato Grosso, foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 3 % por 10 min., lavadas em água corrente e colocadas para germinar em sementeiras contendo o substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças. Após dez dias, quando a primeira folha verdadeira surgiu, as plantas foram transplantadas para um meio hidropônico em vasos de 2,5 dm³ sob aeração forçada. Nesta etapa as plantas foram aclimatadas, durante duas semanas, em solução nutritiva de Hoogland & Arnon (1950), pH 6, meia força (metade da concentração). Após este período, aumentou-se a concentração da solução para uma força (concentração original), mantendo a aeração e o pH em 6, e aplicou-se os tratamentos que consistiram em seis concentrações de As: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 e 1,2 mmol L⁻¹; fornecido na forma de arsenato de sódio (Na₂HAsO₄+7H₂O), sendo a condutividade elétrica da solução ajustada para 2,8 mS cm⁻¹ em todos os tratamentos com NaCl. A troca da solução nutritiva ocorreu semanalmente e o pH da solução foi corrigido diariamente com NaOH e HCl 0,5 mol L⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições, sendo que cada vaso possuía duas plantas.

Duas semanas após a aplicação dos tratamentos as plantas foram fotografadas e passaram por uma avaliação visual para detecção de sintomas de toxidez por As. Após as medições de altura e área foliar, através do medidor de área foliar Licor 2000_Model LI3100, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz. As raízes foram lavadas em água corrente por 5 min., colocadas em uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ por 1 min., e enxaguadas três vezes em água deionizada. Para determinação da matéria seca, as partes das plantas foram colocadas para secar em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até peso constante.

Buscando estimar a evapotranspiração das plantas em função do tratamento aferiu-se o volume final de água nos vasos durante a segunda semana de aplicação dos tratamentos.

Para determinar a concentração de As, P e S na raiz e na parte aérea das plantas, amostras de 0,5 g de material seco e finamente triturado foram submetidas à digestão nítrico-perclórica (3:1) (Tedesco et al., 1995). As amostras foram levadas para chapa aquecedora com uma temperatura inicial de 100 °C, por aproximadamente 30 min., quando se aumentou a temperatura para 180 °C, permanecendo nesta temperatura até alcançar a completa digestão. A quantificação dos teores dos elementos nos extratos das plantas foi determinado por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido em argônio (ICP/OES). Provas em branco foram analisadas para detectar possíveis contaminações.

O conteúdo de arsênio nas raízes e na parte aérea foi calculado com base nos teores e na produção de matéria seca. Por meio da quantidade de As acumulada, calculou-se o índice de translocação de arsênio (Abichequer e Bohnen, 1998), pela seguinte equação:

$$IT(\%) = \frac{\text{Quantidade de As acumulada na parte aérea} \times 100}{\text{Quantidade de As total acumulada na planta}}$$

Para observar o comportamento das variáveis em função das dose de As procedeu-se a análise de regressão, ajustando-se os modelos linear ou quadrático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas toleraram o estresse causado pelo As durante todo o período experimental, pois não foi observada morte de plantas. O principal sintoma de toxidez observado foi o murchamento, de toda a parte aérea, com o aumento da concentração de arsênio na solução (Figura 1A). As plantas expressaram este sintoma aproximadamente 12 horas após a aplicação dos tratamentos, o que indica que este sintoma esteja relacionado a uma alteração no processo de obtenção de água pelas raízes. Ao longo do dia está murcha se acentuava,

atingindo seu máximo entre 12 e 13 h, mas no período noturno a turgência era recuperada e se mantinha até as primeiras horas da manhã.

A absorção de água pelas raízes é realizada em nível celular por proteínas de membrana denominadas aquaporinas e a presença de determinados compostos podem inibir seu funcionamento (Gaspar, 2011). As aquaporinas da subfamília NIP (Nodulin26-like Intrinsic Proteins) regulam a absorção e translocação de As em plantas de arroz (Zhao et al., 2009). Esta inibição diminui a quantidade de água captada e, conseqüentemente, o suprimento de água para a parte aérea nos períodos mais quentes do dia. Stoeva (2003) estudando o efeito do arsênio em plantas de *Phaseolus vulgaris* relatou que o conteúdo relativo de água e o potencial hídrico das folhas reduziram com o aumento das doses.



Figura 1 – A: Sintomas de murcha nas plantas de *Crambe abyssinica*. **B:** Clorose seguida por necrose nas bordas de folhas velhas.

Na segunda semana de exposição aos tratamentos, as plantas expostas as maiores doses de As (0,9 e 1,2 mmol L⁻¹) apresentaram cloroses e necroses marginais nas folhas velhas (Figura 1B). Necroses deste tipo foram observadas em algumas plantas após a exposição ao arsênio (Melo, 2006; Costa, 2007), inclusive em *Pteris vittata* (Li et al., 2006).

O volume de água evapotranspirada, aferida pela variação do volume de água nos vasos durante a segunda semana, foi altamente afetada pelas doses de As (Figura 2).

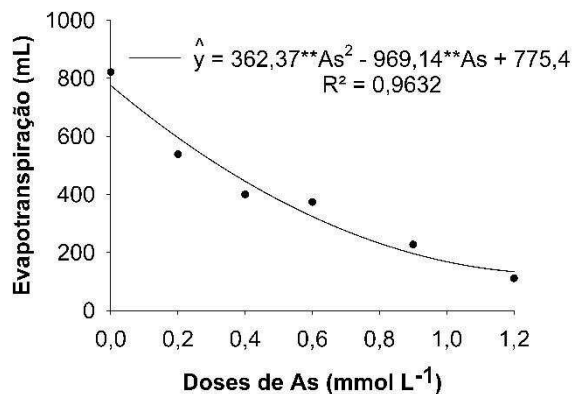


Figura 2 – Estimativa da evapotranspiração de plantas de *Crambe abyssinica* em função de doses de arsênio.

Na ausência de As as plantas evapotranspiraram aproximadamente 820 mL de solução no período de uma semana, enquanto que as plantas submetidas as doses de 1,2 mmol L⁻¹ evapotranspiraram apenas 110 mL. Estes dados, além de embasar o sintoma de murcha observado na parte aérea, indicam a presença de danos radiculares causados pelo As. O As pode destruir a membrana das células radiculares, afetando a absorção de água e nutrientes (Carbonell-Barrachina,1994, Singh et al.,2007; Singh & Ma, 2006).

A área foliar e a altura de parte aérea reduziram de forma linear com o aumento da dose de As em solução (Figura 3). A dose de 1,2 mmol L⁻¹ causou uma redução de 31 e 72 % na altura e na área foliar das plantas, respectivamente, em relação ao controle. Além de reduzir a absorção dos nutrientes por meio dos danos radiculares, o As compete com alguns nutrientes essenciais para a expansão e divisão celular, como o P (Meharg & Macnair, 1991; Wang et al., 2002), por sítios de absorção das raízes, levando a um desequilíbrio nutricional das plantas e, conseqüentemente, a redução do crescimento.

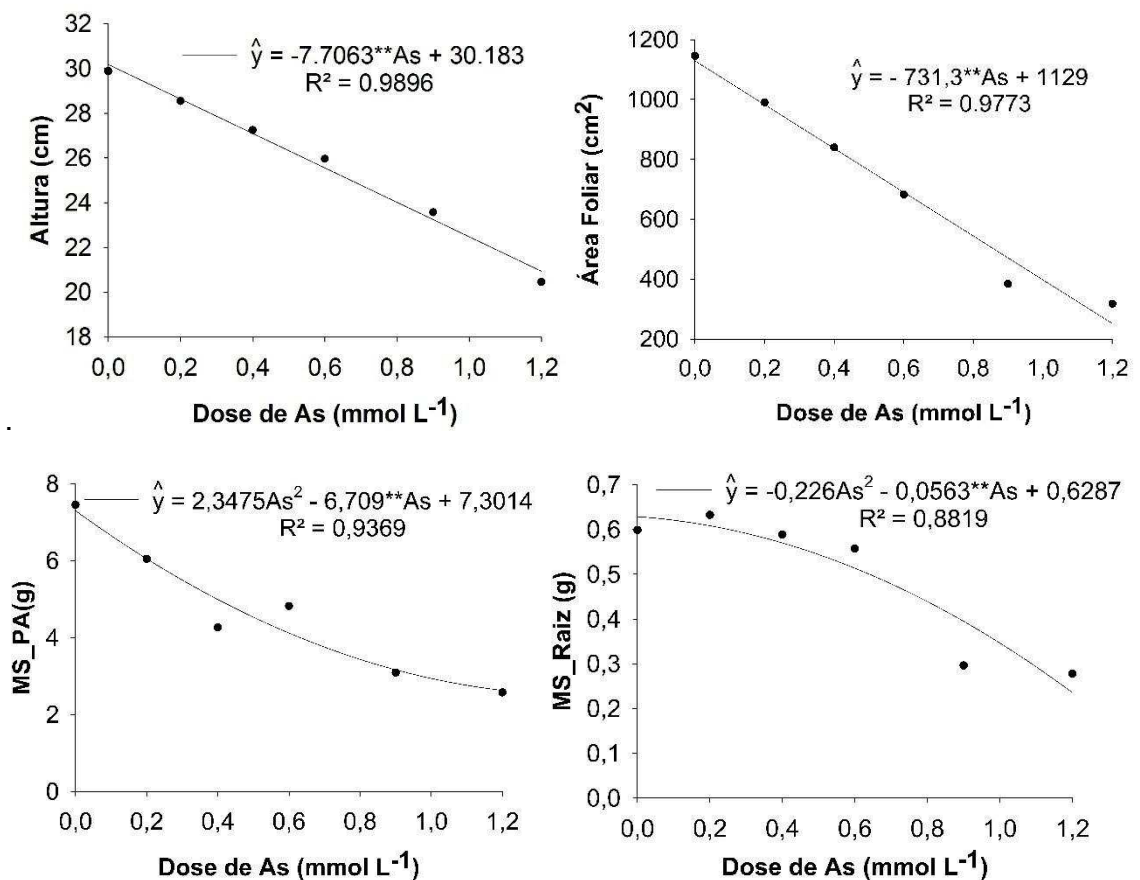


Figura 3 – Altura das plantas, área foliar e matéria seca de parte aérea (MS_PA) e raiz (MS_Raiz) de plantas de *Crambe abyssinica* em função das doses de arsênio.

As plantas submetidas a dose de 1,2 mmol L⁻¹ de As apresentaram redução de 53 e 64 % de matéria seca de raiz e de parte aérea, respectivamente, quando comparadas ao tratamento controle (Figura 3). Oliveira (2012) estudando o potencial de uso de *Dicranopteris flexuosa*, uma pteridófito, para o uso em programas de fitorremediação, observou redução de 57 e 62 % na matéria seca de raiz e de parte aérea, respectivamente, quando as plantas foram expostas a concentração de 0,6 mmol L⁻¹ de As. A redução de matéria seca do crambe foi aproximadamente a mesma, mesmo a dose sendo duas vezes superior a utilizada para *D. flexuosa*, evidenciando a maior tolerância ao As pelas plantas de crambe.

O aumento dos teores de As nas plantas foram acompanhados pelo aumento dos teores de S, principalmente na raiz (Figura 4). Este comportamento pode estar relacionado ao incremento da síntese de compostos ricos em

grupamentos tióis, como as fitoquelatinas, capazes de complexar o arsênio e sequestrá-lo no vacúolo celular. Alguns estudos apontam que as fitoquelatinas podem complexar o As e transportá-lo para o vacúolo ainda na raiz, evitando, assim, a translocação do mesmo para a parte aérea (Ma et al., 2001; Zhao et al., 2009), o que explicaria também os maiores teores de As encontrados na raízes (Figura 4).

O arsenato pode ser facilmente absorvido pelos vegetais devido à sua similaridade com o fosfato (PO_4^{3-}). Esses ânions competem entre si por sítios de ligação nas proteínas transportadoras das raízes (Asher & Reay, 1979; Meharg & Macnair, 1991; Wang et al., 2002). Assim, o aumento nas concentrações de As em solução, mantendo a mesma concentração de P, favorecem a absorção deste, em detrimento a absorção de P, o que pode fundamentar as reduções dos teores de P observadas tanto na raiz quanto na parte aérea das plantas de crambe.

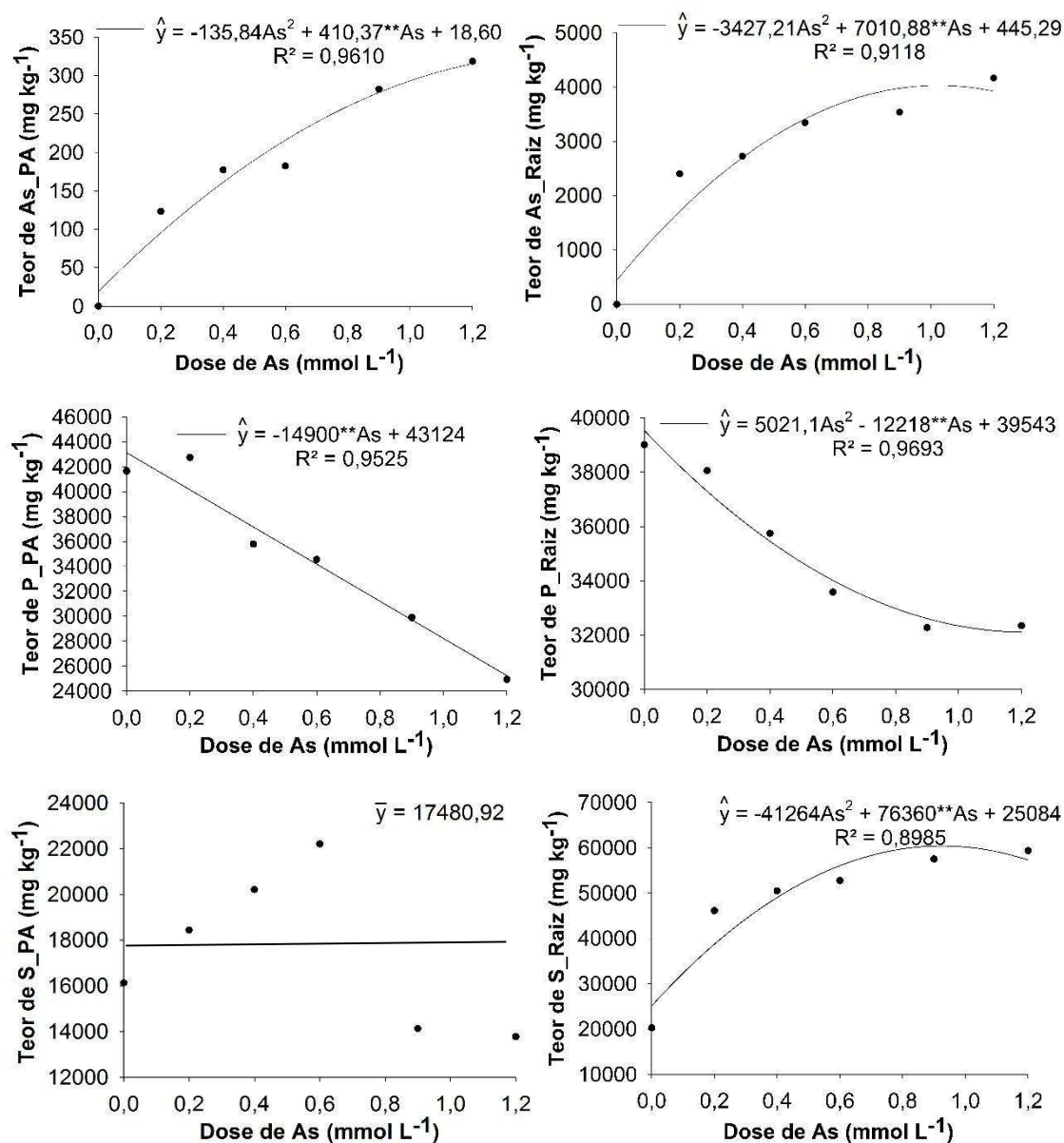


Figura 4 – Teores de arsênio na parte aérea (As_PA) e raiz (As_Raiz), fósforo na parte aérea (P_PA) e raiz (P_Raiz) e enxofre na parte aérea (S_PA) e raiz (S_Raiz) de plantas de *Crambe abyssinica* em função das doses de arsênio.

Os teores de S na parte aérea reduziram abruptamente entre as doses de 0,6 e 0,9 mmol L⁻¹ de As (Figura 4). Plantas de *Acacia mangium* cultivadas em solos com doses crescentes de As apresentaram o mesmo comportamento entre 3,63 e 8,82 mg dm⁻³ de As disponível pelo Mehlich 3 (Cipriani, 2011). Esta queda pode estar relacionada ao sequestro de As no vacúolo das raízes, como explicado anteriormente, uma vez que o aumento da produção de fitoquelatinas aumenta a demanda de S pelas raízes.

O maior acúmulo de As foi observado nas plantas submetidas a 0,6 mmol L⁻¹ de arsênio, com 0,88 e 1,85 mg/vaso na parte aérea e na raiz, respectivamente (Figura 5). As quantidades acumuladas demonstram o grande potencial desta planta para utilização em programas de recuperação de áreas contaminadas por arsênio, tendo em vista que são muito maiores que os observados na maioria das espécies. A crotalária spectabilis, espécie com potencial de uso em programas de revegetação de áreas contaminadas por arsênio, apresentou conteúdo máximo igual 0,26 mg/vaso (Melo, 2006).

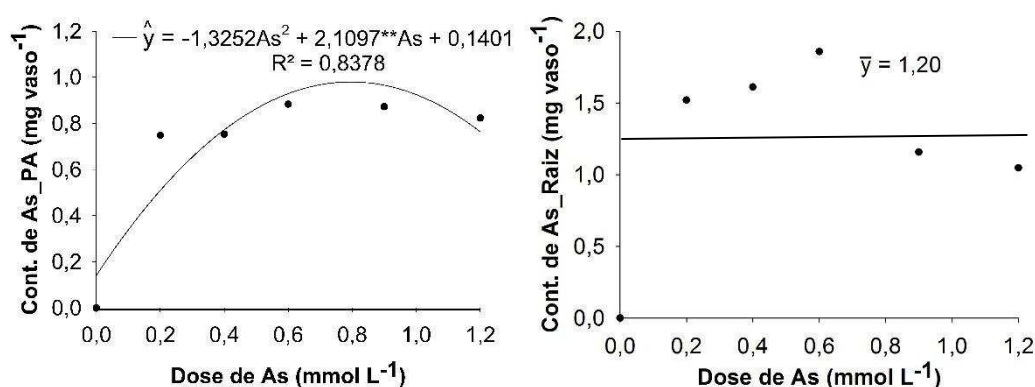


Figura 5 – Conteúdo de arsênio na parte aérea (As_PA) e raiz (As_Raiz) de plantas de *Crambe abyssinica* em função das doses de arsênio.

As plantas tratadas com 0,9 mmol L⁻¹ de arsênio apresentaram um índice de translocação de 45 %, o maior entre as doses estudados. O crambe apresentou um índice de translocação médio de 37 %, ou seja, apenas esta fração do total de As absorvido pela planta foi translocado para a parte aérea. Para serem consideradas hiperacumuladoras as plantas precisam acumular mais de 1000 mg kg⁻¹ de As e armazenar maiores quantidades de As na parte aérea do que na raiz, logo o crambe, apesar de acumular grandes quantidades de As, não pode ser considerada uma planta hiperacumuladora.

CONCLUSÕES

As plantas de *Crambe abyssinica* apresentaram redução linear da evapotranspiração em função do aumento da concentração de arsênio em solução, afetando o balanço nutricional das mesmas;

Plantas de crambe cultivadas na presença de arsênio apresentam maiores teores de enxofre na raiz.

Os teores elevados de arsênio nas raízes de *Crambe abyssinica* indicam que ela pode ser eficaz no processo de fitoestabilização de áreas contaminadas com arsênio.

CAPITULO 2

Fitotoxicidade de arsênio em plantas de *Crambe abyssinica* Hochst submetidas a diferentes concentrações de fosfato e sulfato.

INTRODUÇÃO

O arsênio é um metaloide pertencente ao grupo 5A da tabela periódica, com propriedades químicas semelhantes às do fósforo. Está associado principalmente a minerais sulfetados, sendo o 20º elemento mais abundante na crosta terrestre. É altamente tóxico e mesmo baixos níveis de exposição a esse elemento pode provocar diversas patologias aos seres humanos, incluindo carcinogênese (Mandal & Suzuki, 2002).

Teores elevados de arsênio no solo podem ser resultantes de ações antropogênicas, por meio do uso de agrotóxicos, fertilizantes e combustão de carvão (Smith et al., 1998; Baird, 2002). Em áreas de mineração de Au, Cu, U e Ni em que existe grande revolvimento de material rico em sulfetos, como a arsenopirita (AsFeS), a drenagem ácida e o arsênio podem representar um grave problema ambiental (Mello et al., 2003; Bundschuh et al., 2008).

Visando à remediação de solos e substratos contaminados com arsênio, muitos métodos têm sido desenvolvidos (USEPA, 2002). Dentre eles, destaca-se a fitorremediação, que consiste no uso de plantas para remover contaminantes do ambiente e ou imobilizá-los em formas menos tóxicas (Salt et al., 1998; Pulford & Watson, 2003). A fitorremediação pode ser aplicada em substratos com grau moderado de contaminação e quando a remediação não é requerida a curto prazo. Por ser um processo *in situ* e muitas vezes prescindir de uso intensivo de maquinário, é menos onerosa do que métodos convencionais de engenharia (USEPA, 2002).

Um grande esforço é empregado na seleção de espécies adequadas para a fitorremediação (ou revegetação) de áreas contaminadas com arsênio, englobando desde samambaias (Francesconi et al., 2002; Visoottiviseth et al., 2002; Zhao et al., 2002, Oliveira, 2012), que normalmente acumulam grande quantidade de arsênio na parte aérea, até espécies forrageiras e arbóreas (Madejón et al., 2004; French et al., 2006; Melo, 2006; Vazquez et al., 2006; Tlustoš et al., 2007; King et al., 2008; Melo et al., 2009).

O comportamento de plantas em relação à presença de arsênio na região da rizosfera pode diferir em função de sua concentração, do pH do meio, 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), por isso, tão importante quanto a seleção de espécies tolerantes ao arsênio é o desenvolvimento de métodos que possibilitem ou favoreçam o crescimento das plantas sobre o substrato contaminado, otimizando o processo de recuperação da área. Dentre esses métodos está a fertilização do substrato visando reduzir os efeitos fitotóxicos do arsênio (Tu & Ma, 2003; Silva et al., 2009).

A presença de outros íons pode levar a um efeito de competição na absorção dos nutrientes para as plantas (Borba et al., 2004). É de se esperar que a absorção de um determinado contaminante seja menor em uma solução composta por vários íons do que em uma solução contendo somente o contaminante, mantendo-se a mesma concentração, devido à competição pelos sítios de absorção e à diminuição das atividades em função da formação de pares iônicos.

O arsenato pode ser facilmente absorvido pelos vegetais devido à sua similaridade com o fosfato. Esses ânions competem entre si por sítios de ligação das proteínas transportadoras das raízes (Asher & Reay, 1979; Meharg & Macnair, 1991; Wang et al., 2002). Maior relação P/As na planta pode amenizar os efeitos negativos do arsênio no metabolismo vegetal, fazendo com que haja menores perdas de crescimento e de produção de biomassa (Knudson et al., 2003; Santos et al., 2008; Choudhury et al., 2010; Yu et al., 2010).

Uma vez absorvido, a principal rota de desintoxicação do As é a quelatação do arsenito via ligantes contendo enxofre reduzido, tais como glutathione e fitoquelatinas (polímeros de glutathione). Esse mecanismo depende de grandes quantidades de enxofre o que aumenta a demanda de absorção deste elemento pelas plantas (Mishra et al., 2008).

Alguns trabalhos têm apresentado interação fortemente positiva entre fósforo e enxofre no crescimento e na produção das culturas. Cravo et al. (1985), ao estudarem o efeito da interação desses elementos sobre a produção de matéria seca de soja, observaram que doses elevadas de fósforo associadas a

baixas doses de enxofre levavam a uma produção de matéria seca menor que aquelas associadas a maiores doses.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a fitotoxicidade de arsenato em plantas de *Crambe abyssinica* Hochst cultivadas em soluções com diferentes concentrações de fosfato e sulfato.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Crambe abyssinica* Hochst, cedidas pela Fundação Mato Grosso, foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 3 % por 10 min., lavadas em água corrente e colocadas para germinar em sementeiras contendo substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças. Após dez dias, quando a primeira folha verdadeira surgiu, as plantas foram transplantadas para um meio hidropônico em vasos de 2,5 dm³ sob aeração forçada. Nesta etapa as plantas foram aclimatadas, durante duas semanas, em solução nutritiva de Hoogland & Arnon (1950), pH 6, em meia força, com 0,4 mmol L⁻¹ de fosforo e 0,8 mmol L⁻¹ de enxofre.

Após esse período, aumentou-se a concentração dos nutrientes da solução para uma força (concentração original), mantendo a aeração e o pH em 6, e aplicaram-se os tratamentos. Os tratamentos consistiram em três concentrações de fosfato (0,4; 0,8; 1,2 mmol L⁻¹), sulfato (0,8; 1,6; 2,4 mmol L⁻¹) e arsenato (0,0; 0,3; 0,6 mmol L⁻¹); fornecido nas formas de ácido fosfórico (H₃PO₄), ácido sulfúrico (H₂SO₄) e arsenato de sódio (Na₂HAsO₄+7H₂O), respectivamente, sendo a condutividade elétrica da solução ajustada para 3,1 mS cm⁻¹ em todos os tratamentos com a NaCl. A solução nutritiva foi renovada a cada semana e o pH do meio corrigido diariamente para 6,0 com NaOH e HCl 0,5 mol L⁻¹. O experimento foi montado em esquema fatorial 3 x 3 x 3, em delineamento de blocos casualizados com três repetições e duas plantas por vaso.

Duas semanas após a aplicação dos tratamentos as plantas foram fotografadas, passaram por uma avaliação visual de sintomas de toxidez e foram separadas em raiz e parte aérea. As raízes foram lavadas em água corrente por

5 min., colocadas em uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ por 1 min., e enxaguadas três vezes em água deionizada. Para determinação da matéria seca, as partes das plantas foram colocadas para secar em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até peso constante.

Para determinar a concentração de As, P e S na raiz e na parte aérea das plantas, amostras de 0,2 g de material seco e finamente triturado foram submetidas à digestão nítrico-perclórica (3:1) (Tedesco et al., 1995). As amostras foram levadas para chapa aquecedora com uma temperatura inicial de 100 °C, por aproximadamente 30 min., quando se aumentou a temperatura para 180 °C, permanecendo nesta temperatura até alcançar a completa digestão. A quantificação dos teores dos elementos nos extratos das plantas foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido em argônio (ICP/OES). Provas em branco foram analisadas para detectar possíveis contaminações.

O conteúdo dos elementos nas raízes e na parte aérea foram calculados com base nos teores e na produção de matéria seca. Por meio da quantidade de As acumulada, calculou-se o índice de translocação de arsênio (Abichequer e Bohnen, 1998), pela seguinte equação:

$$IT(\%) = \frac{\text{Quantidade de As acumulada na parte aérea} \times 100}{\text{Quantidade de As total acumulada na planta}}$$

Os valores das variáveis dependentes (biomassa de raízes e de parte aérea, os teores de As, P e S nos diferentes compartimentos das plantas e o conteúdo de arsênio na parte aérea e na raiz) foram submetidos a análise de variância e os efeitos de doses significativos foram desdobrados por meio de análise de regressão, a 5 % de significância, para a obtenção de superfícies de resposta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas toleraram o estresse causado pelo As durante todo o período experimental, pois não foi observada a morte de plantas. Após 12 h da aplicação dos tratamentos foi possível observar a murcha total da parte aérea das plantas

que receberam a maior dose de arsenato ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) associadas às menores doses de fosfato ($0,4 \text{ mmol L}^{-1}$), independente das doses de sulfato (Figura 1). Esta murcha se acentuava ao longo do dia atingindo seu máximo entre 12 e 13 h, mas no período noturno as plantas recuperavam a turgência e se mantinham aparentemente normais até as primeiras horas da manhã, quando murchavam novamente. A ausência de sintomas de toxidez iniciais nas plantas tratadas com as maiores doses de fosfato corroboram com a afirmação de que o arsenato e o fosfato competem em nível radicular pelos mesmos sítios de absorção, como observado por Wang (2002) no estudo dos mecanismos de hiperacumulação de arsênio por *Pteris vittata*.

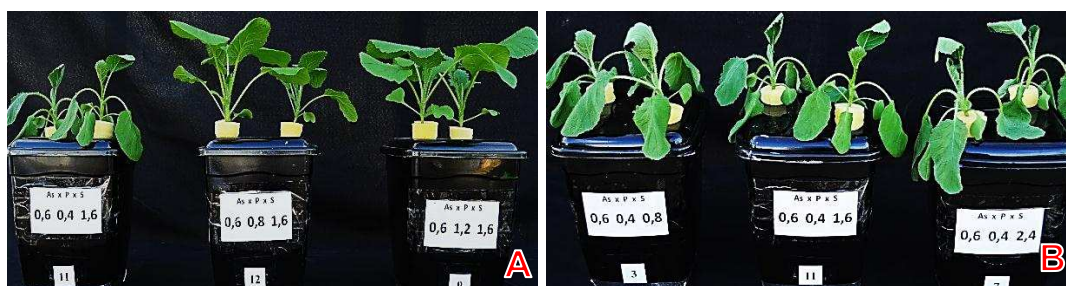


Figura 1 – Sintomas visuais de murcha nas plantas de *Crambe abyssinica*. **A:** Plantas tratadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de As e doses crescentes de P na dose de $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de S. **B:** Plantas tratadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de As e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de P, com doses crescentes de S.

O principal sintoma de toxidez observado no final do experimento foi a diminuição de crescimento das plantas (Figura 2). Esse sintoma permitiu observar um efeito nítido das doses de fosfato e um efeito quase nulo das doses de sulfato, uma vez que, as plantas que receberam as maiores doses de arsenato associadas com as menores doses de fosfato apresentavam fortes sintomas de toxidez, independente das doses de sulfato.



Figura 2 - Redução de crescimento na parte aérea de *Crambe abyssinica*. **A**: Doses crescentes de P e S na ausência de As (controle) **B**: Doses crescentes de As na dose de 0,8 mmol L⁻¹ de P e 1,6 mmol L⁻¹ de S. **C**: Doses crescentes de P nas doses de 0,6 mmol L⁻¹ de As e 0,8 mmol L⁻¹ de S. **D**: Doses crescentes de S nas doses de 0,6 mmol L⁻¹ de As e 0,4 mmol L⁻¹ de P. Doses crescendo da esquerda para direita.

Os danos causados pelo arsênio nas raízes foram ainda maiores (Figura 3). Em algumas plantas a produção de raiz praticamente cessou após aplicação dos tratamentos, o que pode ter corroborado para a ocorrência dos sintomas de murcha visualizados na parte aérea nas horas mais quentes do dia. Em diversos trabalhos têm sido demonstradas alterações anatômicas em raízes de plantas expostas a níveis tóxicos de As. Essas alterações incluem principalmente um alto nível de desestruturação e morte celular que pode estar relacionada ao estresse oxidativo causado pelo As (Singh et al., 2007; Silva et al., 2008; Barbosa et al., 2009).



Figura 3 - Redução de crescimento das raízes de *Crambe abyssinica*. **A**: Plantas tratadas com doses crescentes de P e S na ausência de As (controle) **B**: Doses crescentes de As na dose de 0,8 mmol L⁻¹ de P e 1,6 mmol L⁻¹ de S. **C**: Doses crescentes de P nas doses de 0,6 mmol L⁻¹ de As e 0,8 mmol L⁻¹ de S. **D**: Doses crescentes de S nas doses de 0,6 mmol L⁻¹ de As e 0,4 mmol L⁻¹ de P. Doses crescendo da esquerda para direita.

Não foi observado o efeito isolado das concentrações crescentes de sulfato e fosfato nos teores de S e P da raiz, respectivamente (Tabela 1). Isto ilustra a complexidade existente em torno desses elementos e ressalva a importância da lei da interação entre nutrientes. Esta lei exprime que cada fator deve ser considerado como parte de um conjunto de fatores, dentro do qual está correlacionados com outros por efeitos recíprocos, pois eles se interagem (Voisin, 1973).

Tabela 1 – Resultado da análise de variância referente a matéria seca de parte aérea (MS_PA) e raiz (MS_R); teores de arsênio da parte aérea (AS_PA) e raiz (AS_R); conteúdo de arsênio de parte aérea (Cont. AS_PA) e raiz (Cont. AS_R) e teor de fósforo e enxofre na parte aérea (P_PA e S_PA) e raiz (P_R e S_R) de plantas de *Crambe abyssinica*

F.V.	G.L	QUADRADO MÉDIO				
		MS_PA	AS_PA	Cont. As_PA	P_PA	S_PA
Bloco	2	6,68**	0,12 ^{n.s}	0,08**	304,40 ^{n.s}	1201,87*
As	2	33,37**	816,98**	3,10**	890712,34**	121179**
P	2	9,01**	31,04**	0,44**	49418,87**	5915,75**
S	2	1,23*	13,98**	0,07**	67084,75**	51648,82**
AsxP	4	3,17**	30,35**	0,31**	283187,32**	17607,01**
AsxS	4	0,20 ^{n.s}	18,41**	0,08**	108045,67**	6799,91**
PxS	4	0,15 ^{n.s}	2,75**	0,01 ^{n.s}	28383,93**	9702,55**
AsxPxS	8	0,10 ^{n.s}	3,80**	0,01 ^{n.s}	30017,26**	7223,45**
Resíduo	52	0,27	0,2	0,01	1732,67	348,23
Média		2,83	187,7	0,38	37394	18881
C.V (%)		44,96	83,63	65,28	18,97	14,17

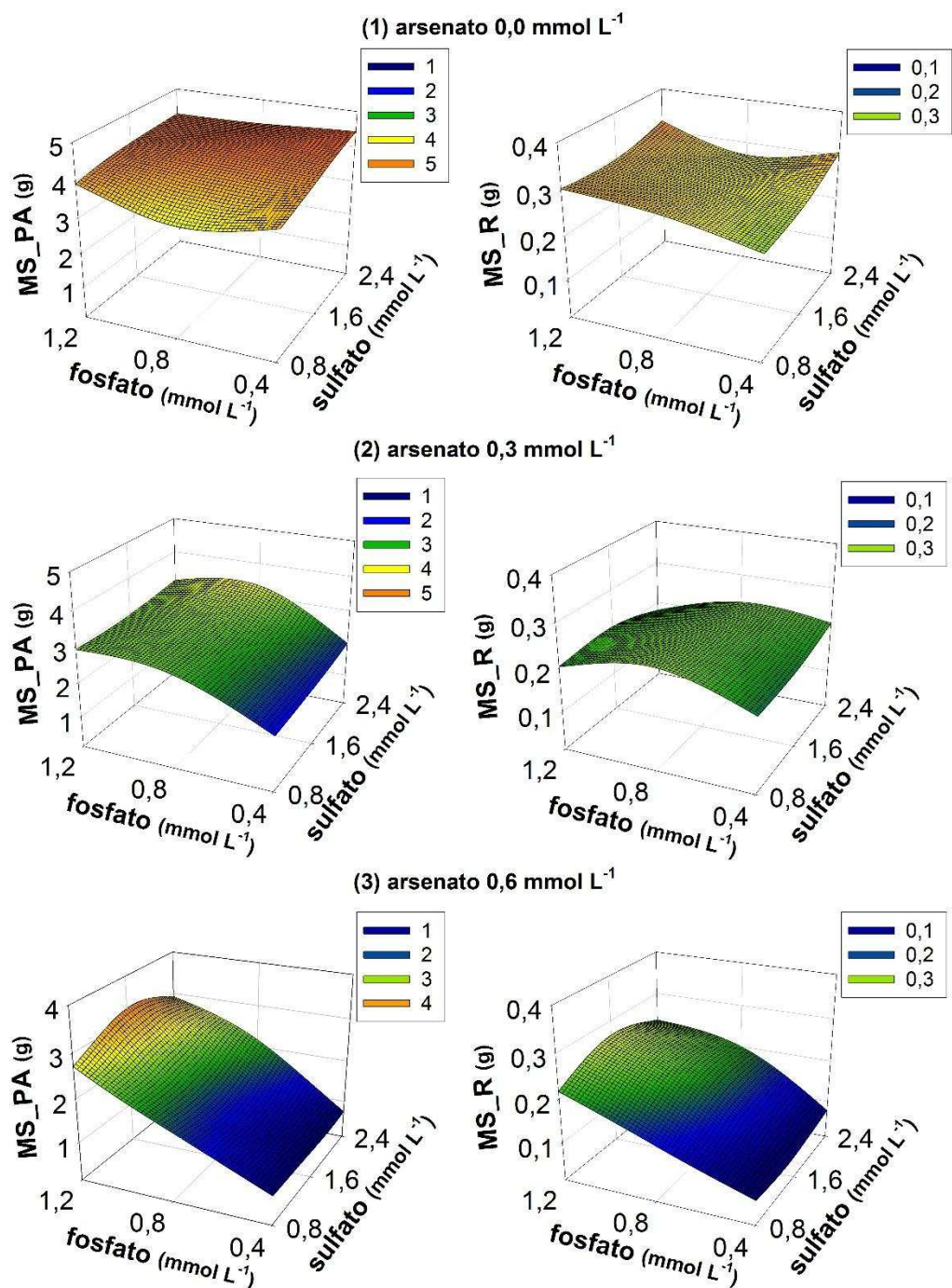
F.V.	G.L	QUADRADO MÉDIO				
		MS_R	AS_R	Cont. As_R	P_R	S_R
Bloco	2	0,01**	8,09 ^{n.s}	0,003 ^{n.s}	535742,89 ^{n.s}	5187,45 ^{n.s}
As	2	0,10**	105871**	1,74**	40454936**	2799646**
P	2	0,03**	27524,29**	0,11**	990624,53 ^{n.s}	131323,7**
S	2	0,002 ^{n.s}	1079,97**	0,03**	1258145 ^{n.s}	27001,97 ^{n.s}
AsxP	4	0,02**	15137,27**	0,08**	10298691**	325265,4**
AsxS	4	0,001 ^{n.s}	1154,94**	0,01*	919065 ^{n.s}	284593**
PxS	4	0,001 ^{n.s}	2433,44**	0,03**	1147045 ^{n.s}	182633,8**
AsxPxS	8	0,001 ^{n.s}	3149,97**	0,04**	2574006**	217528,3**
Resíduo	52	0,002	13,7	0,004	521321,9	9875,21
Média		0,22	1836	0,277	82971	27458
C.V (%)		36,04	117,1	73,25	57,74	43,38

* e ** significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.
^{n.s} não significativo.

A matéria seca de parte aérea (MS_PA) e de raiz (MS_R) foram significativamente afetadas pelas concentrações de fosfato e arsenato, sendo que o incremento das concentrações de arsenato resultou na redução da matéria seca das plantas (Figura 4). O dano radicular observado nas plantas (Figura 3) possivelmente comprometeu o processo de absorção de água e nutrientes pelas raízes.

Em contrapartida, o aumento das concentrações de fosfato em solução, dentro da mesma concentração de arsenato, favoreceu o crescimento das plantas. O arsenato ao ser absorvido pode substituir o fosfato em reações da via glicolítica, levando ao desacoplamento da fosforilação oxidativa e a produção de um éster-arsenato de ADP, um composto instável que sofre hidrólise não enzimática conhecida como arsenólise (Aposhian, 1989) e compromete todo o processo fotossintético. Dessa forma, não há produção de ATP e a planta é privada de sua fonte de energia, o que leva a redução no ganho de biomassa. Entretanto, apesar da semelhança química entre estes elementos, as proteínas transportadoras das raízes possuem maior afinidade pelo fosfato que pelo arsenato. Assim, o aumento das concentrações de fosfato em solução permite a redução da absorção do contaminante por favorecer a seletividade, atenuando os efeitos danosos do mesmo e explicando a significância observada na interação desses elementos (Tabela 1)

As doses crescentes de sulfato não alteraram a produção de biomassa das plantas de crambe. Plantas de arroz que foram expostas a níveis tóxicos de As apresentaram maior produção de biomassa quando cultivadas em altas concentrações de sulfato (Zhang, 2011).



(1) MS_PA= 2,87 - 1,14 P + 1,57**S + 1,04 P ² - 0,280 S ² - 0,299 PS	R ² = 0,7799
MS_R= 0,2722 - 0,039 P - 0,0201 S + 0,083 P ² + 0,0182 S ² - 0,0312 PS	R ² = 0,6399
(2) MS_PA= -0,628 + 7,39**P - 0,231 S - 3,58**P ² + 0,172 S ² - 0,120 PS	R ² = 0,7679
MS_R= 0,0148 + 0,462 P + 0,0465 S - 0,2431*P ² - 0,0035 S ² - 0,0443 PS	R ² = 0,4178
(3) MS_PA= -0,464 + 2,31**P + 0,237 S + 0,11 P ² - 0,078 S ² + 0,182 PS	R ² = 0,8882
MS_R= -0,1867 + 0,472**P + 0,114*S - 0,167*P ² - 0,0313 S ² + 0,0052 PS	R ² = 0,8994

Figura 4 – Matéria seca de parte aérea (MS_PA) e de raiz (MS_R) de plantas de *Crambe abyssinica* sob diferentes concentrações de arsênio em função das doses de fosfato e sulfato. * e ** significativo a 5 e 1 %, respectivamente pelo teste t.

Uma estratégia apresentada por diversas espécies para aumentar a tolerância ao arsênio é a redução da absorção de arsenato pela supressão de transportadores de fosfato de baixa afinidade (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002). Essa estratégia parece ser utilizada pelas plantas de *Crambe abyssinica*, uma vez que o aumento da disponibilidade de arsenato levou a redução nos teores de fósforo encontrados na parte aérea e nas raízes (Figura 5).

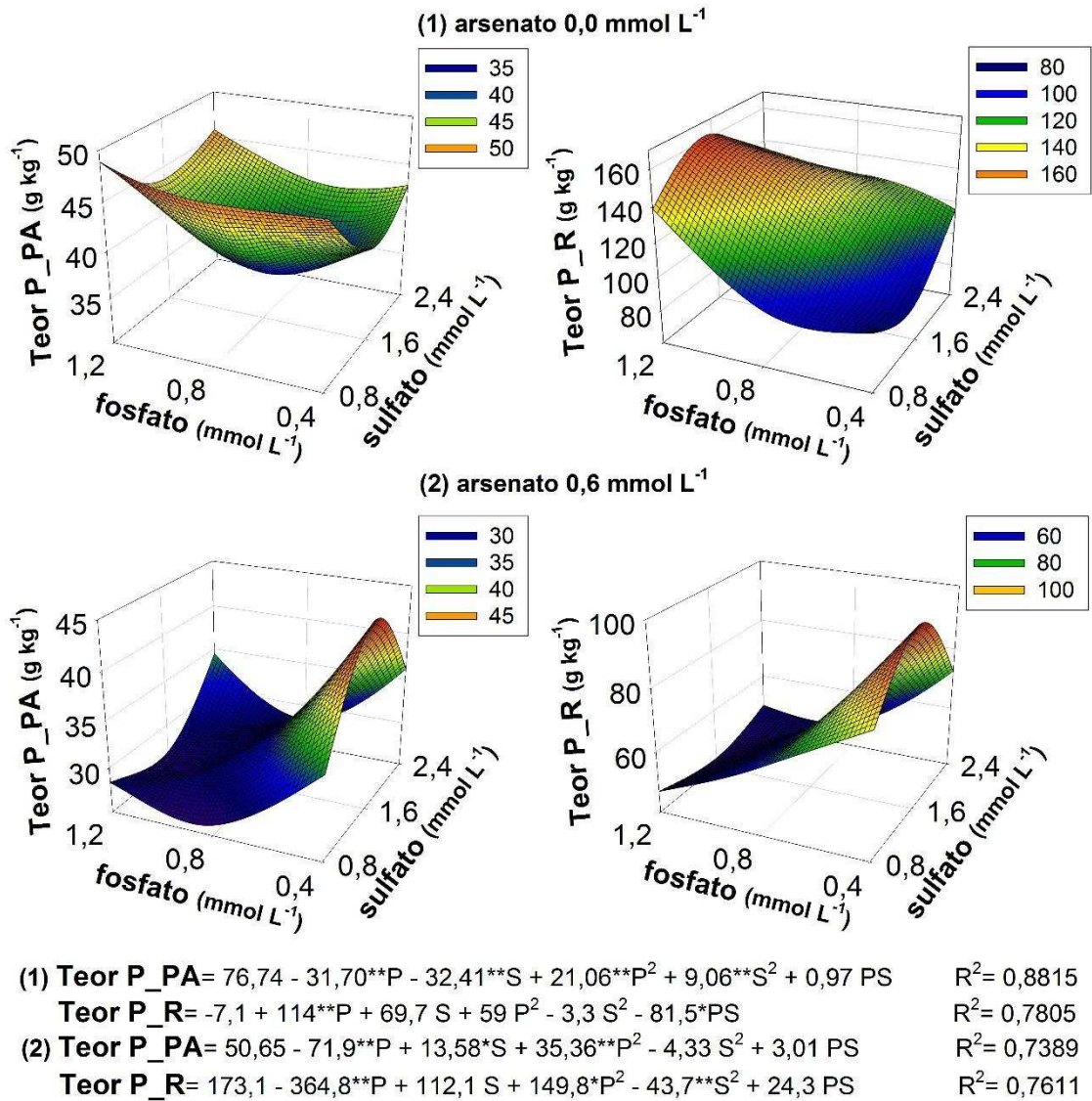
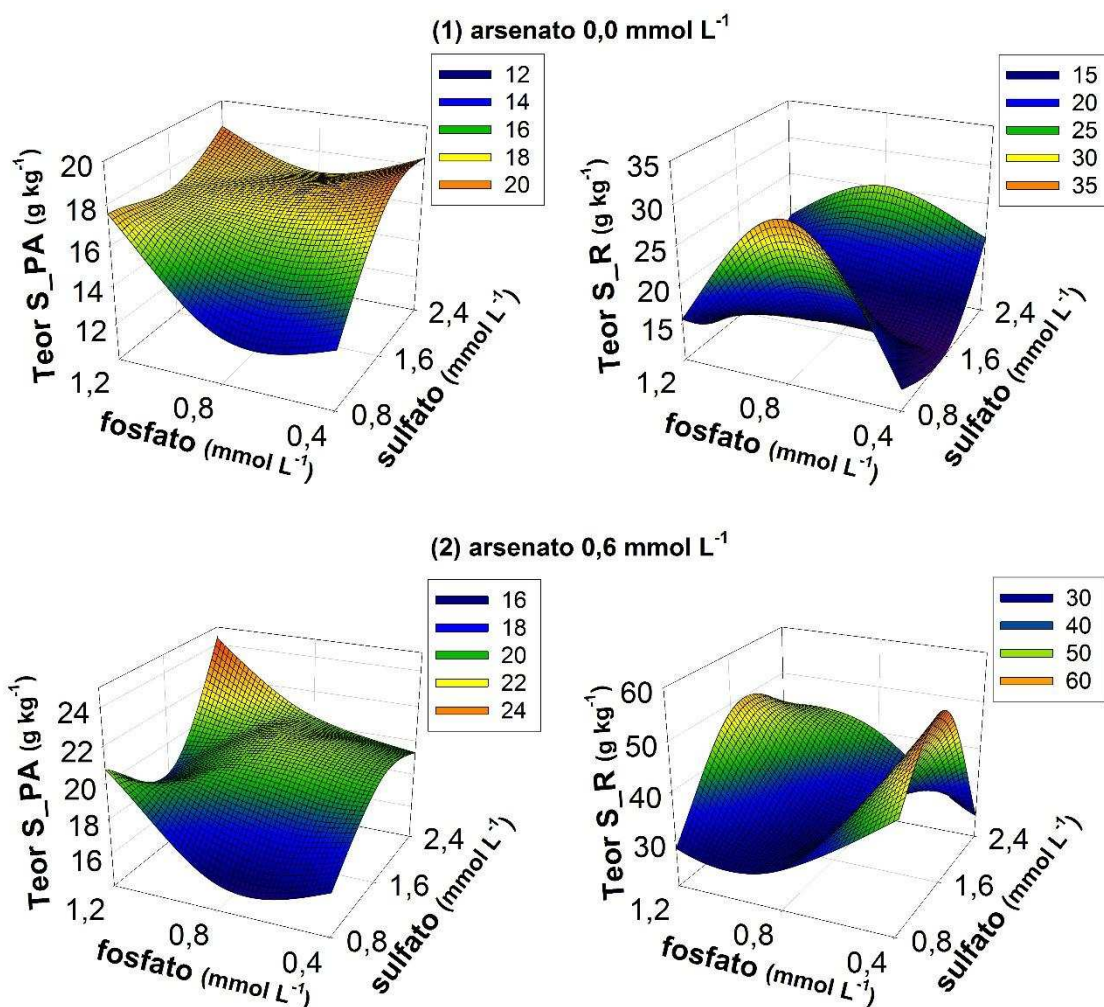


Figura 5 – Teores de P na parte aérea (P_PA) e na raiz (P_R) de plantas de *Crambe abyssinica* sob diferentes concentrações de arsênio em função de doses de fosfato e sulfato. * e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente pelo teste t.

A disponibilidade de fosfato interfere na expressão dos transportadores de fosfato de membrana das raízes (Davies et al., 2002; Mudge et al., 2002; Shin et al., 2004). Assim, quando a concentração de fósforo disponível está baixa as plantas são induzidas a ativarem outros transportadores de fosfato de alta afinidade para aumentar a eficiência de absorção deste nutriente. Esse comportamento explicaria o maior teor de fósforo observado nas plantas expostas ao arsênio na dose de 0,4 mmol L⁻¹ de fosfato.

Na dose de 0,6 mmol L⁻¹ de arsenato houve redução abrupta dos teores de fósforo das plantas, mesmo com o aumento das doses deste em solução (Figura 5). Os pêlos radiculares são a principal região de absorção de fosfatos da raiz, e tendo em vista o estresse oxidativo do arsênio nesta região, a planta fica impossibilitada de absorver o fosfato extra disponível (Fohse, 1991).

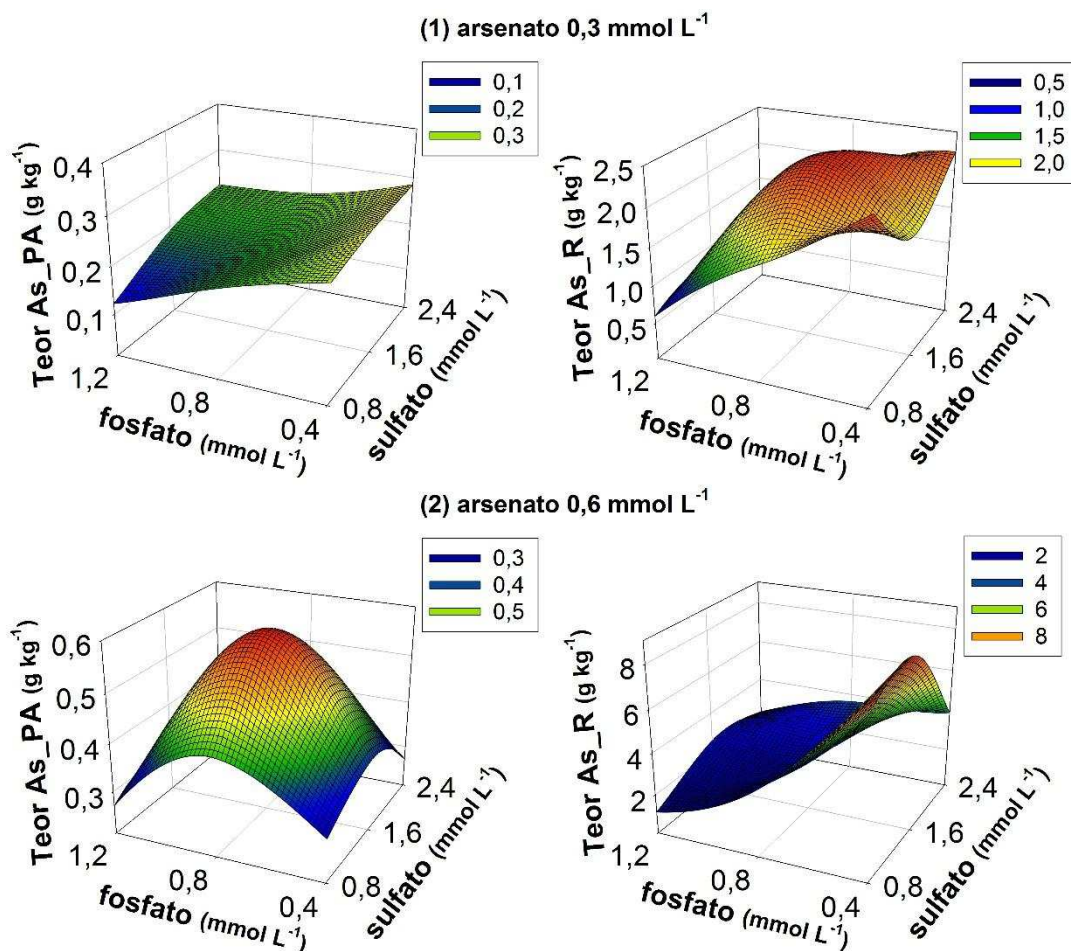
O arsenato ao ser absorvido é transformado em arsenito numa reação que produz diretamente peróxido de hidrogenio (Blecker et al., 2006). Assim, considera-se que a principal rota de desintoxicação por arsenio é a quelação do arsenito via ligantes contendo enxofre reduzido tais como glutatona e fitoquelatinas (Mishra et al., 2008). Esse mecanismo de defesa depende de grandes quantidades de enxofre, o que pode explicar os maiores teores de enxofre encontrados nos tecidos das plantas tratadas com arsenato (Figura 6).



(1) Teor S_PA = 9,81 - 10,11*P + 9,89**S + 10,53**P ² - 1,580*S ² - 3,258**PS	R ² = 0,8450
Teor S_R = 16,45 + 81,7 P - 42,84 S - 47,1**P ² + 14,56**S ² - 3,20 PS	R ² = 0,7385
(2) Teor S_PA = 17,44 - 7,65**P + 1,65**S + 6,08 P ² + 0,04 S ² + 0,69 PS	R ² = 0,6389
Teor S_R = 66,7 - 126,4 P + 26,9 S + 52,0*P ² - 14,40*S ² + 26,15**PS	R ² = 0,6211

Figura 6 – Teores de S na parte aérea (S_PA) e na raiz (S_R) de plantas de *Crambe abyssinica* sob diferentes concentrações de arsênio em função das doses de fosfato e sulfato. * e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste t.

Os maiores teores de enxofre (Figura 6) e de arsênio (Figura 7) encontrados nas raízes em relação a parte aérea indicam que as plantas de crambe retêm o As no sistema radicular. Esta é uma estratégia muito comum entre as plantas que toleram a presença deste metalóide. Nessa estratégia o As é complexado por fitoquelatinas e levado para o vacúolo celular ainda nas raízes, evitando o seu translocamento para a parte aérea.

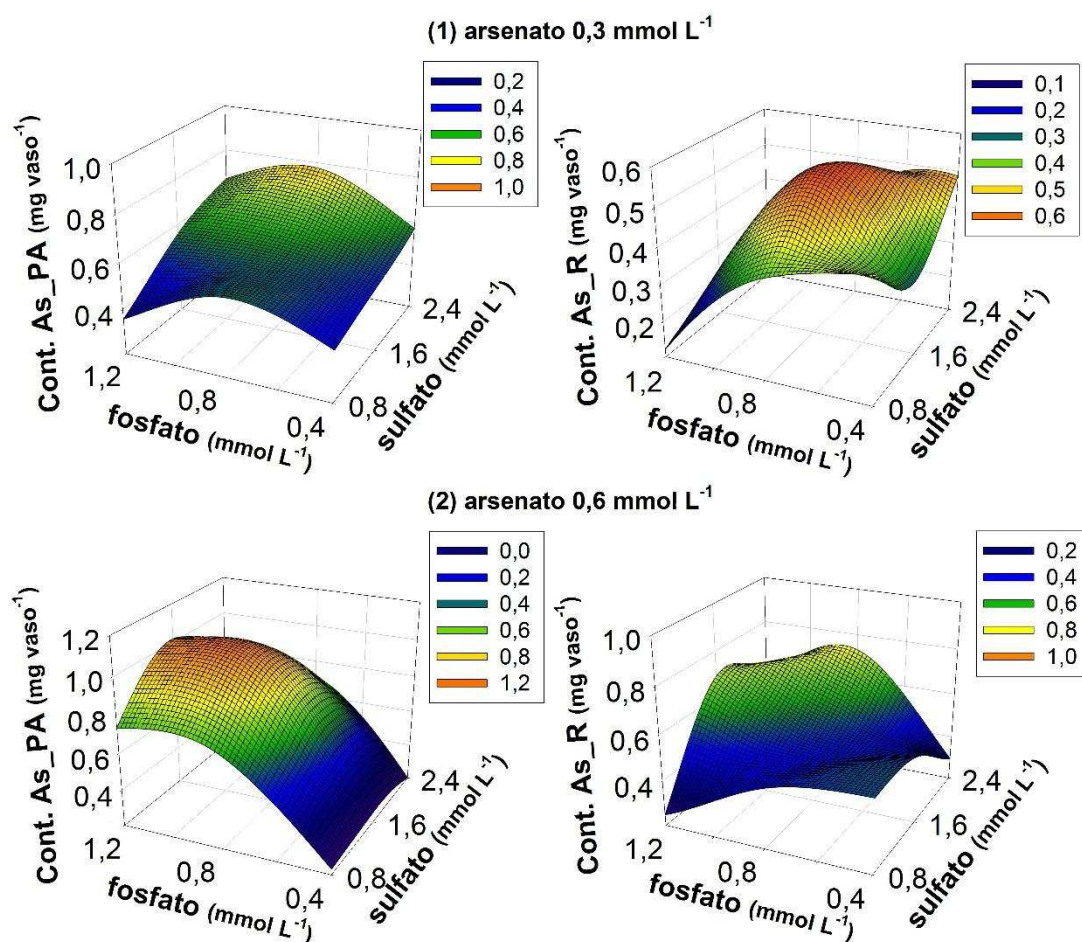


$$\begin{aligned}
 \text{(1) Teor As_PA} &= 0,3580 - 0,3405^{**}P + 0,0117^{**}S + 0,0898P^2 - 0,0055 S^2 + 0,0505^{**}PS & R^2 &= 0,9236 \\
 \text{Teor As_R} &= 1,404 + 2,58^{**}P + 0,127 S - 2,935^{**}P^2 - 0,088 S^2 + 0,279 PS & R^2 &= 0,8211 \\
 \text{(2) Teor As_PA} &= -0,457 + 1,465 P + 0,539 S - 0,948^{**}P^2 - 0,1788^{**}S^2 + 0,0054 PS & R^2 &= 0,8405 \\
 \text{Teor As_R} &= 15,77 - 23,84^{**}P + 0,22 S + 7,33^{**}P^2 - 1,213S^2 + 3,924^{**}PS & R^2 &= 0,9008
 \end{aligned}$$

Figura 7 – Teores de arsênio na parte aérea (S_PA) e na raiz (S_R) de plantas de *Crambe abyssinica* sob diferentes concentrações de arsênio em função das doses de fosfato e sulfato. * e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste t.

Ao analisar os teores de arsênio nas partes da planta (Figura 7) é notável o efeito do fosfato na redução destes teores. A maior disponibilidade de fósforo diminui a expressão de transportadores de membrana de baixa afinidade, a principal rota de absorção do arsenato (Meharg & Macnair, 1991; Zhu et al., 2006), reduzindo assim a absorção deste último. Estes resultados corroboram com os teores de fósforo encontrados nessas plantas, uma vez que este diminui com o aumento das doses de arsênio.

O conteúdo de arsênio, que expressa o que de fato foi absorvido pela planta, demonstrou que doses de fosfato maior que 0,8 mmol L⁻¹ reduz as quantidades de As acumulada, dentro da mesma dose de arsenato, e que as doses de sulfato utilizadas não levaram a grandes alterações desta variável (Figura 8).



(1) Cont. As_PA = 0,115 + 1,025 P - 0,045**S - 0,742**P ² + 0,0273 S ² + 0,1252 PS	R ² = 0,7990
Cont. As_R = -0,078 + 1,355**P + 0,131 S - 1,032**P ² - 0,0282 S ² - 0,0200 PS	R ² = 0,7446
(2) Cont. As_PA = -1,524 + 3,434**P + 0,987 S - 1,691**P ² - 0,3128**S ² + 0,009 PS	R ² = 0,8604
Cont. As_R = 0,167 + 0,479 P + 0,244 S - 0,654 P ² - 0,1541 S ² + 0,394**PS	R ² = 0,5203

Figura 8 – Conteúdo de arsênio na parte aérea (As_PA) e na raiz (As_R) de plantas de *Crambe abyssinica* sob diferentes concentrações de arsênio em função das doses de fosfato e sulfato.* e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste t.

Ao analisar o índice de translocação nos diferentes tratamentos foi possível observar relação direta desta variável somente com as doses de fosfato

aplicado. Foi detectado um valor mínimo de 29 %, nas plantas que receberam 0,6 mmol L⁻¹ de arsenato, quando foram tratadas com 0,4 mmol L⁻¹ de fosfato e 0,8 mmol L⁻¹ de sulfato e um máximo de 65 % quando foram tratadas com 1,2 mmol L⁻¹ de fosfato e 1,6 mmol L⁻¹ de sulfato. Esta alteração no índice de translocação é interessante do ponto de vista de recuperação, uma vez que o maior acúmulo do As na parte aérea permite a remoção deste da área por meio do corte da planta com possível inceneração.

CONCLUSÕES

Soluções contendo concentrações crescentes de fosfato reduziram os efeitos tóxicos de As em plantas de *Crambe abyssinica*, reduzindo o acúmulo de As em seus tecidos.

Doses crescentes de sulfato aumentam os teores de As encontrados nas raízes das plantas e, no geral, as concentrações utilizadas neste experimento não contribuíram para a redução da toxicidade do As.

Os resultados indicam que plantas de *Crambe abyssinica* impedem a translocação do arsênio para a parte aérea através de mecanismos que envolvem moléculas contendo enxofre em sua constituição.

CAPITULO 3

Trocas gasosas e fluorescência de clorofila α em *Crambe abyssinica* Hochst em diferentes concentrações de fosfato, sulfato e arsenato.

INTRODUÇÃO

No processo de recuperação de solos contaminados tem se dado preferência ao emprego de técnicas de remediação *in situ* em detrimento das técnicas *ex situ*, uma vez que esta última apresenta maiores riscos associados à manipulação do material.

Dentre as diversas técnicas *in situ* existentes, destaca-se a fitorremediação, que consiste no uso de plantas para remover contaminantes do ambiente e ou imobilizá-los em forma menos tóxicas (Salt et al., 1998; Pulford & Watson, 2003).

Um grande esforço é empregado na seleção de espécies adequadas para a fitorremediação de áreas contaminadas com arsênio. Entretanto, poucos trabalhos descrevem os efeitos reais do arsênio no metabolismo da planta. A maioria dos estudos analisa a sensibilidade das espécies a toxidez do arsênio por meio de sintomas visuais de toxidez e o acúmulo de biomassa, não se aprofundando em questões fisiológicas (Rahman et al., 2007; Stoeva et al., 2005; Sushant e Gosh, 2010)

Alguns estudos têm demonstrado que plantas cultivadas em solos contaminados podem apresentar alterações na biossíntese de clorofila, nas trocas gasosas e no processo fotossintético (Jain e Gadre, 1997; Stoeva et al., 2005; Rahman et al., 2007). Os danos fisiológicos causados pelo arsênio podem ser diretos, uma vez que o arsenato pode atuar como análogo não funcional do fósforo, interferindo em processos importantes como a fosforilação oxidativa (Whitaker, 2002) e as reações de enzimas que apresentam grupos sulfidrilas, perturbando assim o metabolismo celular (Rosen, 2002); ou indiretos através do comprometimento do sistema radicular e conseqüente menor absorção de nutrientes.

Os efeitos do arsênio sobre o aparato fotossintético das plantas podem variar de acordo com a espécie, com a concentração do metalóide (Silva et al., 2008) e dos outros nutrientes disponíveis no meio.

Na fase fotoquímica da fotossíntese, o arsênio pode: interferir na cadeia transportadora de elétrons, levando a redução do poder redutor (NADPH) e ATP (Paivoke & Simola, 2001); e ocasionar o aumento da emissão de fluorescência ou liberação de energia na forma de calor. Já na fase bioquímica o arsênio pode afetar a condutância estomática e a atuação da enzima rubisco (ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase).

Plantas de feijão-guandu (*Cajanus cajan*), aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*) e cordão de frade (*Borreria verticillata*) submetidas ao As apresentaram respostas distintas em função da espécie e da concentração de As aplicada. Em *C. cajan*, tanto as trocas gasosas quanto a fluorescência de clorofila α foram afetadas quando as plantas foram expostas a 0,5 mg L⁻¹ de arsênio e que, em contrapartida, em *B. verticillata* doses de 10 mg L⁻¹ não alteraram a fluorescência da clorofila (Silva, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do arsênio na fluorescência de clorofila α e nas trocas gasosas de plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas em soluções nutritivas contendo diferentes concentrações de fosfato, sulfato e arsenato.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Crambe abyssinica* Hochst, cedidas pela Fundação Mato Grosso, foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 3 % por 10 min., lavadas em água corrente e colocadas para germinar em sementeiras contendo o substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças. Após dez dias, quando a primeira folha verdadeira surgiu, as plantas foram transplantadas para meio hidropônico em vasos de 2,5 dm³ sob aeração forçada. Nesta etapa as plantas foram aclimatadas, durante duas semanas, em solução nutritiva de Hoogland & Arnon (1950), pH 6, em meia força (metade da concentração), com 0,4 mmol L⁻¹ de fosforo e 0,8 mmol L⁻¹ de enxofre.

Após esse período, aumentou-se a concentração da solução para uma força, mantendo a aeração e o pH em 6, e aplicou-se os tratamentos que consistiram em três concentrações de fosfato (0,4; 0,8; 1,2 mmol L⁻¹), sulfato

(0,8; 1,6; 2,4 mmol L⁻¹) e arsenato (0,0; 0,3; 0,6 mmol L⁻¹); fornecidos nas formas de ácido fosfórico (H₃PO₄), ácido sulfúrico (H₂SO₄) e arsenato de sódio (Na₂HAsO₄+7H₂O), respectivamente, sendo a condutividade elétrica da solução ajustada para 3,1 mS cm⁻¹, com NaCl, em todos os tratamentos. A solução nutritiva foi renovada a cada semana e o pH do meio corrigido todos os dias com NaOH e HCl 0,5 mol L⁻¹. O experimento foi montado em esquema fatorial 3 x 3 x 3, em delineamento de blocos casualizados com três repetições e duas plantas por vaso.

Duas semanas após a aplicação dos tratamentos realizou-se, simultaneamente, a leitura dos parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência de clorofila α , com o auxílio de um sistema de medição de trocas gasosas portátil (LI-6400XT, Li-Cor Inc., Lincoln, NE) equipado com uma câmara de fluorescência (LI-6400-40; Li-Cor Inc.).

A taxa fotossintética (A, $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a condutância estomática (gs, $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a concentração interna de CO₂ (C_i, $\mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$) e a taxa transpiratória (E, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) foram medidas no último par de folhas completamente expandido das plantas entre 09:00 e 11:00 h da manhã, período em que a taxa de assimilação líquida de carbono está em seu máximo sob radiação artificial (PAR = 1200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no n\u00edvel da folha, a 400 $\mu\text{mol de CO}_2$ atmosf\u00e9rico). Todas as medi\u00e7\u00f5es foram realizadas a 25 °C e a diferen\u00e7a de press\u00e3o de vapor foi mantida a aproximadamente 1,0 kPa, ao passo que a quantidade de luz azul foi ajustada para 10 % da densidade de fluxo dos f\u00f3tons (DFF) para otimizar a abertura dos est\u00f4matos (Maxwell & Johnson, 2000).

Folhas previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos foram iluminadas com uma luz vermelha modulada de baixa intensidade (0,03 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para a obten\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia m\u00ednima (F₀) e em seguida, pulsos saturantes de luz branca de 8000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foram aplicados por 0,8 segundo para assegurar a emiss\u00e3o de fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m). A partir destes par\u00e2metros calculou-se o rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) pela seguinte equa\u00e7\u00e3o (Maxwell & Johnson, 2000):

$$F_v/F_m = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

Os valores das variáveis dependentes de fluorescência de clorofila α (F_0 , F_m e F_v/F_m) e de trocas gasosas (A , g_s , C_i e E) foram submetidos a análise de variância e seus efeitos desdobrados por meio de análise de regressão, a 5 % de significância, para obtenção de superfícies de resposta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos estudados não causaram alterações significativas nos parâmetros de fluorescência de clorofila α analisados (Tabela 1). Entretanto, a maior fluorescência mínima, $F_0 = 403,86$, foi observada nas plantas que receberam $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato, $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato e $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de sulfato, associada a um rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) de 0,82. F_0 é a fluorescência quando a quinona, receptora primária de elétrons do fotossistema II, está totalmente oxidada e o centro de reação está aberto, situação iminente à ativação das reações fotoquímicas (Mouget & Tremblin, 2002). Segundo Baker (2008), seu aumento pode ser consequência de alterações no centro de reação do fotossistema II ou da redução da capacidade de transferência da energia de excitação da antena para o centro de reação, evidenciando assim, mesmo na ausência de significância, o maior estresse das plantas submetidas a este tratamento.

Os resultados de fluorescência indicam que não existe um dano real sobre o aparato fotoquímico de plantas de *C. abyssinica* submetidas ao arsênio. As pequenas alterações observadas parecem estar associada a uma fotoinibição reversível, uma vez que a relação F_v/F_m ficou entorno de 0,8, valor considerado ótimo para a maioria das plantas (Maxwell & Johnson, 2000).

Tabela 1 - Análise de variância referente a fluorescência mínima (F_0), fluorescência máxima (F_m), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO_2 (C_i) e taxa transpiratória (E) de plantas de *Crambe abyssinica* sob solução nutritiva com diferentes concentrações de arsenato, fosfato e sulfato

F.V	Quadrado Médio						
	F_0	F_m	F_v/F_m	A	gs	C_i	E
Bloco	9965,95**	899,39 ^{n.s}	0,0021**	134,67**	0,028*	8154,46**	3,57 ^{n.s}
As	453,35 ^{n.s}	21675,49 ^{n.s}	0,0002 ^{n.s}	652,83**	0,362**	15510,64**	206,02**
P	1440,49 ^{n.s}	778,59 ^{n.s}	0,0003 ^{n.s}	467,56**	0,114**	1407,77 ^{n.s}	88,26**
S	2385,49 ^{n.s}	3467,24 ^{n.s}	0,0005 ^{n.s}	10,43 ^{n.s}	0,003 ^{n.s}	579,54 ^{n.s}	1,52 ^{n.s}
AsxP	3192,32 ^{n.s}	3199,18 ^{n.s}	0,0008 ^{n.s}	261,63**	0,041**	3948,79**	30,98**
AsxS	97,12 ^{n.s}	982,72 ^{n.s}	0,0001 ^{n.s}	7,23 ^{n.s}	0,006 ^{n.s}	937,96 ^{n.s}	3,70 ^{n.s}
PxS	2256,65 ^{n.s}	4543,87 ^{n.s}	0,0005 ^{n.s}	6,87 ^{n.s}	0,003 ^{n.s}	240,83 ^{n.s}	1,07 ^{n.s}
AsxPxS	587,49 ^{n.s}	2543,53 ^{n.s}	0,0001 ^{n.s}	5,47 ^{n.s}	0,002 ^{n.s}	316,01 ^{n.s}	1,71 ^{n.s}
Resíduo	1973,91	2858,31	0,00034	16,19	0,007	919,24	3,58
Média	367,04	2319,43	0,84	19,32	0,28	242,21	7,52
C.V (%)	12,10	2,45	2,27	38,91	49,88	16,13	45,62

* e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste F. ^{n.s} não significativo.

Em relação às trocas gasosas, pôde se observar um efeito altamente significativo ($p < 0,01$) do arsenato e do fosfato em todas as variáveis, o que não ocorreu com o sulfato (Tabela 1).

A espécie *Eleocharis acutangula* não apresentou alterações significativas na taxa respiratória (E) em resposta a diferentes doses de fosforo (Silva et al.2013). Contudo, para plantas de crambe tratadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato em diferentes concentrações de fosfato este comportamento foi diferente. Os resultados obtidos mostram que o fosfato apresenta papel importante na taxa transpiratória de plantas cultivadas na presença de As, uma vez que está reduziu drasticamente nas plantas que foram tratadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato e que, na mesma dose de arsenato, a dose de $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato elevou a taxa transpiratória a um valor próximo daquele observado no tratamento controle (Figura 1).

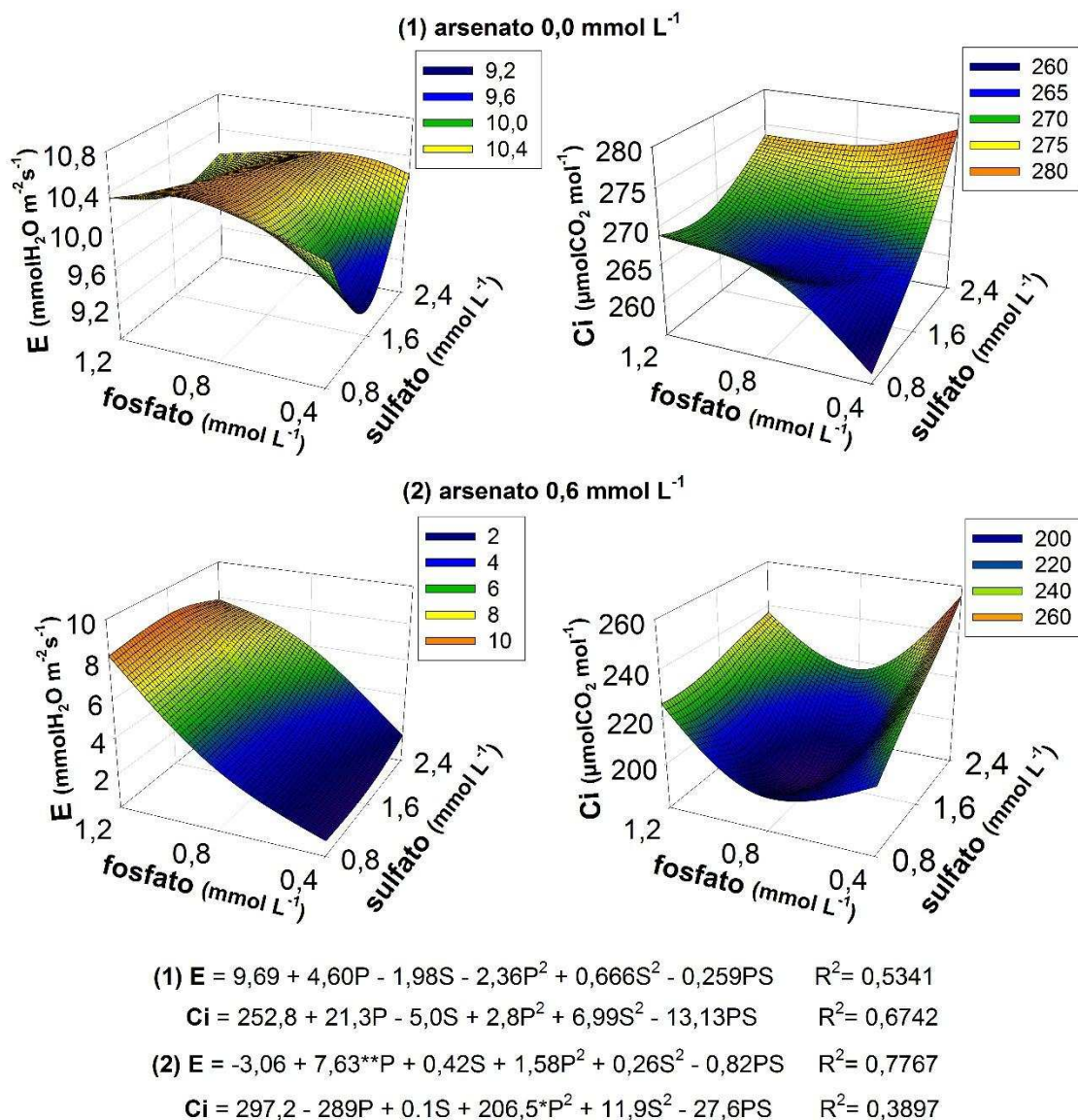


Figura 1 – Taxa transpiratória (E) e concentração interna de CO₂ (Ci) de plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de arsenato, fosfato e sulfato. * e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste t.

As plantas na presença de arsênio, quando comparadas ao tratamento controle, apresentaram redução na concentração interna de CO₂ (Ci) em todas os tratamentos (Figura 1). A Ci varia em função da demanda de CO₂ no mesófilo (Mott, 1998) e, segundo Silva (2008), reduções nesta variável estão associadas a aumento da taxa fotossintética (A) ou reduções na condutância estomática (gs), o que de fato aconteceu (Figura 2).

O controle da perda de água pelo limbo foliar é realizado pelo fechamento estomático, sendo este um processo de resposta instantânea ao estresse (Lawlor & Cornic, 2002). Assim, as reduções da condutância estomática já eram esperados devido aos danos radiculares causados pelo estresse oxidativo do arsênio (Canatto, 2013; Singh et al., 2007; Barbosa et al., 2009). Da mesma forma, o aumento de E e gs com o aumento das doses de fosfato podem estar correlacionados com a diminuição da toxicidade do arsenato nestes tratamentos, como foi observado por Palma (2013).

Dentro da planta, embora o arsenato possa substituir o fosfato em diversas reações, ele não é capaz de desempenhar suas funções metabólicas (Shri et al., 2009). É o que ocorre, por exemplo, na fosforilação oxidativa, em que o arsenato desloca o fosfato na síntese de ATP, diminuindo a produção de energia na planta (Terwelle & Slater, 1967, Ullrich-Eberius et al., 1989). Assim, o aumento na taxa fotossintética das plantas tratadas com 0,6 mmol L⁻¹ de arsenato na dose de 1,2 mmol L de fosfato (Figura 2) pode se configurar em uma estratégia da planta para aumentar a produção energética e superar o estresse oxidativo causado pelo arsênio em seu metabolismo. Não obstante, este aumento na taxa fotossintética, se apresenta como um bom fundamentador fisiológico para explicar os efeitos benéficos do fosfato na fitotoxicidade de arsênio observado em diversos trabalhos encontrados na literatura (Tu & Ma, 2003; Silva et al., 2009).

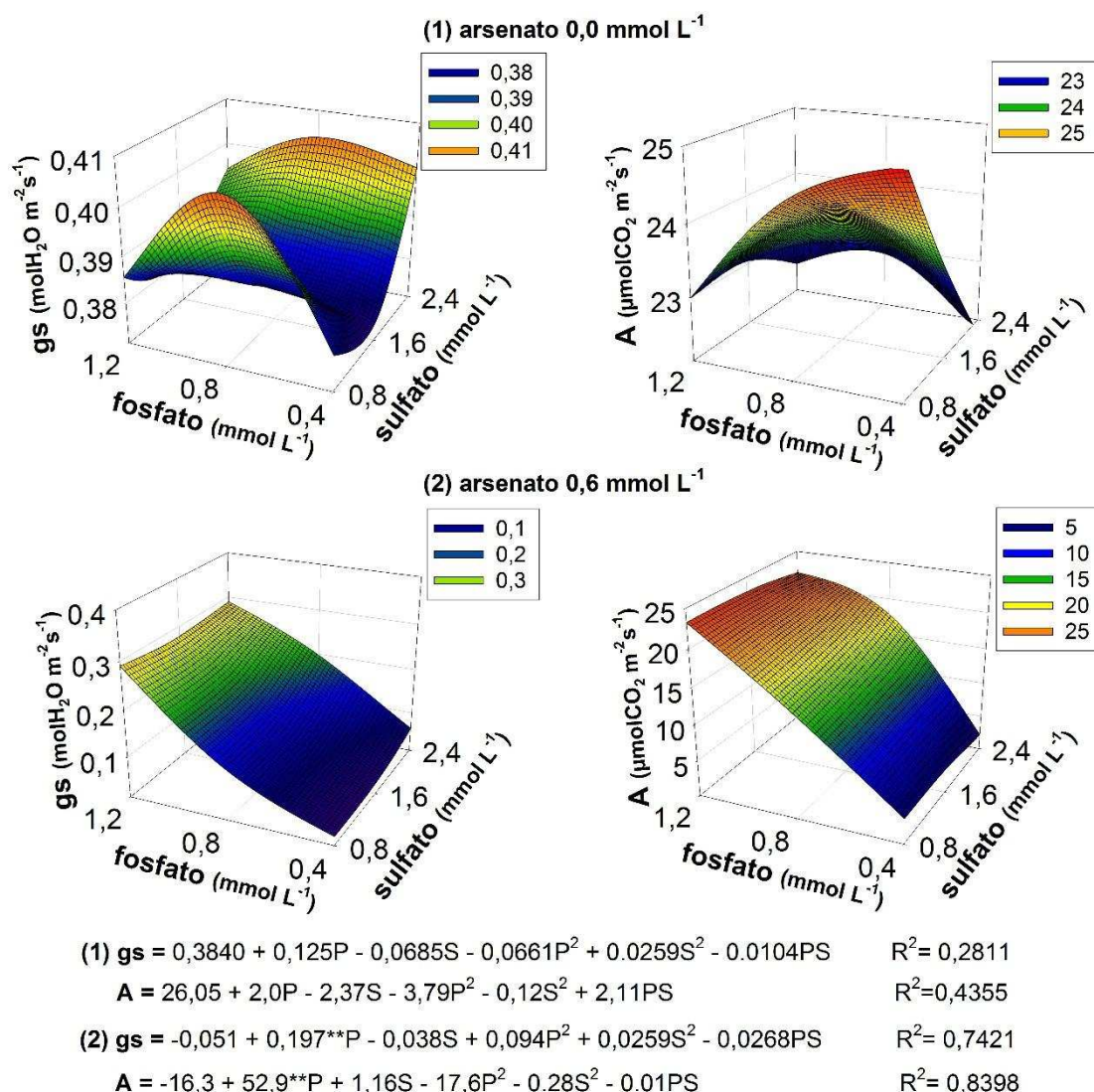


Figura 2- Condutância estomática (gs) e taxa fotossintética (A) de plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de arsenato, fosfato e sulfato. * e ** significativo a 5 e 1 %, respectivamente, pelo teste t.

O fato do arsênio não ter afetado significativamente os parâmetros de fluorescência da clorofila α , somado às alterações observadas nas trocas gasosas, indicam que os efeitos deste metalóide em *C. abyssinica* estão correlacionados, principalmente, com distúrbios na entrada e no transporte de água e nutrientes causados pelas alterações no sistema radicular provocadas pelo arsênio.

CONCLUSÕES

As diferentes concentrações de arsenato, fosfato e sulfato aplicadas às soluções de cultivo de *Crambe abyssinica* não afetaram a fluorescência mínima, fluorescência máxima e o rendimento quântico potencial do fotossistema II das plantas. Isto indica que a toxicidade de arsênio à esta espécie está correlacionada, principalmente com os distúrbios na captação e no transporte de água e nutrientes pelo sistema radicular.

A suplementação das plantas com até 2,4 mmol L⁻¹ de sulfato não reduziu os danos provocados pelo arsênio nas trocas gasosas de *Crambe abyssinica*.

Doses crescentes de fosfato reduziram o efeito fitotóxico do arsênio em plantas de *C. abyssinica* e o principal efeito fisiológico observado, foi o aumento da taxa fotossintética.

CONCLUSÕES GERAIS

Os teores elevados de arsênio nas raízes de *Crambe abyssinica*, indicam que ela pode ser eficaz no processo de fitoestabilização de áreas contaminadas com arsênio.

A toxicidade do arsênio em *C. abyssinica* está correlacionada, principalmente, com os distúrbios na captação e no transporte de água e nutrientes do sistema radicular.

Doses crescentes de fosfato reduziram o efeito fitotóxico de arsênio em plantas de *C. abyssinica* e o principal efeito fisiológico observado, foi o aumento da taxa fotossintética.

Doses crescentes de sulfato aumentaram os teores de As encontrados nas raízes das plantas e, no geral, as doses utilizadas neste experimento não contribuíram para a redução da toxicidade do As.

LITERATURA CITADA

ABICHEQUER, A.D., & BOHNEN, H., Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v.22, p.21-26, 1998

ADAMS, P., Nutrition of greenhouse vegetables in NFT na hydroponic systems. **Acta Hortic.**, Wageningen, n. 361, p. 254-257, 1994

APOSHIAN, H., Biochemical toxicology of arsenic. **Rev. Biochem. Toxicol.**, v. 10, p.265, 1989.

ASHER, C. J.; REAY, P. F., Arsenic uptake by barley seedlings. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 6, p. 459-466, 1979.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 621 p., 2002.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.

BARBOSA, A. P. **Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 62 p., 2009.

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

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R; CAVALCANTI, J. A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **Rev. Esc. Minas**, vol.57, 2004.

BORBA, R.P., FIGUEIREDO, B.R., RAWLLINS, B.G., MATSCHULLAT, J. Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais state, Brasil. **Revista Brasileira de Geociências**, v.30, n.3, p.554-557, 2000.

BUNDSCHUH, J. et al. Distribución de arsénico en la región sudamericana. In: BUNDSCHUH, J.; CARRERA, A. P.; LITTER M. (Ed.). **Distribución del arsénico en las regiones ibérica e iberoamericana**. Buenos Aires: CYTED, p. 137- 186, 2008.

CANATTO, R.A. **Toxicidade do Arsênio: Respostas Bioquímicas, Fisiológicas e Estruturais em *Landoltia punctata* (G.Mey.) Les & D.J. (Lemnaceae)**, Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal: Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 31p, 2013.

CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; BURLO, F.; MATAIX BENEYTO, J. Effect of arsenite on the concentrations of micronutrients in tomato plants grown in hydroponic culture. **J. Plant Nutrit.**, v. 17, p. 1887-1903, 1994.

CASTELLANE, P.D.; ARAÚJO, J.A.C. de. **Cultivo sem solo: hidroponia**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 1995.

CHANG, A.C.; HINESLY, T.D.; BATES, T.E.; DONER, H.E.; DOWDY, R.H.; RYAN, J.A. Effects of long-term sludge application on accumulation of trace elements by crops. In: PAGE, A.L.; LOGAN, T.G.; RYAN, J.A. **Land application of sludge**. Chelsea: Lewis Publishers, p.53-66, 1987.

CHOUHDURY, B.; CHOWDHURY, S.; BISWAS, A. K. Regulation of growth and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) by arsenic and its possible reversal by phosphate. **Journal of Plant Interactions**, v.6: p. 15-24, 2010.

CIPRIANI, H. N. **Respostas morfofisiológicas de plantas de plantas de *Acacia mangium* Willd. e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth., inoculadas com rizóbio e micorriza arbuscular, sob efeito de arsênio**, Dissertação de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 68 p., 2011.

CLARK, J. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, p.458-460, 1975

COSTA, A.C., **Bases fisiológicas da ação do arsênio em algumas espécies de cerrado**. Tese de doutorado em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 78p. 2007.

CRAVO, M. S.; BRAGA, J. M.; AMARAL, F.A.L & ALVAREZ V., V. H. Efeitos da interação fosforo x enxofre sobre a produção da matéria seca e sobre os níveis críticos de P e S no solo e em plantas de soja (*Glycine max L.*) em solos com e sem calagem. **R. Ceres**, 32, p.12-30, 1985.

CULLEN, W.R., REIMER, K.J., Arsenic speciation in the environment. **Chemical Reviews** 89, p. 713–764, 1989.

DAVIES T.G.E., YING J., XU Q., LI Z.S., LI J., GORDON-WEEKS R. Expression analysis of putative high-affinity phosphate transporters in Chinese winter wheats. **Plant Cell Environ** 25: 1325-1339, 2002.

DESCHAMPS, E. & MATSULLAT, J. Arsênio antropogênico e natural. **Um estudo em regiões do quadrilátero ferrífero**. 1ed. Fundação Estadual do meio ambiente. Belo Horizonte. 330p, 2007.

FERRECCIO, C., SANCHA, A.M., Arsenic exposure and its impact on health in Chile. **Journal of Health, Population and Nutrition**. 24, p.164-175, 2006.

FÖHSE, D.; CLAASSEN, N.; JUNGK, A. Phosphorus efficiency of plants. II. Significance of root radius, root hairs and cation-anion balance for phosphorus influx in seven plant species. **Plant and Soil**, v. 132, p. 261-272, 1991.

FRANCESCONI, K. et al. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: A potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 284, p. 27-35, 2002

FRENCH, C. J.; DICKINSON, N. M.; PUTWAIN, P. D. Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 387-395, 2006

FURLANI, P.R. **Cultivo hidropônico de plantas**. Campinas: IAC, 52 p, 1999. (Boletim Técnico, 180)

GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Rev. bras. Bot.**, São Paulo, 34(4), 2011

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

GROSSL, P. R.; MATTHEW, J. E.; GRAFE, M. Biogeochemistry of arsenic in iron oxide systems. In: SUPERSOIL, 3, University of Sydney, 2004 CD-ROM.

HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I., . The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, 347(1), p:1-39. 1950,

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

KING, D. J. et al. Phytostabilisation of arsenical gold mine tailings using four *Eucalyptus* species: Growth, arsenic uptake and availability after five years. **Science of the Total Environment**, v. 406, p. 35-42, 2008.

KNUDSON, J.A.; MEIKLE, T.; DELUCA, T. H. Role of mycorrhizal fungi and phosphorus in the arsenic tolerance of basin wildrye. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 2001–2006, 2003.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G., Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell Environ.**, 25, p. 275- 294, 2002.

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

MA, L. Q.; KOMAR, K. M.; TU, C.; ZHANG, W.; CAI, Y.; KENNELLEY, E. D. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature**, v. 409, n. 6820, p. 579, 2001

MACHADO, M. F.; BRASIL, A. N.; OLIVEIRA, L. S.; NUNES, D. L. Estudo do crambe (*Crambe abyssinica*) como fonte de óleo para produção de biodiesel. **ENERBIO, Grupo de Pesquisa em Energias Renováveis**, UIT, Itaúna / MG. 2007.

MADEJÓN, P. et al. White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. **Environmental Pollution**, v. 132, p. 145-155, 2004.

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

MASSCHELEYN, P. H.; DELAUNE, R. D.; PATRICK, W. H. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. **Environental Science & Technology**, v. 25, p. 1414-1419, 1991.

MAXWELL, K., AND JOHNSON, G. N., Chlorophyll fluorescence a practical guide. **J. Exp. Bot.** 51, p. 659-668, 2000.

MEHARG, A. A.; MACNAIR, M. R. The mechanisms of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv and *Agrostis capillaris* L. **New Phytologist**, v. 119, p. 291-297, 1991.

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

MELLO, J. W. V. de; DIAS, L. E.; CORREA, M. L. T. Drenagem ácida: avaliação do potencial de ocorrência, mitigação e revegetação de substratos sulfetados. In: CURI, N. et al. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. v. 3, p. 401-430, 2003.

MELO, R. F. et al. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 455-465, 2009;

MELO, R. F. **Potencial de espécies vegetais para fitorremediação de um solo contaminado por arsênio**, Tese de Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 107 p, 2006.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TIPATHI, R.D.; TRIVEDI, P.K.; Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. **Aquatic Toxicology** 86, p.205 - 215, 2008.

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

MOUGET, J.; TREMBLIN, G. Suitability of the fluorescence monitoring system (FMS, Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. **Aquatic Botany**, v.74, p.219-231, 2002.

MUDGE S.R., RAE A.L., DIATLOFF E., SMITH F.W., Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. **Plant Journal** 31, p. 341-353, 2002.

NASCIMENTO, C.W.A. & XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia. Agricola**.63, p. 299-311, 2006.

OLIVEIRA, L. M. **Potencial de samambaias para fitorremediação de arsênio**. Tese de doutorado em Ciência do Solo - Universidade Federal de Lavras, 116 p. 2012.

PAIVOKÉ, A. E. A.; SIMOLA, L. K. Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, n.2, p. 111-121, 2001.

PALMA, J. M.; GUPTA, D. K.; CORPAS, F. J. Heavy Metal Stress in Plants. Berlin, Heidelberg: **Springer Berlin Heidelberg**, 2013.

PULFORD, I.D., WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. **Environment International**, v.29, p. 529-540, 2003.

RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H.; RAHMAN, M. M.; ISLAM, M. N.; MIAH, M. A. M.; TASMEN, A. Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five

widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. **Chemosphere**, 67(1), p. 1072-1079, 2007.

REEVES, R.D. Hyperaccumulation of trace elements by plants. in: MOREL, J.L., ECHEVARRIA, G, GONCHAROVA, N. (eds). Phytoremediation of metal-contaminated soils. **Earth and environmental sciences** 68, p. 1–25, 2006

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

SALIDO, A., HASTY, K.L., LIM, J., AND BUTCHER, D.J Phytoremediation of arsenic and lead in: contaminated soil using Chinese brake ferns (*Pteris vittata*) and Indian mustard (*Brassica juncea*). **Int. J. Phytoremed.** 5, p. 89–103, 2003

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 643-668, 1998

SANTOS, J. A. G. et al. Timing of phosphate application affects arsenic phytoextraction by *Pteris vittata* L. of different ages. **Environmental Pollution**, v. 154, p. 306-311, 2008.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 1, n. 3, p. 231-233, 1975

SHIN H., SHIN H.S., DEWBRE G.R., HARRISON M.J., Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. **Plant Journal** 39, p. 629-642, 2004

SHRI, M., KUMAR S., CHAKRABARTY D., TRIVEDI P.K., MALLICK S., MISRA P., SHUKLA D., MISHRA S., SRIVASTAVA S., TRIPATHI R.D., TULI R., Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 72, p.1102-1110, 2009.

SILVA, G. R.N., PEREIRA, J.F., PEREIRA, M.P., RODRIGUES, L.C.A., FERREIRA, A. C., CASTRO, E.M. Diferentes concentrações de fósforo nas trocas gasosas do colmo de *Eleocharis acutangula* (Roxb.) Schult. **Anais do Congresso Nacional de Botânica**, 2013.

SILVA, K.L.F. **Avaliações de Biomarcadores Anatômicos e Fisiológicos em Plantas Expostas ao Arsênio**, Tese de Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 97p, 2008.

SILVA, W. G. P. da; AMARAL SOBRINHO, N. M. B. do; MAZUR, N. Uso de fosfato para remoção de arsênio de solo contaminado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 101–106, 2009.

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

SINGH, N., MA, L.Q., SRIVASTAVA, M., RATHINASABAPATHI, B., Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. **Plant Sci.** 170, p. 274-248, 2006.

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

STOEVA, N., BINEVA, T., Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. **Bulgarian J. Agric. Sci.** 29, p. 87-85, 2003.

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

SUSHANT KS, GHOSH AK., Effect of Arsenic on Photosynthesis, Growth and its Accumulation in the Tissues of *Allium cepa* (Onion). **Intern. J. Environ. Eng. Manag.** 1, p. 39-50, 2010.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 147p, 1995.

TEIXEIRA, N.T. **Hidroponia: Uma alternativa para pequenas áreas**. Guaíba: Agropecuária, 1996

TERWELLE H.F., SLATER E.C., Uncoupling of respiratory chain phosphorylation by arsenate. **Biochimica et Biophysica Acta** 143, p. 1-17, 1967.

TLUSTOŠ, P. Variation in the uptake of arsenic, cadmium, lead, and zinc by different species of willows *Salix spp.* grown in contaminated soils. **Central European Journal of Biology**, v. 2, p. 254-275, 2007;

TU, C.; MA, L.Q. Effects of arsenate and phosphate on their accumulation by an arsenic-hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Plant Soil**, v. 249, p. 373-382, 2003.

ULLRICH-EBERIUS C. I., SANZ A., NOVACKY J., Evaluation of arsenate and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. **Journal Experimental Botany** 40, p.119-128, 1989.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. **Arsenic Treatment Technologies for Soil, Waste, and Water**, 132 p, 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/tio/download/remed/542r02004/arsenic_report.pdf>. Acesso em: 18 junho 2014.

VAZQUEZ, S. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. **Water, Air e Soil Pollution**, v. 177, p. 349–365, 2006;

VISOOTTIVISETH, P.; FRANCESCONI, K.; SRIDOKCHANA, W. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. **Environ. Pollut.**, v. 118, p. 453-461, 2002.

VOISIN, A. **Adubos - Novas leis científicas de sua aplicação**. São Paulo, Mestre Jou, 130 p, 1973.

WANG, J. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*: Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1552-1561, 2002.

WHITING, S.N., REEVES, R.D., RICHARDS, D., JOHNSON, M.S., COOKE, J.A., MALAISSE, F., PATON, A., SMITH, J.A.C., ANGLE, J.S., CHANEY, R.L., GINOCCHIO, R., JAFFRÉ, T., JOHNS, R., MCINTYRE, T., PURVIS, O.W.,

SALT, D.E., SCHAT, H., ZHAO, F.J., BAKER, A.J.M. Use of plants to manage sites contaminated with metals. **IN: Broadley, M.R. & White, P.J. Plant nutritional Genomics**. Blackwell UK, p. 287-315, 2005.

WHO. United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water, Geneva, **World Health Organization**. 2001,

YU, Y. Uptake of arsenic by maize inoculated with three different arbuscular mycorrhizal fungi. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 41, p. 735 - 743, 2010.

ZHANG, J., ZHAO, Q., HUANG, Y., Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings. **Environmental and Experimental Botany** 72 (1), p. 34-40, 2011

ZHAO, F. J. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytol.**, v. 181, p. 777-794, 2009.

ZHAO, F. J., DUNHAM, S. J.; McGRATH, S. P. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. **New Phytologist**, v. 156, p. 27-31, 2002.

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

ZHU, Y.G. Phosphate (Pi) and arsenate uptake by two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars and their doubled haploid lines. *Annals of Botany*, v. 98, p. 631–636, 2006.

ANEXOS

- Montagem dos Experimentos:



Figura 1 – Sementes de *Crambe abyssinica*.



Figura 2 – Plantas de *Crambe abyssinica* na sementeira duas semanas após o semeio.



Figura 3 – Estágio de desenvolvimento das plantas no momento do transplântio.



Figura 4 – Planta com raiz nua pronta para ser transferida para o sistema hidropônico.



Figura 5 – Suporte de espuma fenólica para auxiliar na sustentação das plantas no sistema hidropônico.



Figura 6 – Plantas cultivadas em meio hidropônico com aeração forçada.



Figura 7 – Visão geral de um dos blocos do experimento logo após a montagem.



Figura 8 – Estágio de desenvolvimento das plantas no momento da aplicação dos tratamentos.

- Experimento do capítulo 1 – Teste de doses:



Figura 1 – Parte aérea das plantas ao final do experimento no tratamento controle ($0,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e na dose de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de As.



Figura 2 – Raízes das plantas ao final do experimento no tratamento controle ($0,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e na dose de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de As.



Figura 3 – Parte aérea das plantas ao final do experimento nas doses de 0,4 e 0,6 mmol L⁻¹ de As.



Figura 4 – Raízes das plantas ao final do experimento nas doses de 0,4 e 0,6 mmol L⁻¹ de As.



Figura 5 – Parte aérea das plantas ao final do experimento nas doses de 0,9 e 1,2 mmol L⁻¹ de As.



Figura 6 – Raízes das plantas ao final do experimento nas doses de 0,9 e 1,2 mmol L⁻¹ de As.

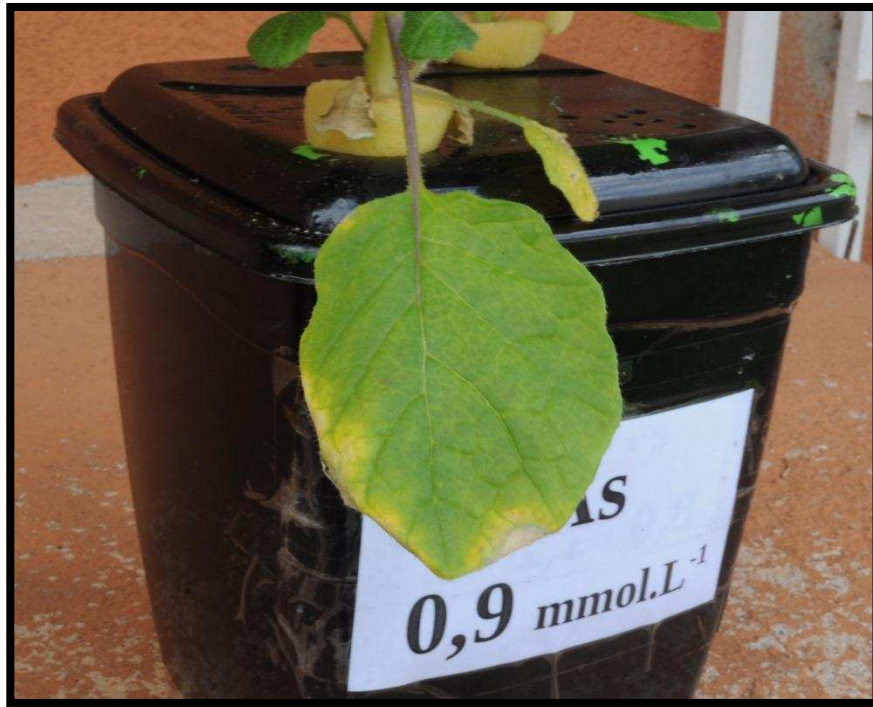


Figura 7 – Clorose seguida por necrose nas bordas das folhas velhas no tratamento de $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$.

- Experimento do capítulo 2 – Diferentes concentrações de fosfato, sulfato e arsenato:



Figura 1 - Visão geral das plantas 12 h após a aplicação dos tratamentos.



Figura 2 – Efeito de concentrações crescentes de arsenato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato e $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de sulfato 12 h após a aplicação dos tratamentos.



Figura 3 – Efeito de concentrações crescentes de arsenato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato e $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de sulfato 12 h após a aplicação dos tratamentos.



Figura 4 – Efeito de concentrações crescentes de arsenato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato e $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de sulfato 12 h após a aplicação dos tratamentos.



Figura 5 – Efeito de concentrações crescentes de sulfato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato 12 h após a aplicação dos tratamentos.



Figura 6 – Efeito de concentrações crescentes de fosfato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato e $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de sulfato 12 h após a aplicação dos tratamentos.



Figura 7 – Efeito de concentrações crescentes de arsenato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato e $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de sulfato.



Figura 8 – Efeito de concentrações crescentes de arsenato nas raízes de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato e $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de sulfato.



Figura 9 – Efeito de concentrações crescentes de arsenato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com 1,2 mmol L⁻¹ de fosfato e 2,4 mmol L⁻¹ de sulfato.



Figura 10 – Efeito de concentrações crescentes de arsenato nas raízes de *Crambe abyssinica* cultivadas com 1,2 mmol L⁻¹ de fosfato e 2,4 mmol L⁻¹ de sulfato.



Figura 11 – Efeito de concentrações crescentes de fósforo e enxofre nas plantas de *Crambe abyssinica* na ausência de arsenato.



Figura 12 – Efeito de concentrações crescentes de fósforo e enxofre nas raízes de *Crambe abyssinica* na ausência de arsenato.



Figura 13 – Efeito de concentrações crescentes de sulfato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato na ausência de arsenato.



Figura 14 – Efeito de concentrações crescentes de sulfato nas raízes de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato na ausência de arsenato.



Figura 15 – Efeito de concentrações crescentes de fósforo nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com 0,8 mmol L⁻¹ de sulfato na ausência de arsenato.



Figura 16 – Efeito de concentrações crescentes de fósforo nas raízes de *Crambe abyssinica* cultivadas com 0,8 mmol L⁻¹ de sulfato na ausência de arsenato.



Figura 17 – Efeito de concentrações crescentes de sulfato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato.



Figura 18 – Efeito de concentrações crescentes de sulfato nas raízes de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato.



Figura 19 – Efeito de concentrações crescentes de fosfato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com 0,3 mmol L⁻¹ de arsenato e 0,8 mmol L⁻¹ de sulfato.



Figura 20 – Efeito de concentrações crescentes de fosfato nas raízes de *Crambe abyssinica* cultivadas com 0,3 mmol L⁻¹ de arsenato e 0,8 mmol L⁻¹ de sulfato.



Figura 21 – Efeito de concentrações crescentes de sulfato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato.



Figura 22 – Efeito de concentrações crescentes de sulfato nas raízes de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de fosfato.



Figura 23 – Efeito de concentrações crescentes de fosfato nas plantas de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato e $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de sulfato.



Figura 22 – Efeito de concentrações crescentes de fosfato nas raízes de *Crambe abyssinica* cultivadas com $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de arsenato e $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de sulfato.