

GRASIELLE SOARES GUSMAN

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE *Lactuca sativa* cv  
Hanson SUBMETIDA AO ARSENATO (As<sup>V</sup>) E ARSENITO (As<sup>III</sup>)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

GRASIELLE SOARES GUSMAN

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE *Lactuca sativa* cv  
Hanson SUBMETIDA AO ARSENATO (As<sup>V</sup>) E ARSENITO (As<sup>III</sup>)**

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

APROVADA: 21 de fevereiro 2011

---

Prof. João Marcos Araújo

---

Prof<sup>a</sup>. Kacilda Naomi Kuki

---

Prof. Juraci Alves de Oliveira  
(Orientador)

*“Só quando a última árvore for derrubada, o último peixe  
for morto e o último rio for poluído é que o homem  
perceberá que não pode comer dinheiro.”*

*Provérbio Indígena*

*A Deus, pelas portas que me abriu e  
os anjos que me enviou.*

**OFEREÇO**

*Aos meus pais Marcelo e Silvia e ao meu  
irmão Lucas, pelo amor incondicional.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por essa oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa pelo oferecimento do curso de pós-graduação em Fisiologia Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira pela orientação, valiosos conselhos, amizade e boas risadas.

Ao professor José Cambraia pela co-orientação e grande ajuda na realização desse trabalho.

Aos professores Marco Aurélio Pedron e Silva, Raimundo Barros e Fábio Murilo DaMatta, pelos conhecimentos e conselhos para o bom desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores João Marcos Araújo e Kacilda Naomi Kuki pela disponibilidade em analisar esse material.

Aos meus pais, Marcelo e Silvia Gusman, pelo amor, apoio e incentivo incondicionais.

Ao meu irmão Lucas, por toda alegria e carinho.

Ao meu noivo Alan, por toda confiança, incentivo e amor e, por perder muitos de seus finais de semana de descanso, me ajudando no laboratório.

À minha amiga Fernanda, pelos agradáveis momentos de alegria, pelos sábios conselhos e pelas dúvidas sanadas a qualquer momento.

A todos os meus amigos do mestrado, especialmente, Paulo (Paulete), Leandro Elias (Ibiá), Leandro Torres (Totoca), Marcel (Marcelzete), Tânia (Taniacats), Patrícia (Paty), Daniela (Dani), Samuel (Samuca), Rafael (Calçado) e Izabel (Bell) por toda grandiosa amizade, pelos estudos em grupo e pelos momentos de alegria.

Aos demais colegas de laboratório, Iulla, Heloisa, Neidiqueli, Gládis, Élcio e Cleberson, pela amizade, pelas risadas e por todo apoio.

Ao funcionário Carlos (Charles) pelo auxílio.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

## **BIOGRAFIA**

Grasielle Soares Gusman, filha de Marcelo Aragão Gusman e Silvia Helena Soares Gusman, nasceu em 17 de julho de 1986, em Muriaé, MG.

Em janeiro de 2009, graduou-se em Farmácia, bacharelado, pela Faculdade de Minas, em Muriaé, MG, sendo bolsista integral do Programa Universidade para Todos – PROUNI.

Iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, em março de 2009.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1

## ARTIGO I

### **Efeito do arsenato e arsenito sobre os parâmetros fotossintéticos e o crescimento de plantas de alface**

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1. Material vegetal e condições de tratamento.....	8
2.2. Determinação da concentração de As, do fator de translocação e da taxa de crescimento relativo (TCR).....	9
2.3. Determinação dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	9
2.4. Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos.....	10
2.5. Análises estatísticas.....	10
3. RESULTADOS.....	11
3.1. Acúmulo de As, fator de translocação e taxa de crescimento relativo...	11
3.2. Efeitos sobre a fotossíntese.....	13
3.2.1. Trocas gasosas.....	13
3.2.2. Fluorescência da clorofila a.....	15

3.3. Pigmentos cloroplastídicos.....	17
4. DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÃO.....	24
6. AGRADECIMENTOS.....	24
7. REFERÊNCIAS.....	24

## ARTIGO II

### **Nutrição mineral e regulação enzimática ao estresse oxidativo induzido por arsenato e arsenito em plantas de alface**

RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1. Material vegetal e condições de tratamento.....	36
2.2. Determinação da concentração de As e de nutrientes minerais.....	37
2.3. Determinação da peroxidação de lípidios.....	37
2.4. Extração enzimática.....	37
2.4.1. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) .....	38
2.4.2. Determinação da atividade das peroxidases totais (POX, EC 1.11.1.7) .....	38
2.4.3. Determinação da atividade de catalase (CAT, EC 1.11.1.6) .....	39
2.4.4. Determinação da atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7) .....	39
2.4.5. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) .....	39
2.5. Análises estatísticas.....	40

3. RESULTADOS.....	40
3.1 Acúmulo de As.....	40
3.2. Efeito do As <sup>V</sup> e As <sup>III</sup> sobre os parâmetros mineralógicos.....	41
3.3. Peroxidação de lipídios.....	44
3.4. Atividade enzimática.....	45
3.4.1. Atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) .....	45
3.4.2. Atividade das peroxidases totais (POX, EC 1.11.1.7) .....	46
3.4.3. Atividade de catalase (CAT, EC 1.11.1.6) .....	48
3.4.4. Atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7) .....	48
3.4.5. Atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) .....	49
4. DISCUSSÃO.....	50
5. CONCLUSÃO.....	54
6. AGRADECIMENTOS.....	55
7. REFERÊNCIAS.....	55
CONCLUSÕES GERAIS.....	62

## RESUMO

**GUSMAN**, Grasielle Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Respostas fisiológicas e bioquímicas de *Lactuca sativa* cv Hanson submetida ao arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) e arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ )**. Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Co-orientador: José Cambraia.

As formas inorgânicas de arsênio (As), arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) e arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) são consideradas as mais tóxicas sendo também, as mais encontradas em plantas. A contaminação de As em alimentos representa um grande risco à saúde pública, já que essa é considerada a segunda principal forma de contaminação por esse metalóide. Assim, plantas de alface (*Lactuca sativa* cv Hanson) foram expostas a diferentes concentrações de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$ , 0,0; 6,6; 13,2; 26,4 e 52,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , por três dias. Foram avaliados o acúmulo e a distribuição de As em raízes e folhas e o efeito no crescimento vegetal, nas trocas gasosas, na fluorescência da clorofila *a* e na concentração de clorofilas e carotenóides, assim como as alterações na nutrição mineral, avaliando-se a concentração de cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), ferro (Fe), manganês (Mn) e cobre (Cu) e a regulação das enzimas do sistema antioxidante, como dismutase do superóxido (SOD), peroxidases totais (POX), catalase (CAT), redutase da glutathione (GR) e peroxidase do ascorbato (APX). As plantas testadas acumularam quantidades significativas de As, à medida que se aumentou a concentração de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  na solução nutritiva, em folhas e raízes, observando-se maior acúmulo nas raízes. Tal fato, promoveu redução nos parâmetros de trocas gasosas como fotossíntese líquida (A), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração (E) e eficiência do uso da água (EUA), exceto para 6,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{As}^{\text{V}}$ . A concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) aumentou nas maiores concentrações de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$ , indicando alteração na etapa bioquímica da fotossíntese. Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram alterados, com redução no

coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e transporte relativo de elétrons (ETR), acompanhados do aumento do coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ), evidenciando alteração na etapa fotoquímica do processo fotossintético. Em consequência, o crescimento das plantas foi afetado, à exceção das raízes daquelas expostas à concentração de  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{As}^{\text{V}}$ . A exposição das plantas ao  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  resultou em peroxidação de lipídios crescente, conforme observado pelo aumento na concentração de malonaldeído (MDA), indicativo de ação do estresse oxidativo. Entretanto, esse estresse oxidativo não foi capaz de afetar as membranas dos tilacóides e a concentração dos pigmentos cloroplastídicos, clorofilas e carotenóides, conforme observado pela inalteração da fluorescência mínima ( $F_0$ ) e da eficiência fotoquímica potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ). O estresse oxidativo, acompanhado dos danos diretos sofridos pelo sistema radicular, promoveu alterações na nutrição mineral de folhas e raízes. A concentração dos nutrientes envolvidos com mecanismos de tolerância, como Ca e Mg, foram aumentadas. A concentração  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , de ambas as formas químicas promoveu aumento na concentração de fósforo (P), não sendo esse resultado observado nas concentrações superiores de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$ . A provável produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), decorrentes da exposição ao  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  promoveu alteração no sistema enzimático antioxidante. Nas folhas, observou-se aumento nas atividades da SOD, CAT, POX e APX, enquanto, nas raízes, da SOD, CAT e GR, caracterizando mecanismo de tolerância diferenciado nas folhas e raízes.

## ABSTRACT

**GUSMAN**, Grasielle Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Physiological and biochemical responses of *Lactuca sativa* cv Hanson exposed to arsenate ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) and arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ )**. Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-adviser: José Cambraia.

The inorganic forms of arsenic (As), arsenate ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) and arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) are considered the most toxic as well as the most found in plants. As contamination in foods represents a great risk to the public health, since it is considered the second mainly way of contamination by this metalloid. Therefore, lettuce plants (*Lactuca sativa* cv Hanson) were exposed to different  $\text{As}^{\text{V}}$  and  $\text{As}^{\text{III}}$  concentrations, 0.0, 6.6, 13.2, 26.4 and 52.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for three days. It was evaluated As accumulation and distribution in roots and leaves, and its effect on vegetal growth, gas exchange, fluorescence of chlorophyll *a* and chlorophylls and carotenoids concentration, as well as on mineral nutrition, evaluating the concentration of calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorus (P), iron (Fe), manganese (Mn) and copper (Cu) and the regulation of the antioxidant enzymatic system as superoxide dismutase (SOD), total peroxidases (POD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and ascorbate peroxidase (APX). The tested plants accumulated significant amounts of As with the increment of  $\text{As}^{\text{V}}$  and  $\text{As}^{\text{III}}$  concentration in the nutrient solution, in leaves and roots, observing higher accumulation in roots. This fact promoted reduction in gas exchange parameters as liquid photosynthesis (A), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration (E) and effective use of water (EUW), except at 6.6  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{As}^{\text{V}}$ . The internal concentration of  $\text{CO}_2$  (Ci) increased at the highest  $\text{As}^{\text{V}}$  and  $\text{As}^{\text{III}}$  concentrations, which indicated changes in the biochemical phase of photosynthesis. The parameters of fluorescence of chlorophyll *a* were changed with reduction on photochemical quenching (qP), electron transport rate

(ETR), followed by the increment in non-photochemical quenching (NPQ), which showed a change in the photochemical phase of photosynthetic process. In consequence, plant growth was affected, except the roots of plants that were exposed to the concentration of  $6.6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{As}^{\text{V}}$ . The exposition of plants to  $\text{As}^{\text{V}}$  and  $\text{As}^{\text{III}}$  resulted in increasing lipid peroxidation as observed by the increment in malonaldehyde (MDA), an indicator of the action of the oxidative stress. However, this oxidative stress was not able to affect thylacoid membrane and chloroplastic pigments concentration, chlorophylls and carotenoids, as observed by the unaltered minimal fluorescence ( $F_0$ ) and potential photochemical efficiency of photosystem II ( $F_v/F_m$ ). The oxidative stress followed by the direct damages suffered by the roots, promoted changes in the mineral nutrition of leaves and roots. The concentration of nutrients involved with tolerance mechanisms, as Ca and Mg, were increased. The concentration of  $6.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , of both chemical forms promoted increment in phosphorus (P) concentration, not being this result observed at the highest concentrations of  $\text{As}^{\text{V}}$  and  $\text{As}^{\text{III}}$ . The probably reactive oxygen species (ROS) produced, due to the exposition to  $\text{As}^{\text{V}}$  and  $\text{As}^{\text{III}}$  promoted changes in the antioxidant enzymatic system. In the leaves, it was observed an increment in the activities of SOD, CAT, POX and APX, whereas in the roots, of SOD, CAT and GR, characterizing differentiated tolerance mechanism in leaves and roots.

## INTRODUÇÃO GERAL

O arsênio (As) pode ser encontrado em solos, águas e ar, sob formas orgânicas, como ácido monometilarsênico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), arsenobetainas (AsB) e arsenocolina (AsC), e inorgânicas como arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) e arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ). O  $\text{As}^{\text{V}}$  é encontrado, preferencialmente, em águas superficiais enquanto o  $\text{As}^{\text{III}}$ , em águas subterrâneas, sendo essas formas químicas consideradas as mais tóxicas e também as mais disponíveis para absorção pelas plantas.

No Brasil, especialmente na região do Quadrilátero Ferrífero, tem sido relatado que ambientes aquáticos, tanto superficiais quanto subterrâneos, possuem níveis de As acima de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , limite máximo estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). A água dessa região é utilizada tanto para consumo como para irrigação das plantas o que pode acarretar em cânceres de pele, fígado, pulmão e bexiga, assim como outras doenças não-cancerosas como melanoses, náuseas, alucinações e demência.

A absorção do  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  ocorre de maneiras distintas nas plantas. O  $\text{As}^{\text{V}}$ , por possuir características semelhantes ao  $\text{P}^{\text{V}}$ , compete com esse elemento por seus transportadores. Já o  $\text{As}^{\text{III}}$ , por se apresentar como um composto neutro no ambiente,  $\text{As}(\text{OH})_3$ , é absorvido pelos canais de aquaporinas nas células.

Algumas plantas desenvolvem mecanismos de tolerância contra a contaminação por poluentes como impedimento da absorção, complexação e retenção dos elementos nas raízes; redução no transporte para parte aérea e, complexação e armazenamento no vacúolo. Entretanto, uma vez no interior das plantas,  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  atuam distintamente para exercerem seus efeitos tóxicos. O  $\text{As}^{\text{V}}$ , provavelmente, interfere com a absorção e o metabolismo de fosfato e reações de fosforilação, atuando como um análogo ao

fosfato, enquanto o  $\text{As}^{\text{III}}$ , por ligar-se aos grupos sulfidrila de proteínas e enzimas, acarreta alterações no metabolismo geral da célula.

Algumas espécies de plantas são muito tolerantes à contaminação por As e são capazes de acumular esse elemento em concentrações maiores do que  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca, sendo por isso, chamadas hiperacumuladoras. Outras espécies, denominadas excludoras, por sua vez, são resistentes por impedirem a absorção desses poluentes pelas raízes e também, por impedirem que esses se movimentem livremente pelas células. Entre as plantas hiperacumuladoras e excludoras encontram-se plantas com características intermediárias, capazes de acumular e tolerar As na faixa de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de massa seca.

Os danos ao metabolismo vegetal promovidos pelo As pode ser devido à ação direta do próprio elemento ou indireta, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo este o principal dano, decorrente das altas concentrações de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Estas ROS podem danificar o DNA celular e promover peroxidação de lipídios de membrana, e, eventualmente levar à morte celular.

Os principais efeitos tóxicos do As nas plantas são a redução no crescimento de parte aérea e raízes, da fotossíntese, com alterações nas etapas fotoquímicas e/ou bioquímicas e da respiração, alteração da concentração das clorofilas e dos carotenóides, da atividade enzimática e da absorção de macro e micronutrientes essenciais, como cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), entre outros.

Para evitar os danos indiretos ocasionados pelas ROS, as células ativam mecanismos antioxidativos, representados pelo aumento na atividade de enzimas antioxidativas, como a dismutase do superóxido (SOD), peroxidases totais (POX),

catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutathione (GR), assim como aumento da concentração de compostos antioxidantes não-enzimáticos como ascorbato, glutathione e  $\alpha$ -tocoferol. A SOD é considerada linha de defesa primária contra o estresse oxidativo através da dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ . A remoção do  $H_2O_2$  ocorre através da atuação da CAT, que converte  $H_2O_2$  em oxigênio e água nos peroxissomos, enquanto a APX e a GR degradam  $H_2O_2$ , no citosol e cloroplastos, através do ciclo ascorbato-glutathione. As alterações observadas nos mecanismos enzimáticos e o produto resultante da ação de ROS nas membranas, o MDA, são dessa forma, considerados indicadores do estresse oxidativo em plantas.

A alface (*Lactuca sativa* cv Hanson) é uma hortaliça muito importante na dieta, sendo consumida diariamente, na forma fresca ou em saladas. Os benefícios à saúde promovidos por essa espécie têm sido atribuídos à presença de vitamina C, compostos fenólicos e fibras. Portanto, a contaminação dessa espécie por  $As^V$  e  $As^{III}$  representa um grande risco a saúde pública, já que promoverá a inserção desse metalóide nas cadeias tróficas.

## ARTIGO I

### **Efeito do arsenato e arsenito sobre os parâmetros fotossintéticos e o crescimento de plantas de alface**

#### **RESUMO**

A contaminação de águas e alimentos por  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  representa um grande risco à saúde pública, devido à inserção deste metalóide nas cadeias tróficas. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos causados pelo  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  sobre a fotossíntese e o crescimento de plantas de alface, com análise da absorção e acúmulo de As nas folhas e raízes, alterações nas trocas gasosas, na fluorescência da clorofila *a* e na concentração de pigmentos cloroplastídicos. O acúmulo de As nos órgãos vegetais aumentou à medida que a concentração de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  aumentava na solução nutritiva, exceto na maior concentração de  $\text{As}^{\text{III}}$ , provavelmente, por um mecanismo de extrusão de  $\text{As}^{\text{III}}$ . Embora a maior concentração de As tenha sido encontrada nas raízes, observou-se que quantidade significativa foi transportada para as folhas, especialmente quando expostas ao  $\text{As}^{\text{III}}$ . Esse acúmulo de As reduziu a taxa de crescimento relativo (TCR) tanto de folhas como raízes. Entretanto, na concentração de  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{As}^{\text{V}}$ , observou-se aumento do TCR do sistema radicular, o qual pode estar relacionado com a nutrição de fosfato (Pi). O  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  interferiram negativamente na fotossíntese das plantas, exceto na concentração de  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{As}^{\text{V}}$ . A redução observada parece estar associada à interferência na etapa fotoquímica e bioquímica da fotossíntese, mas ainda assim, os resultados de fluorescência da clorofila *a* indicam que não houve danos ao aparelho fotossintético e nem aos pigmentos cloroplastídicos. Dessa forma, as plantas de alface protegem o aparato fotossintético contra o excesso de espécies reativas de oxigênio

(ROS) geradas em decorrência da exposição ao As, indicando que são capazes de ativar mecanismos de tolerância contra a exposição ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>.

*Palavras-chave:* alface, toxicidade, fotossíntese, desenvolvimento

## **ABSTRACT**

Water and food contamination by As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> represents a great risk to the public health due to the insertion of this metalloid in the food chain. This study aimed to evaluate the effects caused by As<sup>V</sup> and As<sup>III</sup> on the photosynthesis and, consequently, on the growth of lettuce plants, analyzing As uptake and accumulation in leaves and roots, changes in gas exchange, fluorescence of chlorophyll *a* and chloroplastic pigments concentration. The accumulation of As in the vegetal tissues increased with the increment of As<sup>V</sup> and As<sup>III</sup> concentration in nutrient solution, except at the highest As<sup>III</sup> concentration, probably, due to a mechanism of As<sup>III</sup> extrusion. Although the highest concentration of As has been found in the roots, it was observed that significant amount was translocated to the leaves, specially when exposed to As<sup>III</sup>. This As accumulation reduced relative growth rate (RGR) of leaves and roots. However, at the concentration of 6.6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  As<sup>V</sup>, it was observed an increment in the root RGR, which can be related to phosphate (Pi) nutrition. The As<sup>V</sup> and As<sup>III</sup> interfered negatively in plant photosynthesis, except at the concentration of 6.6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  As<sup>V</sup>. The observed reduction is, probably, associated to the interference in photochemical and biochemical phases of photosynthesis, but still, fluorescence chlorophyll *a* results indicate that there were not any damages in the photosynthetic apparatus or even in the chloroplastic pigments. According to this, lettuce plants protect the photosynthetic apparatus against reactive

oxygen species (ROS) excess, generated due to As exposition, indicating that they are able to activate tolerance mechanisms against As<sup>V</sup> and As<sup>III</sup> exposition.

*Keyword:* lettuce, toxicity, photosynthesis, development

## 1. INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um elemento amplamente distribuído na natureza, não sendo essencial para as plantas (Jedynak et al. 2010). O acúmulo desse metalóide, em solos e águas, pode ocorrer devido a atividades antrópicas, como o uso de pesticidas à base de As (Lee et al. 2008) e a mineração (Heikens et al. 2007).

As principais formas químicas de As disponíveis para absorção pelas plantas são o arsenato (As<sup>V</sup>), encontrado predominantemente em solos aeróbicos, e o arsenito (As<sup>III</sup>), que predomina em condições anaeróbicas (Meharg e Hartley-Whitaker 2002; Chaturvedi 2006; Wang et al. 2010).

O acúmulo de As em plantas, além dos danos ao próprio organismo, apresenta risco potencial aos animais e população que consomem as plantas contaminadas, afetando os demais níveis tróficos, podendo, nos seres humanos, resultar em cânceres de pele, fígado e bexiga, assim como muitas outras doenças não cancerosas (Tapio e Grosche 2006; Panda et al. 2010).

A alface, *Lactuca sativa* L., é uma importante hortaliça consumida primariamente fresca ou em saladas, considerada pertencente ao grupo dos alimentos mais saudáveis (Mulabagal et al. 2010). Os benefícios à saúde promovidos pela alface têm sido atribuídos à presença de vitamina C, compostos fenólicos e fibras (Nicolle et al. 2004a; Nicolle et al. 2004b; Mulabagal et al. 2010). Dessa forma, a contaminação dessa espécie por As, implica em grande risco à saúde pública.

As plantas podem absorver  $\text{As}^{\text{V}}$  via transportadores de fosfato ( $\text{P}^{\text{V}}$ ) e  $\text{As}^{\text{III}}$  via canais de aquaporinas, já que apresentam característica de composto neutro (Zhao et al. 2009; Wang et al. 2010). O  $\text{As}^{\text{V}}$  e o  $\text{As}^{\text{III}}$  provocam danos aos vegetais por mecanismos diferentes, de forma que o  $\text{As}^{\text{V}}$  pode substituir o fosfato, restringindo a produção de ATP, e o  $\text{As}^{\text{III}}$ , por sua vez, é capaz de se ligar aos grupos sulfidrilas, interferindo no metabolismo da espécie vegetal, podendo levar a disfunção celular (Zhao et al. 2009).

Uma vez absorvido, o As causa efeitos deletérios em vários processos metabólicos, incluindo fotossíntese, respiração, regulação do crescimento e reprodução (Stoeva 2003/4). O acúmulo de As pode interferir na biossíntese de clorofila por indução de deficiência de ferro (Fe) ou por inibição de alguma etapa chave do processo (Schoefs et al. 2005). Além disso, esse elemento pode afetar eficiência fotoquímica e a dissipação de calor, promovendo alterações nas trocas gasosas e mudanças na emissão de fluorescência (Prado e Casali 2006; Rahman et al. 2007). O efeito do As no processo fotossintético pode ocorrer na fase fotoquímica ou bioquímica ou, até mesmo, em ambas as etapas. Essas alterações resultam em redução do crescimento da parte aérea e raízes, com sintomas de toxidez que mostram murcha e coloração violácea das folhas (Abedin e Meharg 2002; Rahman e Naidu 2009).

Embora alguns trabalhos relatem os efeitos tóxicos do As sobre a fotossíntese líquida, a transpiração, a condutância estomática e a fluorescência da clorofila *a* (Milivojec et al. 2006; Costa 2007), pouco tem sido descrito na literatura sobre as respostas fisiológicas de plantas expostas ao As.

Apesar dos severos sintomas de toxidez, algumas plantas apresentam mecanismos de tolerância, basicamente envolvendo impedimento (absorção limitada pelas raízes ou transporte limitado para a parte aérea), desintoxicação (compartimentalização vacuolar

do metal ou ligação à parede celular) e tolerância bioquímica (rotas metabólicas especializadas e adaptações enzimáticas) (Matschullat 2000; Chaturvedi 2006).

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o acúmulo de As em plantas de *Lactuca sativa* cv Hanson, expostas ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> e seus efeitos tóxicos sobre o crescimento, as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a* e os pigmentos cloroplastídicos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

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

Plantas de *Lactuca sativa* cv Hanson foram obtidas após germinação em areia esterilizada, umedecida com solução de Clark (1975) 1/5 força iônica e transferidas no 17º dia para vasos de polietileno contendo solução nutritiva de Clark (1975), pH 6,5, mantidos em ambiente com temperatura e luminosidade controladas (25±2 °C, 230 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e fotoperíodo luminoso de 16 h, até o 40º dia para obtenção de biomassa. As plantas foram tratadas com concentrações de 0,0; 6,6; 13,2; 26,4 e 52,8 μmol L<sup>-1</sup> arsenato (As<sup>V</sup>) (na forma de Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) e arsenito (As<sup>III</sup>) (na forma de NaAsO<sub>2</sub>), e mantidas sob as condições laboratoriais supracitadas, por período de três dias. Após esse período, as plantas foram retiradas, lavadas com solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, seguido de lavagem em água desionizada e usadas, subsequentemente, para as análises experimentais.

## *2.2. Determinação da concentração de As, do fator de translocação e da taxa de crescimento relativo (TCR)*

Amostras de 0,1 g de material seco de raiz e folha foram digeridas com mistura nitro-perclórica (2:1), em um bloco digestor, com temperatura controlada em torno de 100-120 °C até a completa oxidação do material vegetal (Marin et al. 1993). O extrato mineral obtido foi utilizado para determinação da concentração de As, em espectrofotômetro de emissão em plasma indutivamente acoplado (ICP) (OPTIMA 3300 DV, Perkin-Elmer) (Singh et al. 2006).

O fator de translocação foi calculado através da razão entre a concentração do As nas folhas e sua concentração nas raízes (Mishra e Tripathi, 2008).

A taxa de crescimento relativo foi calculada segundo a equação proposta por Hunt (1978),  $R_w = (\ln w_1 - \ln w_0) \times 1000 / (t_1 - t_0)$ , em que,  $R_w$  (taxa de crescimento relativo em termos de massa seca, no período experimental);  $\ln w_1$  e  $\ln w_0$  (logaritmo neperiano da massa seca ao início e final do experimento, respectivamente) e  $t_1 - t_0$  (duração do experimento em dias).

## *2.3. Determinação dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a*

Os parâmetros de trocas gasosas foram determinados, em folhas completamente expandidas, iluminadas com 600  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com auxílio de um analisador de gás no infravermelho (LCpro, ADC Bioscientific), no horário entre 09:00 e 10:30h (Adaptado de Caporn 1989). Foram avaliados a fotossíntese líquida (A), a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração (E), a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e a eficiência do uso da água (EUA).

As análises da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas com o auxílio de um fluorômetro modulado (Mini-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, GmbH). Depois da adaptação ao escuro por 15 minutos, as folhas foram inicialmente expostas a uma irradiância fraca para a estimativa da fluorescência mínima ( $F_0$ ), então, um pulso de saturação de luz branca ( $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de 0,8 s foi aplicado para obtenção da fluorescência máxima ( $F_m$ ) e a razão  $F_v/F_m$  (eficiência fotoquímica potencial do fotossistema II) foi estabelecida (He et al. 2001). Além desses parâmetros, foram avaliados, após exposição à luz, rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi_{\text{FSII}}$ ), o coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR).

#### *2.4. Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos*

Os teores de clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*), clorofila total (Cl Total) e carotenóides (Carot) foram determinados conforme protocolo descrito por Wellburn (1994). Os pigmentos foram extraídos de discos foliares (10 mg) mantidos em 5 mL de DMSO saturado com carbonato de cálcio por 36 horas. Foi determinada a absorvância dos extratos a 665,1 nm, 649,1 nm, 652 nm e 480 nm e a concentração dos pigmentos expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  MF.

#### *2.5. Análises estatísticas*

Os experimentos foram conduzidos em blocos casualizados com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste-F,  $P < 0,05$ , seguidos pela análise do Teste Fisher's LSD,  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Acúmulo de As, fator de translocação e taxa de crescimento relativo (TCR)

O acúmulo de As, nas folhas e raízes, aumentou com o incremento da concentração de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> em solução, exceto em 52,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  As<sup>III</sup>, em que se observou redução no acúmulo de As<sup>III</sup> nas folhas e nas raízes. Observou-se maior acúmulo de As nas folhas quando as plantas foram expostas ao As<sup>III</sup>, exceto nas concentrações de 6,6 e 52,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Nas raízes, o maior acúmulo de As foi alcançado quando essa estrutura foi exposta ao As<sup>V</sup>, exceto em 26,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Tabela 1).

**Tabela 1.** Concentração de As, fator de translocação e taxa de crescimento relativo (TCR) de folhas e raízes de plantas de alface, após três dias de exposição ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>.

$\mu\text{mol L}^{-1}$	Concentração As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MS)		Fator de translocação	TCR ( $\text{mg dia}^{-1} \text{g}^{-1}$ MS)		
	Folhas	Raízes	Folhas/ Raízes	Folhas	Raízes	
As <sup>V</sup>	0	0,00 c	0,00 d	0,00 b	448,79 a	322,23 b
	6,6	24,64 b	245,73 c	0,10 a	407,74 b	364,30 a
	13,2	27,96 b	266,84 b	0,10 a	336,20 c	296,68 c
	26,4	30,53 ab	279,75 b	0,11 a	295,85 d	268,92 d
	52,8	34,94 a	319,72 a	0,11 a	273,00 e	161,84 e
As <sup>III</sup>	0	0,00 d	0,00 e	0,00 b	448,79 a	322,23 b
	6,6	18,40 c	176,21 d	0,10 a	405,79 ab	306,13 b
	13,2	31,88 b	228,10 c	0,13 a	366,89 bc	271,46 c
	26,4	36,06 a	369,55 a	0,10 a	352,99 c	238,40 d
	52,8	32,52 b	295,45 b	0,11 a	316,68 d	214,98 e

Valores são médias de três repetições.

Médias seguidas por letras diferentes daquelas do controle apresentam diferenças significativas a  $P < 0,05$ , conforme teste LSD.

As plantas de alface apresentaram comportamento semelhante em relação ao fator de translocação de metais, independente da concentração e da forma química de As testadas (Tabela 1).

As folhas das plantas de alface tiveram seu crescimento continuamente retardado com o aumento da concentração de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  em solução. Quando submetidas a  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , a redução observada foi de 39,2% e 29,4% para  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$ , respectivamente (Tabela 1). Nas raízes, ocorreu aumento de 11,5% no crescimento quando as plantas foram expostas a  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{As}^{\text{V}}$ , sendo observado maior acúmulo de P nas raízes nessa concentração (dados ainda não publicados). Esse crescimento não foi observado quando essa concentração de  $\text{As}^{\text{III}}$  foi testada. A partir da concentração de  $13,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ , de ambas as formas químicas de As testadas, foi observada a redução do crescimento do sistema radicular, sendo este acompanhado por decréscimo na absorção de P (dados ainda não publicados). As raízes foram mais afetadas quando expostas ao  $\text{As}^{\text{V}}$ , sendo que na concentração de  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , ocorreu redução de 49,8%, comparado à redução de 33,3% causada pelo  $\text{As}^{\text{III}}$  (Tabela 1).

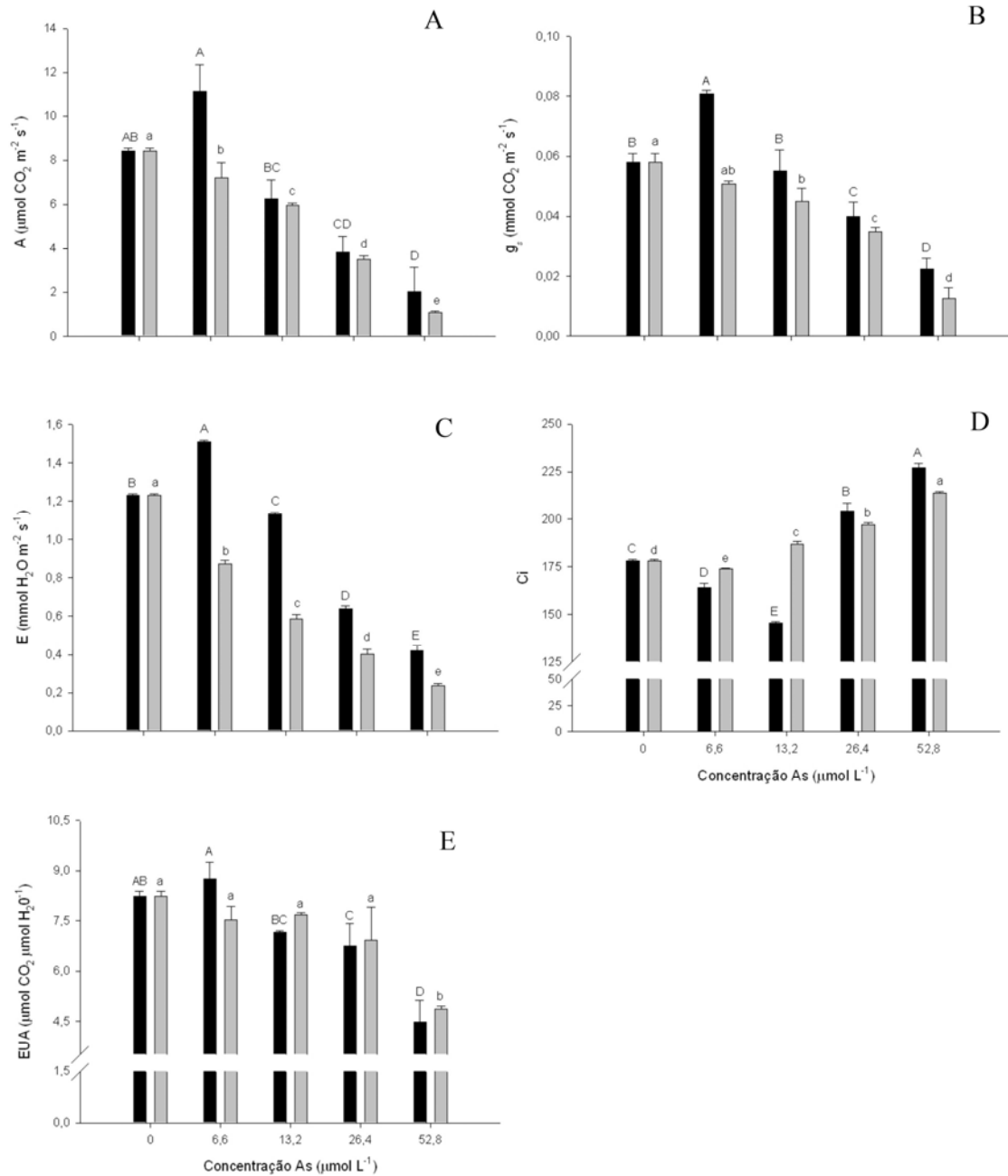
Apenas a concentração de  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{As}^{\text{V}}$  foi capaz de reduzir, em, aproximadamente 50% o crescimento das raízes. A parte aérea das plantas não teve TCR reduzida a essas proporções, sendo necessárias concentrações superiores de As. As concentrações de  $\text{As}^{\text{III}}$  testadas não foram capazes de promover inibição em 50% do crescimento das raízes e folhas.

As folhas e raízes das plantas expostas ao  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  não apresentaram danos visuais significativos, exceto nas mais altas concentrações, nas quais foram observadas discreta murcha foliar.

### 3.2. Efeitos sobre a fotossíntese

#### 3.2.1. Trocas gasosas

A fotossíntese líquida das plantas de alface foi reduzida com a aplicação dos diferentes tratamentos de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$ , exceto para a concentração de  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{As}^{\text{V}}$ , onde os valores obtidos foram, em média, 24,5% superiores aos dos controles. Entretanto, esse parâmetro demonstrou redução gradativa à medida que a concentração do metalóide foi aumentada em solução, independente da forma química testada (Fig. 1A). Respostas semelhantes foram obtidas na análise de condutância estomática ( $g_s$ ), alcançando 61,2% de redução em  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{As}^{\text{V}}$ . Nas plantas expostas ao  $\text{As}^{\text{III}}$ , a redução teve início na concentração de  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , acentuando-se com o aumento da concentração de  $\text{As}^{\text{III}}$ , atingindo 77,6% de redução na concentração de  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Fig. 1B).



**Figura 1.** Efeitos do As<sup>V</sup> (■) e As<sup>III</sup> (▒) sobre a fotossíntese líquida (A), condutância estomática (B), transpiração (C), concentração interna de CO<sub>2</sub> (D) e eficiência do uso da água (E), em plantas de alface após três dias de exposição. Barras representam desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes daquelas do controle apresentam diferenças significativas a P < 0,05, conforme teste LSD.

A transpiração sofreu redução com a exposição das plantas ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, exceto para a concentração de 6,6 µmol L<sup>-1</sup> de As<sup>V</sup>, sendo as plantas mais afetadas quando

expostas ao  $\text{As}^{\text{III}}$ , observando-se redução de 80,9% na concentração de  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{As}^{\text{III}}$  (Fig 1C).

A concentração de  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  promoveu redução de concentração interna de  $\text{CO}_2$  (Ci), sendo essa de 7,8% e 2,3%, para  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$ , respectivamente, diminuindo até a concentração de  $13,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{As}^{\text{V}}$ . Nessa concentração para  $\text{As}^{\text{III}}$ , já se observava um incremento em 4,7% de Ci, o qual aumentou à medida que a concentração de  $\text{As}^{\text{III}}$  em solução aumentava. A partir da concentração de  $26,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{As}^{\text{V}}$ , observou-se incremento na concentração de Ci em 12,8%, concentração esta que aumentou conforme concentrações maiores de As foram utilizadas (Fig. 1D).

A eficiência do uso da água manteve-se inalterada até a concentração de  $26,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Após essa concentração, observou-se redução nos valores desse parâmetro, tanto para  $\text{As}^{\text{V}}$  quanto para  $\text{As}^{\text{III}}$  (Fig. 1E).

### 3.2.2. *Fluorescência da clorofila a*

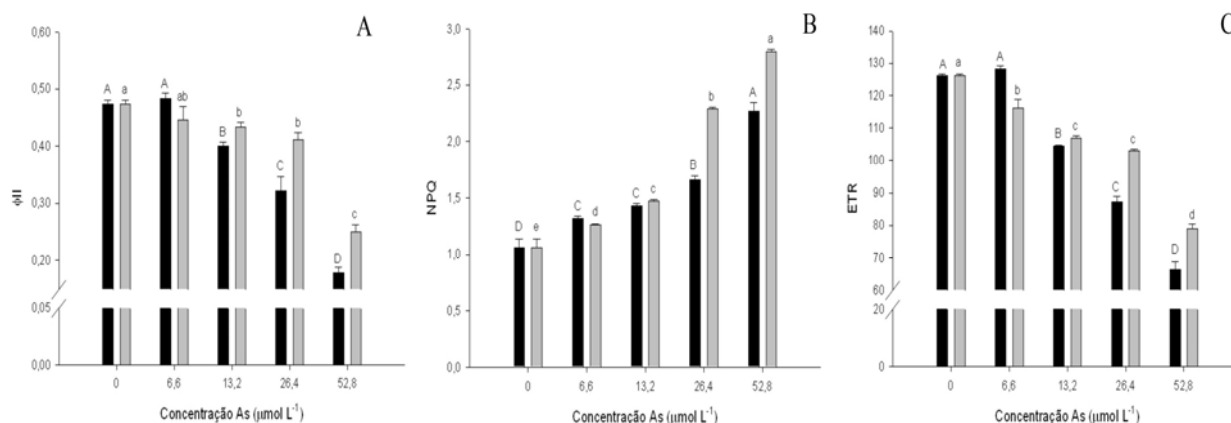
As formas químicas,  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$ , não alteraram estatisticamente os valores de  $F_0$  e de  $F_v/F_m$  (Tabela 2). No caso da razão  $F_v/F_m$ , os valores se mantiveram acima de 0,8 (indicativo de não ocorrência de danos ao aparato fotossintético), independentemente das concentrações de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  utilizadas.

**Tabela 2.** Resultados de  $F_0$  e  $F_v/F_m$  de plantas de alface, adaptadas ao escuro, após três dias de exposição ao  $As^V$  e  $As^{III}$ .

Fluorescência escuro		
$\mu\text{mol L}^{-1}$	$F_0^{\text{ns}}$	$F_v/F_m^{\text{ns}}$
0	$276,74 \pm 0,35$	$0,82 \pm 0,01$
6,6	$275,50 \pm 0,71$	$0,82 \pm 0,01$
$As^V$ 13,2	$274,50 \pm 0,71$	$0,82 \pm 0,01$
26,4	$274,25 \pm 1,06$	$0,81 \pm 0,01$
52,8	$274,50 \pm 0,71$	$0,81 \pm 0,01$
0	$276,74 \pm 0,35$	$0,82 \pm 0,01$
6,6	$275,75 \pm 0,35$	$0,82 \pm 0,01$
$As^{III}$ 13,2	$274,50 \pm 0,71$	$0,81 \pm 0,01$
26,4	$273,00 \pm 0,71$	$0,82 \pm 0,01$
52,8	$273,00 \pm 1,41$	$0,81 \pm 0,01$

Valores são médias de três repetições  $\pm$  desvio-padrão  
<sup>ns</sup> não significativo a  $P < 0,05$

Os valores de  $\Phi_{\text{FSII}}$  reduziram 62,2% e 47,2% com o acréscimo da concentração de  $As^V$  e de  $As^{III}$ , no tratamento com  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 2A). Os resultados obtidos para NPQ revelaram resposta contrária, aumentando significativamente com a exposição ao  $As^V$  e  $As^{III}$ , especialmente nas mais altas concentrações (Fig. 2B).



**Figura 2.** Efeitos do As<sup>V</sup> (■) e As<sup>III</sup> (▒) sobre o coeficiente de extinção fotoquímico (A), coeficiente de extinção não-fotoquímico (B) e transporte relativo de elétrons (C), em plantas de alface após três dias de exposição. Barras representam desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes daquelas do controle apresentam diferenças significativas a P < 0,05, conforme teste LSD.

A ETR reduziu, continuamente, com o aumento da concentração do metalóide em solução, sendo essa redução de 47,3% e 37,4%, para As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, respectivamente, em 52,8 µmol L<sup>-1</sup> (Fig. 2C).

### 3.3. Pigmentos cloroplastídicos

Não foram observadas variações estatisticamente significantes para as concentrações de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenóides, para nenhuma das formas químicas testadas, As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, em nenhuma das concentrações (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concentração dos pigmentos cloroplastídicos em plantas de alface, após três dias de exposição ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>.

Pigmentos cloroplastídicos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MF)				
$\mu\text{mol L}^{-1}$	Cl a <sup>ns</sup>	Cl b <sup>ns</sup>	Cl Total <sup>ns</sup>	Carot <sup>ns</sup>
0	13,20 $\pm$ 0,66	3,82 $\pm$ 0,62	16,68 $\pm$ 1,03	3,85 $\pm$ 0,15
6,6	13,14 $\pm$ 0,42	3,52 $\pm$ 0,03	16,72 $\pm$ 0,61	3,88 $\pm$ 0,02
As <sup>V</sup> 13,2	13,42 $\pm$ 1,26	3,98 $\pm$ 0,54	17,40 $\pm$ 1,80	3,81 $\pm$ 0,56
26,4	12,75 $\pm$ 2,08	3,76 $\pm$ 0,59	16,51 $\pm$ 2,67	3,81 $\pm$ 0,21
52,8	11,76 $\pm$ 0,44	3,51 $\pm$ 0,09	15,03 $\pm$ 0,09	3,68 $\pm$ 0,20
0	13,20 $\pm$ 0,66	3,82 $\pm$ 0,62	16,68 $\pm$ 1,03	3,85 $\pm$ 0,15
6,6	13,71 $\pm$ 0,24	3,82 $\pm$ 0,01	17,49 $\pm$ 0,34	3,80 $\pm$ 0,20
As <sup>III</sup> 13,2	11,98 $\pm$ 2,18	3,47 $\pm$ 0,18	16,32 $\pm$ 2,40	3,90 $\pm$ 0,44
26,4	11,94 $\pm$ 1,05	3,39 $\pm$ 0,34	15,33 $\pm$ 1,39	4,03 $\pm$ 0,60
52,8	11,80 $\pm$ 0,53	3,17 $\pm$ 0,03	14,78 $\pm$ 0,61	4,12 $\pm$ 0,14

Valores são médias de três repetições  $\pm$  desvio-padrão  
<sup>ns</sup> não significativo a  $P < 0,05$

#### 4. DISCUSSÃO

Em várias espécies de plantas, é conhecido que o As<sup>V</sup> é absorvido através de transportadores de fosfato (P<sup>V</sup>), já que possuem comportamento químico semelhante (Smedley e Kinniburgh 2002; Wang et al. 2010). O As<sup>V</sup> absorvido é transportado livremente nas plantas, podendo substituir o fosfato durante a fosforilação oxidativa, o que restringiria a produção de ATP. Já o As<sup>III</sup>, por ser encontrado no ambiente, predominantemente, como espécie neutra, As(OH)<sub>3</sub>, tem sua absorção pelas plantas realizadas através de canais de aquaporinas (Zhao et al. 2009), interferindo no metabolismo celular através da ligação direta aos grupos sulfidrilas, resultando em disfunção celular.

De modo geral, o aumento na concentração de As em solução resulta em maior acúmulo nas plantas, entretanto, nas plantas expostas à maior concentração de As<sup>III</sup>,

observou-se redução nesse acúmulo, provavelmente devido ao efluxo de  $\text{As}^{\text{III}}$  das raízes para a rizosfera. Em plantas não-acumuladoras, uma fração considerável de  $\text{As}^{\text{III}}$  absorvido pode ser removido do corpo da plantas através das raízes (Verbruggen et al. 2009). Esse fato pode ser o responsável, em parte, pelo maior acúmulo de  $\text{As}^{\text{V}}$  nas raízes quando comparado ao  $\text{As}^{\text{III}}$ , considerando ainda que a taxa de absorção do  $\text{As}^{\text{V}}$  é 10 vezes mais rápida do que a absorção do  $\text{As}^{\text{III}}$  (Wang et al. 2002).

Entretanto, mesmo tendo sido observada redução no acúmulo de As quando as plantas foram expostas a  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1} \text{As}^{\text{III}}$ , observou-se que raízes e folhas sofreram maiores danos tóxicos, o que indica que o processo de efluxo de  $\text{As}^{\text{III}}$  não ocorreu imediatamente e não foi suficiente para evitar os distúrbios fisiológicos.

O maior acúmulo de  $\text{As}^{\text{V}}$  nas raízes e de  $\text{As}^{\text{III}}$  nas folhas observado nesse estudo, foi também observado em *Pteris vitata* submetida a essas formas químicas (Mathews et al. 2010). Esse fato pode ser decorrente da maior velocidade de transporte de  $\text{As}^{\text{III}}$  para a parte aérea e a redução de  $\text{As}^{\text{V}}$  a  $\text{As}^{\text{III}}$  nas folhas, sendo esse, posteriormente, transportado para os vacúolos para armazenamento (Bondada et al. 2004; Tu et al. 2004; Mathews et al. 2010).

Quando um metal tóxico ou metalóide é absorvido pelas plantas, um dos mecanismos envolvidos na tolerância é a limitação do transporte para a parte aérea, resultando em acúmulo, principalmente, no sistema radicular (Meharg e Macnair 1991). Estudos realizados com *Lycopersicon esculentum* revelaram que as concentrações de As na parte aérea de plantas são dependentes diretamente da atividade do sistema radicular, sendo que o transporte desse metalóide das raízes para a parte aérea é limitado pela alta toxicidade às membranas das células radiculares (Carbonell-Barrachina et al. 1995; Carbonell-Barrachina et al. 1997).

No entanto, quando a concentração de As nas raízes é excessivamente alta, ocorre o transporte de As para a parte aérea, sendo que o acúmulo de As nessa estrutura aumenta à medida que a concentração desse metalóide em solução também aumenta. O particionamento de As em raízes e parte aérea em plantas de alface parece apresentar resposta similar às outras espécies (Smith et al. 2008), ou seja, maior acúmulo de As em raízes do que em folhas, conforme também observado em *Snapsis alba* (Jedynak et al. 2010) e *Pteris vitata* (Wang et al. 2010).

O aumento no crescimento do sistema radicular, geralmente ocorre em plantas expostas a baixas concentrações de As. Embora a razão desse fato ainda não seja esclarecida, acredita-se que haja ligação com a nutrição de fosfato (Pi) (Carbonell-Barrachina et al. 1999; Rahman e Naidu 2009). Este fato é corroborado por esse estudo, já que houve aumento na absorção de P pelas raízes das plantas testadas (dados ainda não publicados). Resultados semelhantes foram encontrados por Carbonell et al (1998) e Tu e Ma (2003), em que plantas expostas a baixas concentrações de As tiveram aumento no crescimento e na absorção de P. O aumento de biomassa é, provavelmente, resultado do aumento de absorção de P, o qual é estimulado por uma deficiência de P induzida pelo As<sup>V</sup>, uma vez que o As<sup>V</sup> substitui o P em muitas rotas metabólicas, mas é incapaz de realizar suas funções. Adicionalmente, ocorre a participação de transportadores de baixa afinidade que atuam na manutenção da absorção de P em plantas tolerantes (Burlo et al. 1999; Smith et al. 2010).

Com o aumento da concentração de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, na solução nutritiva, observou-se redução da taxa de crescimento de plantas, que parece estar ligado à diminuição da fotossíntese e do processo respiratório e aos efeitos tóxicos das ROS geradas pela exposição ao As (Päivöke e Simola 2001; Mascher et al. 2002). A redução na TCR é

resposta à ação tóxica do As em diversas espécies vegetais, como *Canavalia ensiformis*, *Stizolobium aterrimum* (Nascimento 2007) e *Oriza sativa* (Shri et al. 2009).

A redução da taxa fotossintética, decorrente da exposição das plantas ao As, é considerado um dos mais danosos efeitos desse metalóide (Miteva e Merakchiyska 2002; Stoeva et al. 2005; Nascimento 2007; Silva 2008). Já que o As<sup>V</sup> é rapidamente reduzido a As<sup>III</sup>, a maioria dos efeitos tóxicos de As<sup>V</sup> pode ser na verdade devido ao seu produto de redução, o As<sup>III</sup> (Zhao et al. 2010), o que corrobora a resposta similar demonstrada por ambas as formas químicas.

Esses efeitos podem variar de acordo com a espécie estudada e com a concentração de As às quais as plantas são expostas, podendo ocorrer em apenas uma das fases da fotossíntese ou em ambas. Na fase fotoquímica da fotossíntese, o As pode interferir em nível da cadeia transportadora de elétrons, levando à alteração na formação de poder redutor (NADPH) e ATP e/ou ocasionar aumento da emissão de fluorescência ou liberação de energia na forma de calor. Na fase bioquímica, o As pode afetar a condutância estomática, restringindo a concentração de CO<sub>2</sub> na planta, ou inibindo a atividade da enzima RUBISCO (Silva 2008).

Em baixas concentrações de As pode ocorrer incremento na taxa fotossintética das plantas, conforme observado neste experimento. Este aumento corrobora o crescimento radicular dessa espécie, indicando que em baixas concentrações, o As<sup>V</sup> não exerce danos significativos às plantas. É provável que, neste caso, ocorram alterações na absorção de fosfato, resultando em respostas benéficas para a planta (Carbonell-Barrachina et al. 1999; Rahman e Naidu 2009).

A redução em A, E e g<sub>s</sub>, observado no presente estudo, são decorrentes, possivelmente, dos efeitos do As sobre o sistema radicular, o que provavelmente afetou a absorção de íons e água, resultando em limitações estomáticas (Meharg e Hartley-

Whitaker 2002; Stoeva e Bineva 2003; Stoeva et al. 2003/4; Nascimento 2007). A diminuição dos valores de  $A$  e  $g_s$  nas plantas de alface submetidas ao  $As^V$  e  $As^{III}$  sugere que ocorre limitação da condutância estomática, levando à diminuição de  $C_i$  e, em consequência, redução da fotossíntese (He et al. 2001). O  $As$  pode afetar também, a distribuição celular do  $Ca^{2+}$  (Li et al. 2006) e ABA (Parys et al. 1998), promovendo, também, a redução na condutância estomática e, em consequência, comprometendo as trocas gasosas (Nascimento 2007).

O aumento nos valores de  $C_i$  à medida que a concentração de  $As^V$  e  $As^{III}$  aumentava em solução, mesmo com a redução da condutância estomática, é um indicativo de que o  $As$  provocou danos diretos no processo de fixação do  $CO_2$ , provavelmente, através de diminuição do número e da atividade de enzimas relacionadas com o ciclo de Calvin, como por exemplo, a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO). Fato semelhante foi observado em plantas de *Mimosa caesalpinieafolia* (Costa 2007) e *Borreria verticillata* (Silva 2008). A diminuição da atividade da RUBISCO, provavelmente, ocorreu pela diminuição da concentração de  $P$  nas plantas, resultando em inibição da redução do carbono fotossintético (Weng et al. 2008).

A inalteração nos parâmetros de  $F_0$  e  $F_v/F_m$  indica que o complexo coletor de luz do fotossistema II (PSII) dessa espécie, não sofreu danos causados pelo  $As^V$  ou  $As^{III}$  e, ou de espécies reativas de oxigênio (ROS). Resultados semelhantes foram encontrados em *Canavalia ensiformis*, *Stizolobium aterrimum* (Nascimento 2007), *Mimosa caesalpineafolia* e *Psidium guineense* (Costa 2007), submetidas a concentrações tóxicas de  $As$ . Os resultados indicam que o efeito tóxico do  $As^V$  e  $As^{III}$  na membranas dos tilacóides não foi fator diretamente responsável pela redução na taxa fotossintética.

A redução de  $\Phi_{FSII}$  ocorreu, provavelmente, pela não renovação do acceptor final de elétrons ( $NADP^+$ ), ocasionada pela diminuição da fixação de  $CO_2$ , o qual é o maior

consumidor da energia dos fótons absorvidos pelo sistema antena. Esse processo pode levar a uma superredução da cadeia transportadora de elétrons, sendo que o excesso de energia de excitação, geralmente, induz rotas alternativas de transporte de elétrons, como o ciclo água-água e a fotorrespiração, os quais podem servir como dreno do excesso de elétrons para fora da cadeia transportadora de elétrons (ETR) (Weng et al. 2008). A diminuição de  $\Phi_{FSII}$  e ETR é acompanhada por aumento de NPQ, indicando que a maior parte de energia de excitação foi dissipada em processos não fotoquímicos e, provavelmente é parte do mecanismo protetor interno do aparato fotossintético, conforme sugere Maxwell e Johnson (2000) e Konrad (2005).

Não foram observados danos aos pigmentos cloroplastídicos analisados, razão pela qual, provavelmente, não ocorreram alterações nos valores de Fv/Fm e F<sub>0</sub>. Estes valores, quando alterados, são indicativos da diminuição da concentração ou de fotooxidação das clorofilas (He et al. 2001). Fica evidente, portanto, que as plantas de alface apresentam mecanismos eficientes de tolerância contra o estresse oxidativo promovido por As.

O acúmulo de carotenóide é considerado um dos mecanismos de tolerância utilizados por organismos para tolerar estresse oxidativo (Mallick e Mohn 2000). Os resultados do presente estudo, entretanto, não mostraram alteração na concentração desse pigmento, sendo resultados semelhantes encontrados por Esteves (2009) e Shaibur e Kawai (2009). Relatos de Stoeva e Bineva (2003) e Rahman et al (2007), mostram redução nos teores de clorofila total e carotenóides, enquanto, Päivöke e Simola (2001) e Nascimento (2007), relatam aumento nos teores destes pigmentos, os quais atuariam como parte do mecanismo de proteção ao estresse oxidativo induzido pelo As.

## 5. CONCLUSÃO

Após a exposição de plantas de alface ao  $As^V$  e  $As^{III}$ , por três dias, observou-se que, de maneira geral, essas formas químicas apresentaram toxicidades semelhantes sobre os parâmetros avaliados, promovendo reduções no crescimento, nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila *a*, embora não tenham alterado a concentração dos pigmentos cloroplastídicos. Ainda que essas alterações tenham sido observadas, essas plantas foram capazes de manter seu metabolismo, o que, somado à sua capacidade de acúmulo de As em folhas e raízes, tornam-nas um grande risco à saúde pública, pela inserção desse metalóide nas cadeias tróficas.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Viçosa por apoio financeiro.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abedin MJ, Meharg AA (2002) Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 243:57–66
- Bondada BR, Tu S, Ma LQ (2004) Absorption of frond-applied arsenic by the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. *Sci Total Environ* 332:61–70

- Burló F, Guijarro I, Carbonell-Barrachina AA, Valero D, Martinez-Sanchez F (1999) Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants, *J Agric Food Chem* 47:1247–1253
- Carbonell AA, Aarabi MA, Delaune RD, Gambrell RP, Patrick Jr WH (1998) Arsenic in wetland vegetation: availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. *Sci Total Environ* 217:189–199
- Carbonell-Barrachina AA, Burló F, Mataix J (1995) Arsenic uptake, distribution and accumulation in tomato plants: Effect of arsenite on plant growth and yield. *J Plant Nut* 18:1237–1250
- Carbonell-Barrachina AA, Burló JF, Burgos-Hernkdez A, López E, Mataix J (1997) The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. *Sci Hort* 71:167–176
- Carbonell-Barrachina AA, Burló F, Lopez E, Martinez-Sanchez F (1999) Arsenic toxicity and accumulation in radish as affected by arsenic chemical speciation. *J Environ Sci Health* 34:661–679
- Caporn SJM (1989) The effects of oxides of nitrogen and carbon dioxide enrichment on photosynthesis and growth of lettuce *Lactuca sativa* L. *New Phytol* 111:473–482
- Chaturvedi I (2006) Effects of arsenic concentrations and forms on growth and arsenic uptake and accumulation by indian mustard (*Brassica juncea* L.) genotypes. *J Cent Eur Agric* 7:31–40
- Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J Agric Food Chem* 23:458–460
- Costa AC (2007) Bases fisiológicas da ação do arsênio em algumas espécies de cerrado. Tese, Universidade Federal de Viçosa

- Esteves CSH (2009) Influência de aditivos em solos contaminados com arsénio na produção de hortícolas. Dissertação, Universidade Técnica de Lisboa
- He J, Lee SK, Dodd IC (2001) Limitations to photosynthesis of lettuce growth under tropical conditions: alleviation by root-zone cooling. *J Exp Bot* 52:1323–1330
- Heikens A, Panaullah GM, Meharg AA (2007) Arsenic behaviour from groundwater and soil to crops: impacts on agriculture and food safety. *Rev Environ Contam Toxicol* 189:43–87
- Hunt R (1978) *Plant growth analysis*. Edward Arnold Limited, London.
- Jedynak L, Kowalska J, Kossykowska M, Golimowski J (2010) Studies on the uptake of different arsenic forms and the influence of sample pretreatment on arsenic speciation in White mustard (*Sinapis alba*). *Microchem J* 94:125–129
- Konrad MLF, Silva JAB, Furlani PR, Machado EC (2005) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. *Bragantia* 64:339–347
- Lee JS, Lee SW, Chon HT, Kim KW (2008) Evaluation of human exposure to arsenic due to rice ingestion in the vicinity of abandoned Myungbong Au–Ag mine site, Korea. *J Geochem Explor* 96:231–235
- Li WX, Chen TB, Huang ZC, Lei M, Liao XY (2006) Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vitata* L. *Chemosphere* 62:803–809
- Mallick N, Mohn FH (2000) Reactive oxygen species: response of algal cells. *J Plant Physiol* 157:183–193
- Marin AR, Pezeshki SR, Masschenlyn PH, Choi HS (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. *J Plant Nut* 16: 865–880

- Mascher R, Lippmann B, Holzinger S, Bergmann H (2002) Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci* 163: 961–969
- Matschullat J (2000) Arsenic in the geosphere: a review. *Sci Total Environ* 249:297–312
- Mathews S, Ma LQ, Rathinasabapathi B, Nataraja S, Saha UK (2010) Arsenic transformation in the growth media and biomass of hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Biores Technol* 101:8024–8030
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot* 51:659–668
- Meharg AA, Macnair MR (1991) Uptake, accumulation and translocation of arsenate in arsenate-tolerant and non-tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytol* 117:225–231
- Meharg AA, Hartley-Whitaker J (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol* 154:29–43
- Milivojevic DB, Nikolic BR, Drinic G (2006) Effect of arsenic on phosphorus content in different organs and chlorophyll fluorescence in primary leaves of soybean. *Biol Plant* 50:149–151
- Mishra VK, Tripathi BD (2008) Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technol.* 99:7091–7097
- Miteva E, Merakchiyska M (2002) Response of chloroplasts and photosynthetic mechanism of bean plants to excess arsenic in soil. *Bulg J Agric Sci* 8:151–156
- Mulabagal V, Ngouajio M, Nair A, Zhang Y, Gottumukkala AL, Nair MG (2010) In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chem* 118:300–306

- Nascimento KJT (2007) Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa
- Nicolle C, Cardinault N, Gueux E, Jaffrelo L, Rock E, Mazur A (2004a). Health effect of vegetable-based diet: Lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. *Clin Nut* 23:605–614
- Nicolle C, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL, Rock E, Michel H, Amouroux P, Remesy CH (2004b). Characterization and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa*). *J Sci Food Agric* 84:2061–2069
- Päivöke AEA, Simola LK (2001) Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. *Ecotox Environ Saf* 49:111–121
- Panda SK, Upadhyay RK, Nath S (2010) Arsenic Stress in Plants. *J Agron Crop Sci* 196:161–174
- Parys E, Romanowska E, Siedlecka M, Poskuta JW (1998) The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiol Plant* 20:313–322
- Prado CHBA, Casali CA (2006) Fisiologia vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral. Editora Monole, Barueri
- Rahman MA, Hasegawa H, Rahman MM, Islam MN, Miah MAM, Tasmin A (2007) Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. *Chemosphere* 67:1072–1079
- Rahman F, Naidu E (2009) The influence of arsenic speciation (AsIII & AsV) and concentration on the growth, uptake and translocation of arsenic in vegetable crops (silverbeet and amaranth): greenhouse study. *Environ Geochem Health* 31:115–124

- Schoefs B, Bertrand M (2005) Chlorophyll biosynthesis – a review. In: Pessaraki M. (ed.): Handbook of Photosynthesis. Taylor & Francis, Boca Raton – London – New York
- Shaibur MR, Kawai S (2009) Effect of arsenic on visible symptom and arsenic concentration in hydroponic Japanese mustard spinach. *Environ Exp Bot* 67:65–70
- Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Tuli R (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotox Environ Saf* 72:1102–1110
- Silva KLF (2008) Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio. Tese, Universidade Federal de Viçosa
- Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci* 170:274–282
- Smedley PL, Kinniburgh DG (2002) A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl Geochem* 17:517–568
- Smith PG, Koch I, Reimer KJ (2008) Uptake, transport and transformation of arsenate in radishes (*Raphanus sativus*). *Sci Total Environ* 390:188–197
- Smith SE, Christophersen HM, Pope S, Smith FA (2010) Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. *Plant Soil* 327:1–21
- Stoeva N, Bineva T (2003) Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulg J Plant Physiol* 29:87–95
- Stoeva N, Berova M, Zlatev Z (2003/4) Physiological response of maize to arsenic contamination. *Biol Plant* 47:449–452
- Stoeva N, Berova M, Zlatev Z (2005) Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biol Plant* 49:293–296

- Tapio S, Grosche B (2006) Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res* 612: 215–246
- Tu S, Ma LQ (2003) Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth on the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. *Environ Exp Bot* 50:243–251
- Tu S, Ma LQ, MacDonald GE (2004) Arsenic absorption, speciation and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* in the presence of phosphorus. *Environ Exp Bot* 51:121–131
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H (2009) Mechanism to cope with arsenic or cadmium excess. *Curr Opin Plant Biol* 12:1–9
- Wang J, Zhao, FJ, Meharg AA, Raab A, Feldmann J, McGrath SP (2002) Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol* 130:1552–1561
- Wang X, Ma LQ, Rathinasabapathi B, Liu Y, Zeng G (2010) Uptake and translocation of arsenite and arsenate by *Pteris vittata* L.: Effects of silicon, boron and mercury. *Environ Exp Bot* 68:222–229
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144:307–313
- Weng XY, Xu HX, Yang Y, Peng HH (2008) Water-water cycle involved in dissipation of excess photon energy in phosphorus deficient rice leaves. *Biol Plant* 52:307–313.
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol* 181:777–794

Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA (2010) Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu Rev Plant Biol* 61:535–59

## ARTIGO II

### **Nutrição mineral e regulação enzimática ao estresse oxidativo induzido por arsenato e arsenito em plantas de alface**

#### **RESUMO**

A contaminação de plantas por arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) e arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) representa um grande risco à saúde pública, já que estudos epidemiológicos têm relacionado várias doenças com a ingestão de alimentos contaminados com esse metalóide. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  (6,6; 13,2; 26,4 e 52,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), na concentração dos nutrientes minerais cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), ferro (Fe), manganês (Mn) e cobre (Cu), na peroxidação de lipídios de membrana e nas atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidases totais (POX), catalase (CAT), redutase da glutathione (GR) e peroxidase do ascorbato (APX) em plantas de *Lactuca sativa* cv Hanson. As formas químicas  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  apresentaram, de forma geral, os mesmos efeitos tóxicos nas plantas testadas, tanto em folhas quanto nas raízes, com significativas alterações nas concentrações de macro e micronutrientes essenciais. Observou-se, também, aumento na peroxidação de lipídios de membrana, provavelmente, devido à ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pelo metalóide. Isso ficou evidente pelo aumento na atividade das enzimas SOD, POX, CAT e APX, nas folhas, e SOD, CAT e GR, nas raízes. Com a realização desse estudo, pôde-se observar que o  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  foram capazes de promover efeitos tóxicos nas folhas e raízes de plantas de alface, os quais foram atenuados pela atuação de mecanismos de tolerância.

*Palavras-chave:* arsênio, *Lactuca sativa* cv Hanson, nutrientes minerais, enzimas antioxidantes

## **ABSTRACT**

Plant contamination by arsenate ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) and arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) represents a great risk to the public health, since epidemiological studies have correlated many diseases to the ingestion of metalloids contaminated foods. So, this study aimed to evaluate the effect of different concentrations of  $\text{As}^{\text{V}}$  and  $\text{As}^{\text{III}}$  (6.6, 13.2, 26.4 and 52.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) on mineral nutrients concentration calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorus (P), iron (Fe), manganese (Mn) and copper (Cu), membrane lipid peroxidation and enzymes activities as superoxide dismutase (SOD), total peroxidases (POD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and ascorbate peroxidase (APX) in plants of *Lactuca sativa* cv Hanson. The chemical forms  $\text{As}^{\text{V}}$  and  $\text{As}^{\text{III}}$  showed, in a general way, the same toxic effects on tested plants, in leaves and roots, with significant changing in macro and micronutrients concentration. It was observed, also, an increment in membrane lipid peroxidation, probably due to the action of reactive oxygen species (ROS) that are induced by this metalloid. This was evident by the increment on the enzymes activities as SOD, POX, CAT and APX, in leaves, and SOD, CAT and GR, in roots. With the execution of this study, it was observed that  $\text{As}^{\text{V}}$  and  $\text{As}^{\text{III}}$  were capable to promote toxic effects in the leaves and roots of lettuce plants, which were attenuated by the activation of tolerance mechanisms.

*Keyword:* arsenic, *Lactuca sativa* cv Hanson, mineral nutrients, antioxidant enzymes

## 1. INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um metalóide encontrado na água, no solo e no ar a partir de fontes naturais e antrópicas. As formas inorgânicas, arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), presente em águas superficiais, e o arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), presente em águas subterrâneas, são consideradas as mais tóxicas e disponíveis para as plantas (Tripathi et al. 2007; Mishra et al. 2010).

Uma das maiores fontes de contaminação do homem por As é através da ingestão de água e produtos vegetais que tenham acumulado As durante a irrigação e o cultivo, com água poluída (Williams et al. 2006; Bienert et al. 2008; Ashan et al. 2010) e, vários estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação entre hábitos alimentares e o risco de doenças, com impacto direto na saúde, por contaminação com As (Mulabagal et al. 2010).

A alface (*Lactuca sativa* cv Hanson) é uma das hortaliças amplamente consumidas no mundo devido às suas características e propriedades terapêuticas (Mulabagal et al. 2010). A contaminação dessa espécie por As, portanto, representa um grande risco à saúde pública.

As plantas, normalmente, absorvem o  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  por meio de diferentes sistemas de transporte. O  $\text{As}^{\text{V}}$  é absorvido através de transportadores de fosfato ( $\text{P}^{\text{V}}$ ), já que são quimicamente semelhantes e, provavelmente, parte da toxicidade ocorre pela substituição do  $\text{P}^{\text{V}}$  pelo  $\text{As}^{\text{V}}$ , com consequência sobre sua principal fonte de energia – o ATP (Zhao et al. 2009; Wang et al. 2010). O  $\text{As}^{\text{III}}$  é absorvido através dos canais de aquaporinas, já que é encontrado no ambiente, predominantemente, na forma de  $\text{As}(\text{OH})_3$ , um composto neutro. Essa molécula possui grande afinidade pelos grupos sulfidrilas – SH, importantes componentes de enzimas e proteínas, o que pode levar à disfunção e morte celular (Zhao et al. 2009; Wang et al. 2010).

De acordo com Shri et al (2009), o As tem sido relacionado com o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais ocasionam o estresse oxidativo. Embora o As não tenha potencial de um metal redox, há evidência significativa, de que uma parte das ROS geradas se deve à conversão do  $As^V$  para  $As^{III}$ , processo que ocorre nas plantas assim que o  $As^V$  é absorvido (Hartley- Whitaker et al. 2001; Stoeva e Bineva 2003). Como o processo de redução de  $As^V$  ocorre rapidamente, entende-se que parte dos efeitos tóxicos do As está relacionado ao seu produto de redução, o  $As^{III}$  (Zhao et al. 2010).

As ROS, como ânions superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroxila ( $OH^{\bullet-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), são fortes agentes oxidantes que podem, direta ou indiretamente, danificar o DNA celular e biomoléculas, como lipídios e proteínas (Gunes et al. 2007; Gunes et al. 2009). Os danos aos lipídios constituintes das membranas podem alterar a sua permeabilidade e seletividade, alterando a absorção e transporte de nutrientes como o potássio, cálcio, magnésio, fósforo (Shaibur et al. 2008a; Maathuis 2009), conforme observado em arroz (Shaibur et al. 2006, 2008c) e cevada (Shaibur et al. 2008b). A diminuição da estabilidade das membranas decorrente da peroxidação de lipídios ocasionada pela exposição ao  $As^V$  e  $As^{III}$ , é mais severa em plantas com menor tolerância (Singh et al. 2006).

As respostas bioquímicas de plantas aos metais tóxicos são complexas e várias estratégias de defesa têm sido sugeridas, como o aumento na atividade de enzimas antioxidantes (dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases totais (POX), redutase da glutathione (GR) e peroxidase do ascorbato (APX)), assim como aumento na concentração de antioxidantes não-enzimáticos (ascorbato, glutathione e  $\alpha$ -tocoferol) (Gunes et al. 2009). A SOD é uma das enzimas induzidas primariamente, responsável pela desintoxicação dos ânions superóxidos. A conversão de  $H_2O_2$  em água

nos peroxissomos é promovida pela CAT, enquanto que no citosol e cloroplastos através do ciclo ascorbato-glutationa, que envolve APX e GR (Lee et al. 2007; Shri et al. 2009).

A avaliação das atividades das enzimas antioxidantes e da peroxidação de lipídios, têm sido comumente utilizados como indicadores de estresse oxidativo em plantas (Lee et al. 2007; Mishra et al. 2010).

Esse estudo, portanto, teve como objetivo avaliar o efeito do  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  na nutrição mineral e avaliar os indicadores de estresse oxidativo em plantas expostas a essas formas químicas de As.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

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

Plantas de *Lactuca sativa* cv Hanson foram obtidas após germinação em areia esterilizada, umedecida com solução nutritiva de Clark (1975) 1/5 força iônica e transferidas no 17º dia para vasos de polietileno contendo solução nutritiva de Clark (1975), pH 6,5, mantidos em ambiente com temperatura e luminosidade controladas ( $25 \pm 2$  °C,  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e fotoperíodo luminoso de 16 h, até o 40º dia, para obtenção de biomassa. As plantas foram tratadas com concentrações de 0,0; 6,6; 13,2; 26,4 e 52,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) (na forma de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) (na forma de  $\text{NaAsO}_2$ ), mantendo-as sob as condições laboratoriais supracitadas, por período de três dias. Após esse período, a plantas foram retiradas, lavadas com solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , seguido de lavagem em água desionizada e usadas, subsequentemente, para as análises experimentais.

## *2.2. Determinação da concentração de As e de nutrientes minerais*

Amostras de raiz e parte aérea de plantas de alface foram secas em estufa a 80 °C até obtenção de massa seca constante. Em seguida, 0,1 g desse material vegetal foi mineralizado com mistura nitro-perclórica (2:1), em um bloco digestor com temperatura controlada em torno de 100-120 °C até a completa oxidação do material vegetal (Marin et al. 1993). Análises para determinação da concentração de arsênio (As), cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), ferro (Fe), manganês (Mn) e cobre (Cu) foram realizadas em espectrofotômetro de emissão em plasma indutivamente acoplado (ICP) (OPTIMA 3300 DV, Perkin-Elmer) (Singh et al. 2006).

## *2.3. Determinação da peroxidação de lipídios*

A determinação dos produtos da peroxidação de lipídios foi realizada em termos de substâncias reativas do ácido barbitúrico (TBARS), de acordo com Heath e Packer (1968). A absorvância foi lida em 532 nm e corrigida a turbidez inespecífica através da subtração da absorvância da mesma em 600 nm. O coeficiente de extinção 155 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> foi utilizado para quantificar a concentração dos peróxidos de lipídios e os resultados foram expressos em nmol MDA g<sup>-1</sup> massa fresca.

## *2.4. Extração enzimática*

Para determinar a atividade enzimática, amostras de matéria fresca de raízes e folhas foram trituradas e homogeneizadas em um meio de extração constituído por tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido tetraacético etilenodiamina (EDTA) 0,1 mM,

fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (m/v) (Peixoto et al. 1999). As amostras foram, então, centrifugadas a  $12.000 \times g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

#### *2.4.1. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)*

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, EDTA 0,1 mM, nitroazul de tetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$  e riboflavina 2  $\mu\text{M}$ . A reação foi conduzida em câmara com lâmpada fluorescente 15-W a  $25^\circ\text{C}$ . Após 5 min de iluminação, a formação da formazana azul foi medida a 560 nm (Giannopolitis e Ries 1977). Os resultados foram corrigidos para atividade não-enzimática. Uma unidade de atividade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária pra promover 50% de inibição na taxa de redução de NBT.

#### *2.4.2. Determinação da atividade das peroxidases totais (POX, EC 1.11.1.7)*

A atividade de POX foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM (Kar e Mishra 1976). A absorbância foi medida durante o primeiro minuto de reação e a atividade enzimática foi estimada usando o coeficiente de extinção molar 420 nm;  $\epsilon$ :  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### *2.4.3. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)*

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM (Havir e Mchale 1987). A absorvância foi medida durante o primeiro minuto de reação e a atividade enzimática foi estimada usando o coeficiente de extinção molar 240 nm;  $\epsilon$ : 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### *2.4.4. Determinação da atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7)*

A atividade da GR foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, GSSG 1 mM e NADPH 0,1 mM (Carlberg e Mannervik 1985). A absorvância foi medida durante o primeiro minuto de reação e a atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar 340 nm;  $\epsilon$ : 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### *2.4.5. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)*

A atividade da APX foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM (Nakano e Asada 1981, modificado por Koshiha 1993). A absorvância foi medida durante o primeiro minuto de reação e a atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar 290 nm;  $\epsilon$ : 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Nakano e Asada 1981).

## 2.5. Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em blocos casualizados com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste-F,  $P < 0,05$ , seguidos pela análise do Teste Fisher's LSD,  $P < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Acúmulo de As

O acúmulo de As nas folhas e raízes das plantas de alface aumentou de forma contínua com o incremento da concentração de  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  na solução nutritiva, exceto para a concentração de  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1} \text{As}^{\text{III}}$ , onde se observou pequena redução no acúmulo de As, tanto em folhas quanto raízes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Concentração de As de folhas e raízes de plantas de alface, após três dias de exposição ao  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$ .

$\mu\text{mol L}^{-1}$	Concentração As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	
	Folhas	Raízes
0	0,00 c	0,00 d
6,6	24,64 b	245,73 c
$\text{As}^{\text{V}}$ 13,2	27,96 b	266,84 b
26,4	30,53 ab	279,75 b
52,8	34,94 a	319,72 a
0	0,00 d	0,00 e
6,6	18,40 c	176,21 d
$\text{As}^{\text{III}}$ 13,2	31,88 b	228,10 c
26,4	36,06 a	369,55 a
52,8	32,52 b	295,45 b

Valores são médias de três repetições.

Médias seguidas por letras diferentes daquelas do controle apresentam diferenças significativas a  $P < 0,05$ , conforme teste LSD.

### 3.2. Efeito do $As^V$ e $As^{III}$ sobre os parâmetros mineralógicos

**Cálcio** A presença de  $As^V$  em solução resultou em acréscimos na concentração de Ca nas folhas, em todos os tratamentos, mas com tendência de diminuição à medida que as concentrações de  $As^V$  aumentavam. A exposição ao  $As^{III}$ , por sua vez, promoveu acréscimos na concentração de Ca nas folhas apenas nos tratamentos com  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$   $As^{III}$ , não sendo observadas alterações estatísticas significativas nas concentrações superiores (Tabela 2). Nas raízes, a concentração de Ca foi maior do que o controle em todos os tratamentos. A concentração de Ca foi maior quando as plantas foram expostas ao  $As^{III}$ , exceto para  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em que foi observado aumento em 43,9% quando as plantas foram expostas ao  $As^V$  comparado ao aumento em 35,5% para  $As^{III}$  (Tabela 3).

**Magnésio** A exposição ao  $As^V$  não apresentou alterações estatisticamente significantes nas folhas de alface, enquanto o  $As^{III}$  promoveu aumento na concentração de Mg, para valores superiores aos encontrados no controle, em todas as concentrações, embora, tenham demonstrado uma tendência à redução com o incremento da concentração de  $As^{III}$  em solução (Tabela 2). Por outro lado, nas raízes, a concentração de Mg diminuiu quando comparada ao controle, independente da forma química de As testada, redução em 12,4% e 10,6%, para  $As^V$  e  $As^{III}$ , respectivamente, em  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Tabela 3).

**Tabela 2.** Concentração de macro e micronutrientes em folhas de alface, após três dias de exposição ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>.

Concentração de nutrientes em folhas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MS)						
$\mu\text{mol L}^{-1}$	Ca	Mg	P	Fe	Mn	Cu
0	10,232 c	2,939 a	0,131 a	0,143 a	0,150 c	0,008 c
6,6	13,898 a	3,968 a	0,142 b	0,158 a	0,205 a	0,010 ab
As <sup>V</sup> 13,2	13,554 ab	3,927 a	0,094 c	0,136 a	0,199 a	0,011 ab
26,4	12,306 abc	3,565 a	0,075 d	0,133 a	0,177 b	0,010 ab
52,8	11,657 bc	3,431 a	0,057 e	0,128 a	0,174 b	0,009 bc
0	10,232 c	2,939 d	0,131 a	0,143 a	0,150 bc	0,008 b
6,6	12,839 a	3,533 a	0,134 b	0,137 a	0,167 a	0,011 a
As <sup>III</sup> 13,2	9,718 c	3,356 b	0,085 c	0,126 a	0,150 bc	0,011 a
26,4	9,890 c	3,204 c	0,074 cd	0,122 a	0,140 c	0,011 a
52,8	9,623 c	3,105 c	0,064 d	0,117 a	0,135 d	0,011 a

Valores são médias de três repetições.

Médias seguidas por letras diferentes daquela do controle apresentam diferenças significativas a  $P < 0,05$ , conforme teste LSD.

*Fósforo* A concentração de  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> estimulou a absorção de P pelas raízes e, por consequência, maior transporte de P para as folhas. Foi observado um aumento em 7,7% e 2,3%, nas folhas, e 3,1% e 14,6%, nas raízes, para As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, respectivamente (Tabela 2 e 3). A partir dessa concentração de As, observou-se diminuição da concentração de P, a qual se manteve reduzindo à medida que a concentração do metalóide aumentava em solução, tanto para folhas quanto para raízes. De maneira geral, a concentração de P nas raízes foi maior do que nas folhas, independente de qual forma química de As em solução.

*Ferro* A concentração de Fe não foi alterada significativamente nas folhas de alface quando as plantas foram expostas ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, independente das concentrações testadas (Tabela 2). Entretanto, nas raízes, foi observado aumento na concentração de Fe quando as plantas foram expostas ao As<sup>V</sup>, tendo os valores apresentados tendência à

redução com o incremento da concentração de  $As^V$  solução, embora tenham mantido resultados superiores ao obtidos ao controle. Em relação ao  $As^{III}$ , foi observado resultados superiores aos obtidos no controle nas concentrações de  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1} As^{III}$  e  $13,2 \mu\text{mol L}^{-1} As^{III}$ . Entretanto, a partir dessas concentrações foi observado decréscimo na absorção desse micronutriente, sendo que em  $52,8 \mu\text{mol L}^{-1} As^{III}$ , observou-se redução em 34,4% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concentração de macro e micronutrientes em raízes de alface, após três dias de exposição ao  $As^V$  e  $As^{III}$ .

Concentração de nutrientes em raízes ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MS)						
$\mu\text{mol L}^{-1}$	Ca	Mg	P	Fe	Mn	Cu
0	6,238 b	1,720 a	0,129 b	0,549 d	0,121 a	0,018 b
6,6	6,421 b	1,349 b	0,133 a	0,771 a	0,066 b	0,020 a
$As^V$ 13,2	6,589 b	1,700 a	0,110 c	0,618 b	0,065 b	0,019 a
26,4	7,161 b	1,512 b	0,094 cd	0,599 bc	0,056 b	0,018 b
52,8	11,112 a	1,507 b	0,087 d	0,585 c	0,055 b	0,017 c
0	6,238 c	1,720 a	0,129 b	0,549 ab	0,121 a	0,018 d
6,6	7,339 bc	1,708 ab	0,151 a	0,668 a	0,063 b	0,023 a
$As^{III}$ 13,2	8,513 ab	1,621 bc	0,123 bc	0,557 ab	0,060 b	0,021 b
26,4	8,769 a	1,563 c	0,096 c	0,443 bc	0,056 b	0,020 bc
52,8	9,673 a	1,538 c	0,095 c	0,360 c	0,052 b	0,019 c

Valores são médias de três repetições.

Médias seguidas por letras diferentes daquelas do controle apresentam diferenças significativas a  $P < 0,05$ , conforme teste LSD.

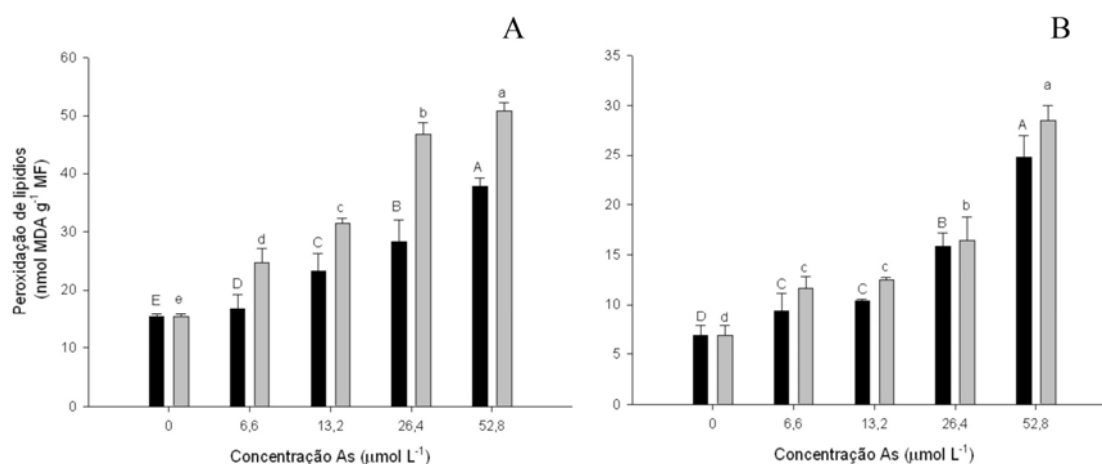
*Manganês* Nas folhas, a concentração de Mn foi superior ao controle quando as plantas foram expostas a diferentes concentrações de  $As^V$ , embora uma tendência à redução tenha sido observada com o incremento da concentração de  $As^V$  em solução. Por outro lado, quando as diferentes concentrações de  $As^{III}$  foram testadas, o aumento na concentração de Mn foi observado apenas em  $6,6 \mu\text{mol L}^{-1} As^{III}$ , sendo esse aumento em 10,2%. Na maior concentração de  $As^{III}$  o acúmulo desse nutriente foi reduzido em,

aproximadamente, 10,0% (Tabela 2). Nas raízes, ocorreu redução na concentração de Mn com o incremento de  $As^V$  e de  $As^{III}$  na solução, sendo de 54,5% e 57,0%, respectivamente, na maior concentração de As (Tabela 3).

*Cobre* As concentrações de Cu observadas nas folhas foi superior ao controle em todas as concentrações de  $As^V$  testadas, embora tenha sido notado uma tendência à redução nas mais altas doses. Nas plantas expostas ao  $As^{III}$  a concentração de Cu aumentou e se manteve inalterada com o incremento do metalóide em solução (Tabela 2). Nas raízes, a exposição das plantas às concentrações de 6,6 e 13,2  $\mu\text{mol L}^{-1} As^V$ , ocorreu aumento na concentração de Cu, diminuindo nas concentrações mais elevadas de  $As^V$ . Entretanto, quando as plantas foram expostas ao  $As^{III}$ , observou-se aumento da concentração de Cu para valores superiores aos encontrados nas plantas controle, em todas as concentrações testadas, embora tenha ocorrido tendência à redução nesses valores (Tabela 3).

### 3.3. Peroxidação de lipídios

O aumento na concentração de  $As^V$  e  $As^{III}$  em solução promoveu danos às membranas, indicado pelo aumento na produção de MDA nas folhas de 59,3% e 69,8%, na maior dose de  $As^V$  e  $As^{III}$ , respectivamente. (Fig. 1A).



**Figura 1.** Efeitos do As<sup>V</sup> (■) e As<sup>III</sup> (▒) na peroxidação de lipídios em folhas (A) e raízes (B), de plantas de alface após três dias de exposição. Barras representam desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes daquelas do controle apresentam diferenças significativas a P < 0,05, conforme teste LSD.

Comportamento similar foi demonstrado pelas raízes quando expostas ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, com incremento na produção de MDA de 63,7% e 73,7% em 52,8 μmol L<sup>-1</sup>, para As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, respectivamente (Fig. 1B). Os danos causados pelo As<sup>III</sup> foram mais severos que aqueles ocasionados pela exposição ao As<sup>V</sup>, tanto em folhas quanto nas raízes, principalmente na maior concentração de As.

### 3.4. Atividade enzimática

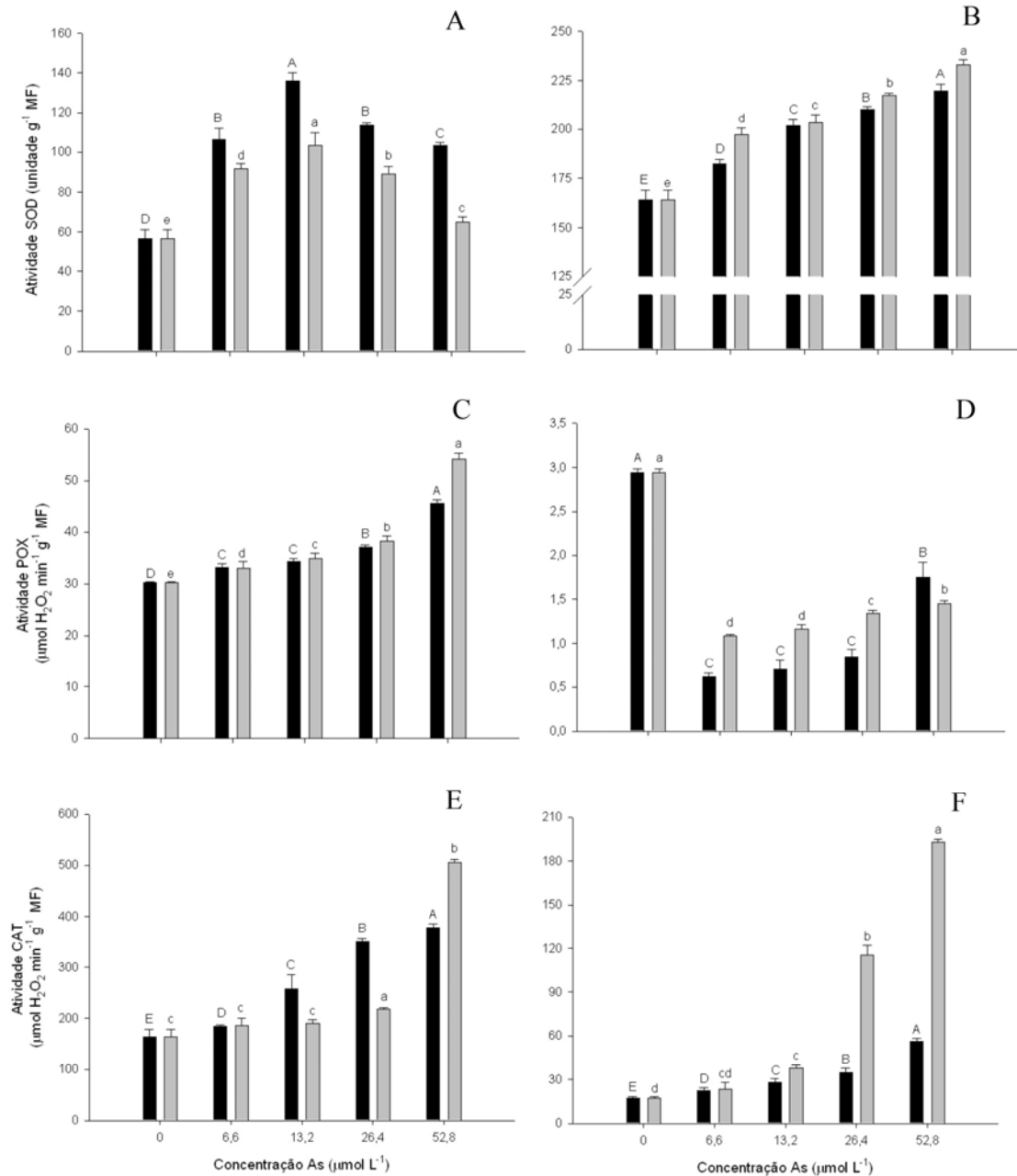
#### 3.4.1. Atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

As diferentes concentrações de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> afetaram significativamente a atividade da SOD nas folhas de alface. O pico de atividade foi atingido quando as plantas foram expostas a 13,2 μmol L<sup>-1</sup> de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, sendo alcançados aumento de 58,3% e 45,1%, respectivamente. Apesar de sofrer diminuição na atividade nas doses superiores de As, ainda foram valores significativamente maiores do que o controle (Fig. 2A). Nas raízes, a atividade de SOD foi muito maior do que a encontrada nas folhas, sendo que essa

atividade aumentou continuamente com o acréscimo na concentração de  $As^V$  e  $As^{III}$  em solução (Fig. 2B). A enzima SOD apresentou maior atividade nas folhas quando as plantas foram expostas ao  $As^V$ , enquanto nas raízes, após exposição ao  $As^{III}$ .

#### 3.4.2. Atividade das peroxidases totais (POX, EC 1.11.1.7)

Ocorreu aumento na atividade da POX nas folhas de alface com o incremento na concentração de  $As^V$  e  $As^{III}$  em solução. Entretanto, na maior concentração de As, verificou-se maior incremento nessa atividade quando as plantas foram expostas ao  $As^{III}$ , sendo obtidos valores 44,1% maiores que o controle (Fig. 2C). Nas raízes, a atividade da POX apresentou valores abaixo dos encontrados nas plantas controle, tanto para  $As^V$  quanto  $As^{III}$ , mas com tendência à elevação com o incremento da concentração do metalóide em solução, principalmente em resposta ao  $As^{III}$  (Fig. 2D). Os resultados obtidos demonstram que a participação dessa enzima na remoção de ROS é mais efetiva nas folhas, com resposta crescente à medida que as plantas foram expostas ao As.



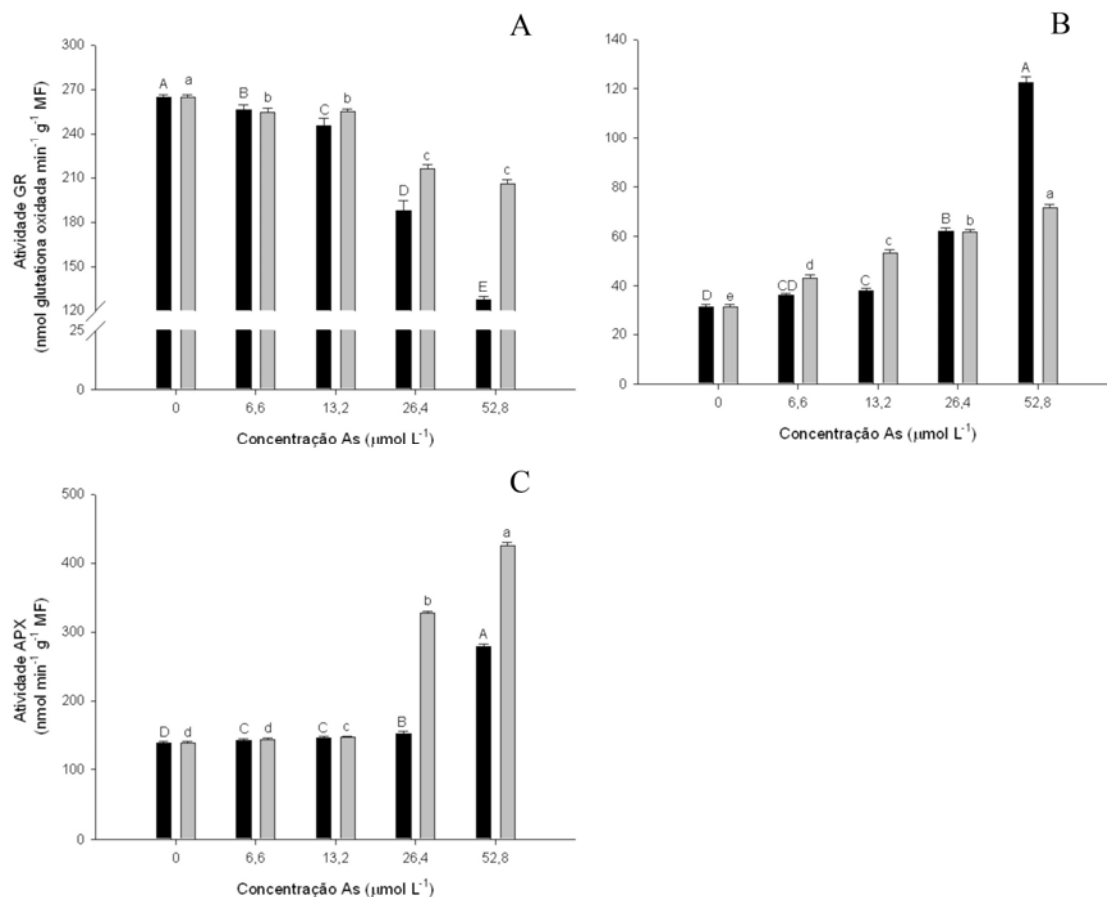
**Figura 2.** Efeitos do As<sup>V</sup> (■) e As<sup>III</sup> (▒) na atividade da dismutase do superóxido em folhas (A) e raízes (B); na atividade das peroxidases totais em folhas (C) e raízes (D) e na atividade da catalase em folhas (E) e raízes (F), em plantas de alface após três dias de exposição. Barras representam desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes daquelas do controle apresentam diferenças significativas a P < 0,05, conforme teste LSD.

#### 3.4.3. Atividade de catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT, nas folhas, aumentou em resposta ao incremento de As em solução, sendo mais expressiva nas plantas expostas ao As<sup>V</sup>, exceto na concentração de 52,8 µmol L<sup>-1</sup>As em que as atividades foram 56,8% e 67,7% maiores do que o controle, para As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, respectivamente (Fig. 2E). Nas raízes, essa atividade foi menor do que nas folhas e, neste caso, a enzima apresentou significativo acréscimo em resposta ao As<sup>III</sup>, atingindo valores 90,6% maiores do que o controle na concentração de 52,8 µmol L<sup>-1</sup> As<sup>III</sup> (Fig. 2F).

#### 3.4.4. Atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7)

A atividade da GR nas folhas foi menor do que aquela observada no controle, com a exposição das plantas às diferentes concentrações de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, sendo essa redução correspondente a 51,7% e 22,1%, para As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, respectivamente, na concentração de 52,8 µmol L<sup>-1</sup> (Fig. 3A). Nas raízes, ao contrário do observado nas folhas, essa enzima teve sua atividade aumentada à medida que a concentração de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> aumentou em solução, sendo esse incremento de 74,8 % e 56,3 %, respectivamente, na concentração de 52,8 µmol L<sup>-1</sup> (Fig. 3B).



**Figura 3.** Efeitos do As<sup>V</sup> (■) e As<sup>III</sup> (■) na atividade da redutase da glutatona em folhas (A) e raízes (B) e na atividade da peroxidase do ascorbato em folhas (C), em plantas de alface após três dias de exposição. Barras representam desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes daquelas do controle apresentam diferenças significativas a P < 0,05, conforme teste LSD.

### 3.4.5. Atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A exposição das plantas à concentração de 6,6 µmol L<sup>-1</sup> de As<sup>III</sup> não resultou em significativa alteração na atividade da APX nas folhas. Entretanto, nas concentrações maiores de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> houve incremento na atividade dessa enzima, principalmente nas plantas expostas ao As<sup>III</sup>, alcançando valores 59,8% maiores do que o controle na concentração de 52,8 µmol L<sup>-1</sup> de As<sup>III</sup> (Fig. 3C). Nas raízes, por sua vez, não foi observada atividade da APX para nenhuma das concentrações de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> (dados não demonstrados).

#### 4. DISCUSSÃO

O  $\text{As}^{\text{III}}$  é considerado mais fitotóxico do que o  $\text{As}^{\text{V}}$ , já que é capaz de se ligar aos grupos sulfidrilas e, em contato direto com as membranas, pode causar danos estruturais e afetar significativamente a absorção e transporte de nutrientes e água (Carbonell-Barrachina et al. 1997; Carbonell-Barrachina et al. 1998; Paivöke e Simola 2001). As alterações celulares, justamente com a redução do crescimento radicular e da área de superfície da raiz disponível para absorção, podem explicar as alterações no balanço mineral das plantas (Smith et al. 2010), sendo tal fato observado nesse estudo, em que a exposição das plantas ao  $\text{As}^{\text{V}}$  e  $\text{As}^{\text{III}}$  afetou o acúmulo de nutrientes essenciais nas raízes e nas folhas. O distúrbio na composição de macro e micronutrientes pode alterar a toxicidade de As nas plantas, conforme observado em arroz (Shaibur et al. 2006, 2008c), cevada (Shaibur et al. 2008b) e sorgo (Shaibur et al. 2008a).

O aumento na absorção de Ca, Mg e P pelas plantas expostas a metais e metalóides é muito comum, já que são capazes de formar quelatos com os elementos tóxicos, ligando-os ao apoplasto ou depositando-os no vacúolo, tornando-os não disponíveis e, dessa forma, ocorre indução à absorção de maior quantidade dos nutrientes (Haque et al. 2009). Além desse papel na destoxificação, o Ca atua como mensageiro secundário na regulação do metabolismo, o Mg é átomo central na molécula de clorofila e, o P é essencial para as reações que envolvem ATP (Taiz e Zeiger 2009).

Dentre os nutrientes afetados pela exposição das plantas ao As, o P tem sido amplamente estudado e alguns trabalhos relatam que baixas concentrações de As foram capazes de aumentar a absorção de P pelas plantas (Carbonell et al. 1998), possivelmente devido a uma deficiência de P, já que o  $\text{As}^{\text{V}}$  pode substituir o P nas plantas, mas não é capaz de realizar suas funções (Burló et al. 1999). Além disso, o

transportador de baixa afinidade de fosfato (Pi) poderia manter a absorção de P adequada ao crescimento de plantas (Smith et al. 2010).

Aumento na concentração de outros nutrientes, como o Ca, Fe, Mg, Mn e Cu, tem sido relatado em plantas de mamona expostas ao As (Melo et al. 2009), enquanto que a diminuição na concentração de Cu e Mn foi observada em plantas de tomate (Carbonell-Barrachina et al. 1994) expostas ao As<sup>III</sup>. Alterações na absorção e acúmulo de nutrientes minerais foram também observadas em *Spartina alterniflora* (Carbonell et al. 1998) e *Triticum aestivum* (Liu et al. 2008), expostas ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>.

De maneira geral, no presente estudo, as concentrações desses nutrientes, embora maiores do que o controle, apresentaram tendência à diminuição à medida que a concentração de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> aumentou em solução, possivelmente devido aos efeitos tóxicos desse metalóide no sistema radicular das plantas. Essa toxicidade causa alteração na seletividade e permeabilidade das membranas celulares, resultando em menor absorção dos nutrientes e por consequência, menor transporte para as folhas, conforme observado, também, por Shaibur et al (2009).

A exposição das plantas ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> estimula a produção de ROS, revelando uma relação entre a sensibilidade ao metal e a peroxidação de lipídios – aumento no acúmulo de MDA – devido aos danos de membrana (Gunes et al. 2009; Shri et al. 2009), sendo este, um dos parâmetros usados para estimar o grau do estresse oxidativo (Verma e Dubey 2003).

Os danos causados à integridade da membrana é decorrente, principalmente, da ação do As<sup>III</sup> (Chakrabarty et al. 2009) e, mesmo quando a exposição das plantas se deve ao As<sup>V</sup>, já que esse é rapidamente convertido em As<sup>III</sup> (Zhao et al. 2010), o que corrobora o comportamento similar demonstrado por ambas as formas químicas. Altas concentrações de MDA têm sido observadas em *Holcus lanatus* (Hartley-Whitaker et al.

2001), em *Phaseolous vulgaris* (Stoeva et al. 2005), em *Oryza sativa* (Shri et al. 2009) e em *Nasturtium officinale* (Ozturk et al. 2010) expostas à toxicidade do As<sup>V</sup> e/ou As<sup>III</sup>.

Embora a exposição ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> tenham ocasionado aumento na produção de ROS, fato observado pelo aumento nos níveis de MDA, essas não foram capazes de danificar as membranas dos cloroplastos assim como os teores dos pigmentos fotossintéticos das plantas de alface (dados ainda não publicados). Resultados semelhantes foram observados por Nascimento (2007) quando plantas de *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* foram expostas a níveis tóxicos de As.

O aumento na geração de ROS, resultante da exposição de plantas a compostos tóxicos, causa danos oxidativos em biomoléculas e estruturas subcelulares. Como prevenção a esses danos, as plantas apresentam mecanismos de tolerância que envolvem a ativação de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, os quais são usados como indicadores do estresse oxidativo em plantas (Mittler 2002; Gunes et al. 2009; Mishra et al. 2010).

Aumento na atividade de SOD em resposta à toxicidade de As<sup>V</sup> e/ou As<sup>III</sup> tem sido observado em *Holcus lanatus* (Hartley-Whitaker et al. 2001), em *Zea mays* (Requejo e Tena 2005) e em *Pteris vitata* (Srivastava et al. 2005), assim como observado nesse estudo. Entretanto, nas folhas, a atividade de SOD apresentou tendência à redução embora seus valores não tenham sido inferiores ao controle, conforme também observado por Srivastava et al (2007) e Duquesnoy et al (2010). A tendência à redução da atividade da SOD é, possivelmente, explicada por substituição por outro sistema enzimático, já que essa enzima é considerada como primeira defesa celular contra o estresse oxidativo ou por um processo de inibição. Essa redução não foi observada nas raízes, indicando que, neste caso, há maior tolerância quando comparada às folhas.

O aumento da atividade da SOD resulta na formação de maiores quantidade de  $H_2O_2$ , o que pode causar danos oxidativos. Neste caso, esse aumento na geração de  $H_2O_2$  deve ser acompanhado pelo aumento da atividade de outras enzimas responsáveis por sua eliminação, como CAT, APX e GPX (Mishra et al. 2010). Essa resposta é coerente com o resultado obtido no presente estudo e por Duquesnoy et al (2010), em que altas concentrações de  $As^V$  e  $As^{III}$  aumentaram a atividade da CAT, tanto em folhas quanto raízes. Aumento na atividade de APX nas folhas foi, também, observado em *Zea mays* (Duquesnoy et al. 2010) e em *Oriza sativa* (Shri et al. 2009).

A atividade da POX aumentada nas folhas é indicativo de que altas concentrações de  $H_2O_2$  estão sendo formadas, e que, portanto, necessita da ativação de outras enzimas de defesa. Essa resposta enzimática foi observada em *Canavalia ensiformis* (Nascimento 2007), *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* (Felipe et al. 2009) expostas às concentrações tóxicas de  $As^V$ , e em *Oriza sativa* (Shri et al. 2009) quando expostas ao  $As^V$  e  $As^{III}$ . Entretanto, nas raízes, a atividade dessa enzima foi menor que a encontrada nas plantas-controle, possivelmente devido ao equilíbrio existente entre as atividades da CAT, SOD, POX e APX. Esse equilíbrio é essencial para manter as ROS num nível aceitável e não prejudicar o funcionamento celular. Assim, caso a atividade da POX seja reduzida, inadequada ou não-estimulada, outras enzimas responsáveis pela inativação do  $H_2O_2$ , como CAT, GPX terão suas atividades aumentadas (Gratão et al. 2005, Duquesnoy et al. 2010), conforme foi observado no presente estudo. Essa resposta foi obtida, também, em *Lycopersicum esculentum* (Miteva et al. 2005), *Cajanus cajan* (Felipe et al. 2009) e *Oriza sativa* (Shri et al. 2009).

Segundo Shri et al (2009), as enzimas POX e GR apresentam atividades com tendências contrárias, o que poderia ser devido ao mecanismo de proteção diferenciado operante nas folhas e raízes. Essa resposta foi observada no presente estudo em que

obteve diminuição da GR e aumento de POX nas folhas, ocorrendo o contrário nas raízes. A diminuição de GR nas folhas e o aumento nas raízes, também foi observada em *Stizolobium aterrimum* (Nascimento 2007), o que poderia justificar a atuação eficiente desse mecanismo nas raízes, sítio primário de dano celular, uma vez que a GR é capaz de manter os teores adequados de glutathione reduzida, fundamental para o funcionamento do ciclo ascorbato-glutathione, o qual está associado ao mecanismo de tolerância das plantas ao estresse oxidativo (Mittler 2002).

## 5. CONCLUSÃO

As formas químicas do As, As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup>, apresentaram, de forma geral, os mesmos efeitos tóxicos em plantas de alface. Entretanto, as respostas variaram dependendo da parte da planta analisada, o que indica que os mecanismos de tolerância atuam com diferentes intensidades em cada parte da planta. Embora As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> tenham sido capazes de promover danos diretos e indiretos, como o estresse oxidativo em plantas de alface, o que resultou em alteração na nutrição mineral e nas membranas, observou-se aumento na atividade de enzimas antioxidantes, no intuito de remover o excesso de ROS e, dessa forma, proteger as plantas da ação tóxica intensa do As. Sendo a *Lactuca sativa* L., hortaliça de grande difusão mundial, a existência de mecanismos de tolerância por essa espécie ao As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> representa um grande risco à saúde pública, uma vez que um dos principais danos à saúde do homem está na ingestão crônica de alimentos contaminados.

## 6. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Viçosa por financiamento.

## 7. REFERÊNCIAS

- Ahsan N, Lee DG, Kim KH, Alam I, Lee SH, Lee KW, Lee H, Lee BH (2010) Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere* 78:224–231
- Bienert GP, Thorsen M, Schüssler MD, Nilsson HR, Wagner A, Tamás MJ, Jahn TP (2008) A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of  $\text{As}(\text{OH})_3$  and  $\text{Sb}(\text{OH})_3$  across membranes. *BMC Biol* 6:26
- Burló F, Guijarro I, Carbonell-Barrachina AA, Valero D, Martinez-Sanchez F (1999) Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants, *J Agric Food Chem* 47:1247–1253
- Carbonell AA, Aarabi MA, Delaune RD, Gambrell RP, Patrick Jr WH (1998) Arsenic in wetland vegetation: availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. *Sci Total Environ* 217:189–199
- Carbonell-Barrachina AA, Burlo F, Mataix Beneyto J (1994) Effect of arsenite on the concentrations of micronutrients in tomato plants grown in hydroponic culture. *J Plant Nut* 17:1887–1903

- Carbonell-Barrachina AA, Burlo JF, Burgos-Hernkdez A, López E, Mataix J (1997) The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. *Sci Hort* 71:167–176
- Carbonell-Barrachina AA, Burlo F, Lopez E, Mataix J (1998) Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) *J Plant Nut* 21:235–244
- Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:484–495
- Chakrabarty D, Trivedi PK, Misra P, Tiwari M, Shri M, Shukla D, Kumar S, Rai A, Pandey A, Nigam D, Tripathi RD, Tuli R (2009) Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere* 74:688–702
- Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J Agric Food Chem* 23: 458–460
- Duquesnoy I, Champeau GM, Evray G, Ledoigt G, Piquet-Pissaloux A (2010) Enzymatic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Zea mays* and genotoxic effect of arsenic in root tips of *Vicia faba* and *Zea mays*. *C R Biologies* 333:814–824
- Felipe RTA, Oliveira JA, Leão GA (2009) Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. *R Árvore* 33:245–254
- Giannopolis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases. *Plant Physiol* 59:309–314
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo AR (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32:481–494

- Gunes A, Inal A, Bagci EG, Pilbeam DJ (2007) Silicon-mediated changes of some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach and tomato grown in sodic-B toxic soil. *Plant Soil* 290:103–114
- Gunes A, Pilbeam DJ, Inal A (2009) Effect of arsenic–phosphorus interaction oxidative stress in chickpea plants. *Plant Soil* 314:211–220
- Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Bookum WT, Schat H, Meharg AA (2001) Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol* 126:299–306
- Haque N, Peralta-Videa JR, Duarte-Gardea M, Gardea-Torresdey JL (2009) Differential effect of metals/metalloids on the growth and element uptake of mesquite plants obtained from plants grown at a copper mine tailing and commercial seeds. *Biores Technol* 100:6177–6182
- Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84: 450–455
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57:315–319
- Koshihara T (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiol* 34:713–721
- Lee SH, Ahsan N, Lee KW, Kim DH, Lee DG, Kwak SS, Kwon SY, Kim TH, Lee BH (2007) Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J Plant Physiol* 164:1626–1638

- Liu Q, Hu C, Tan Q, Sun X, Su J, Liang Y (2008) Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum estivum* L.) under hydroponic conditions. *Ecotox Environ Saf* 72:1102–1110
- Maathuis FJM (2009) Physiological functions of mineral macronutrients, *Curr Opin Plant Biol* 12:250–258
- Marin AR, Pezeshki SR, Masschenlyn PH, Choi HS (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. *J Plant Nut* 16:865–880
- Melo EEC, Costa ETS, Guilherme LRG, Faquin V, Nascimento CWA (2009) Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. *J Hazard Mat* 168:479–483
- Mishra S, Jha AB, Dubey RS (2010) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma*. DOI 10.1007/s00709-010-0210-0
- Miteva E, Hristova D, Nenova V, Maneva S (2005) Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. *Sci Hort* 105:343–358
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410
- Mulabagal V, Ngouajio M, Nair A, Zhang Y, Gottumukkala AL, Nair MG (2010) In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chem* 118:300–306
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol* 22:867–880.

- Nascimento KJT (2007) Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa
- Ozturk F, Duman F, Leblebici Z, Temizgul (2010) Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environ Exp Bot* 69:167–174
- Päivöke AEA, Simola LK (2001) Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. *Ecotox Environ Saf* 49:111–121
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim MA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *R Bras Fisiol Veg* 11:137–143
- Requejo R, Tena M. 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry* 66:1519–28
- Shaibur MR, Kitajima N, Sugawara R, Kondo T, Huq SMI, Kawai S (2006) Physiological and mineralogical properties of arsenic-induced chlorosis in rice seedlings grown hydroponically. *Soil Sci Plant Nut* 52:691–700
- Shaibur MR, Kitajima N, Sugawara R, Kondo T, Alam S, Imamul Huq S M, Kawai S (2008a) Critical toxicity level of arsenic and elemental composition of arsenic-induced chlorosis in hydroponic sorghum. *Water Air Soil Pollut* 191:279–292
- Shaibur MR, Kitajima N, Sugawara R, Kondo T, Imamul Huq SM, Kawai S (2008b) Physiological and mineralogical properties of arsenic-induced chlorosis in barley seedlings grown hydroponically. *J Plant Nut* 31:333–353
- Shaibur MR, Imamul Huq SM, Kawai S (2008c) Arsenic–iron interaction: Effect of additional iron on arsenic induced chlorosis in hydroponic rice. *Proceedings of the*

International Conference on Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry. Sapporo, Japan: Hokkaido University Conference Hall.

- Shaibur MR, Kawai S (2009) Effect of arsenic on visible symptom and arsenic concentration in hydroponic Japanese mustard spinach. *Environ Exp Bot* 67:65–70
- Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Tuli R (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotox Environ Saf* 72:1102–1110
- Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci* 170:274–282
- Smith SE, Christophersen HM, Pope S, Smith FA (2010) Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. *Plant Soil* 327:1–21
- Srivastava M, Ma LQ, Singh N (2005) Antioxidant responses of hyperaccumulator and sensitive fern species to arsenic. *J Exp Bot* 56:1335–1342
- Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD, Dwivedi S, Trivedi PK, Tandon PK (2007) Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Environ Sci Technol* 41:2930–2936
- Stoeva N, Bineva T (2003) Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulg J Plant Physiol* 29:87–95
- Stoeva N, Berova M, Zlatev Z (2005) Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biol Plant* 49:293–296
- Taiz L, Zeiger E (2009) *Fisiologia Vegetal*. Artmed Editora S.A., Brasil

- Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJM (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. Trends Biotech 25:158–165
- Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci 164:645–655.
- Wang X, Ma LQ, Rathinasabapathi B, Liu Y, Zeng G (2010) Uptake and translocation of arsenite and arsenate by *Pteris vittata* L.: Effects of silicon, boron and mercury. Environ Exp Bot 68:222–229
- Williams PN, Islam MR, Adomako EE, Raab A, Hossain SA, Zhu YG, Feldmann J, Meharg AA (2006) Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters. Environ Sci Technol 40:4903–4908.
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. New Phytol 181:777–794
- Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA (2010) Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. Annu Rev Plant Biol 61:535–59

## CONCLUSÕES GERAIS

A exposição de plantas de alface (*Lactuca sativa* cv Hanson), por três dias, ao  $As^V$  e  $As^{III}$ , resultou em diversas alterações no metabolismo das plantas. Essas formas químicas do As, de modo geral, apresentaram mesmo comportamento de toxicidade nos parâmetros avaliados, diferenciando-se um pouco de acordo com a estrutura vegetal.

A exposição ao  $As^V$  e  $As^{III}$ , resultou em acúmulo de As nas folhas e raízes, o qual promoveu alteração no crescimento, nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila *a*, embora não tenham alterado a concentração dos pigmentos cloroplastídicos. Esse metalóide promoveu, ainda, danos ao sistema radicular e, provavelmente, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em peroxidação dos lipídios de membrana e alteração na absorção de água e nutrientes minerais.

Entretanto, observou-se que as plantas de alface foram capazes de ativar mecanismos de tolerância, como o aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante e da concentração de nutrientes minerais, os quais impedem que danos mais severos sejam causados pelo estresse oxidativo, ajudando na manutenção do metabolismo normal dessa espécie. Associado a isso, a capacidade de acúmulo de As nas plantas de alface expostas ao  $As^V$  e  $As^{III}$ , em locais contaminados, colocam essas plantas como potencial risco à saúde pública, graças à inserção desse metalóide nas cadeias tróficas e a contaminação crônica do homem por alimentos contaminados.