

GABRIELA ALVES LEÃO

**ARSÊNIO EM PLANTAS AQUÁTICAS: ABSORÇÃO, TOXICIDADE, NUTRIÇÃO E
METABOLISMO DA GLUTATIONA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

GABRIELA ALVES LEÃO

**ARSÊNIO EM PLANTAS AQUÁTICAS: ABSORÇÃO, TOXICIDADE,
NUTRIÇÃO E METABOLISMO DA GLUTATIONA**

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

APROVADA: 22 de outubro de 2010.

Marco Aurélio Pedron e Silva
(Co-orientador)

Sylvia Therese Meyer

João Marcos Araújo

Luzimar Campos da Silva

Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

Ao Tiago, como reconhecimento de todo seu incentivo, força, luz,
companheirismo e amor, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Ao Juraci pela orientação e pelo exemplo de vida, sempre lembrando a importância das “pequenas” coisas da vida. Muito mais que um orientador!

Aos Professores Marco Aurélio e Sérgio pelo apoio nos momentos em que precisei.

Aos membros da banca João Marcos, Sylvia e Luzimar pela disponibilidade em analisar este material.

Às amigas Maíra, Rafaella e Fernanda. Sem vocês a conclusão desse trabalho seria impossível!

Aos colegas do curso de biologia, aos colegas de mestrado e doutorado, aos colegas de laboratório, aos amigos de repúblicas, aos amigos da Paróquia Nossa Senhora de Fátima por tornarem alegres meus momentos em Viçosa.

À minha mãe e aos meus irmãos pelo carinho e apoio incondicional ao longo de todos esses anos de estudos.

À minha pequena família, Tiago e Rafinha, por tudo!

A Deus.

BIOGRAFIA

Gabriela Alves Leão, filha de Izabel Alves dos Santos e Jonas Nascimento dos Santos, nasceu em 22 de abril de 1980, em Itabuna, BA.

Em janeiro de 2005, graduou-se em Ciências Biológicas, bacharelado e licenciatura, pela Universidade Federal de Viçosa.

Iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal também na Universidade Federal de Viçosa em março de 2005 e, em setembro de 2006 defendeu sua dissertação.

Em outubro de 2006 iniciou o doutorado também em Fisiologia Vegetal nessa mesma universidade e, em outubro de 2010, submeteu-se à defesa de tese.

RESUMO

LEÃO, Gabriela Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2010. **Arsênio em plantas aquáticas: absorção, toxicidade, nutrição e metabolismo da glutathione.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Co-orientadores: Marco Aurélio Pedron e Silva e Sérgio Oliveira de Paula.

A toxicidade do arsênio (As) e seus efeitos no metabolismo da glutathione foram analisados em duas espécies vegetais: *Lemna gibba* e *Salvinia minima*. As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, foram expostas ao arsênio nas concentrações de 0,0 e 1,0 mg L⁻¹, por três dias. As duas espécies vegetais acumularam As em seus tecidos quando expostas a esse elemento, sendo que *L. gibba* apresentou teor de As onze vezes maior que *S. minima*. As reduções na taxa de crescimento relativo em *L. gibba* e em *S. minima* foram de 25,24 % e 38,79 %, respectivamente. Diferentemente dos teores de ânion superóxido que não apresentaram variações significativas, os teores de peróxido de hidrogênio aumentaram nas duas macrófitas aquáticas. Em *L. gibba* não houve alteração do teor de MDA, enquanto em *S. minima* ocorreu aumento de 85 %. Nas duas espécies vegetais estudadas, os teores de pigmentos cloroplásticos apresentaram reduções, exceto o teor de carotenóides em *L. gibba* que não apresentou variação. Embora a exposição das plantas ao As não tenha alterado os teores de ferro e manganês, ocorreu diminuição nos teores de cálcio e magnésio. Tanto em *L. gibba* quanto em *S. minima* ocorreu diminuição na absorção de fosfato bem como nos teores de fósforo após exposição ao As. Em *L. gibba* ocorreu aumento na absorção de sulfato e nos teores de enxofre na planta, o que não foi observado em *S. minima*. Diminuições nos teores de glutathione foram observadas na presença de As nas duas espécies. Todas as enzimas do metabolismo da glutathione analisadas (sulfurilases do ATP, sintetases da -glutamilcisteína, peroxidases da glutathione, sulfotransferases da glutathione e redutases da glutathione) apresentaram aumento de atividade em *L. gibba* com a exposição ao As, enquanto em *S. minima* houve aumento de atividade apenas das redutases da glutathione. Baseando-se no teor de As absorvido pelas plantas, o estresse induzido pelo As em *L. gibba* deveria ser onze vezes maior

que em *S. minima*. Entretanto, *S. minima*, além de apresentar maiores teores de intermediários reativos de oxigênio apresentou sintomas de toxidez mais intensos que *L. gibba* após o período de exposição ao As. Dessa forma, *L. gibba*, uma possível hiperacumuladora de As, parece possuir sistema de defesa mais eficiente para mitigar o estresse induzido por esse metalóide, envolvendo participação de substâncias e enzimas do metabolismo antioxidativo e da glutatona.

ABSTRACT

LEÃO, Gabriela Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2010. **Arsenic in aquatic plants: absorption, toxicity, nutrition and glutathione metabolism.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisers: Marco Aurélio Pedron e Silva and Sérgio Oliveira de Paula.

Arsenic (As) toxicity and its effects on glutathione metabolism were analyzed in two vegetal specimens: *Lemna gibba* and *Salvinia minima*. Plants were cultivated in nutrient solution, pH 6.5, and exposed to arsenic concentrations of 0.0 and 1.0 mg L⁻¹, for three days. Both species accumulated As in their tissues when exposed to this element, being this accumulation eleven times higher in *L. gibba* than in *S. minima*. The relative growth rate reduction of *L. gibba* and *S. minima* was about 25.24 % and 38.79 %, respectively. Differently from the superoxide anion content that hasn't showed significant variations, the hydroxide peroxide content increased in both aquatic macrophytes. In *L. gibba*, there weren't changes on MDA content, while in *S. minima*, an increment of it around 85 % has occurred. In both species studied, chloroplastic pigments showed reduction in their content, except for carotenoids content in *L. gibba* which didn't show any variation. Although As exposure to plants hasn't changed iron and manganese content, a decrement of calcium and magnesium content has occurred. Both *L. gibba* and *S. minima* showed a decrement in phosphate absorption as well as on phosphorus content after As exposure. *L. gibba* showed an increment on sulphate absorption and on plant sulfur content which haven't been observed in *S. minima*. The reduction on glutathione content was observed when both plants were exposed to As. All the glutathione metabolism enzymes that were analyzed (ATP sulphurylase, γ -glutamylcysteine sintetases, glutathione peroxidase, glutathione sulphotranspherase and glutathione reductase) showed an increment on their activities in *L. gibba* exposed to As while in *S. minima* there was an increment only in glutathione reductase activity. Based on As content absorbed by the plants, the stress induced by As in *L. gibba* should be eleven times higher than in *S. minima*. However, *S. minima*, besides showing

higher content of reactive oxygen species, it showed toxicity symptoms more intensively than in *L. gibba* after As exposure. So, *L. gibba*, a possible As hyperaccumulator, seems to have a defense system more efficient to mitigate the stress induced by this metalloid, which involves the participation of substances and enzymes of the antioxidative and glutathione metabolism.

CONTEÚDO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1. Obtenção, aclimação e exposição das plantas ao arsenato	4
2.2. Determinação da concentração interna de arsênio	4
2.3. Determinação da taxa de crescimento relativo	4
2.4. Determinação do teor de ânion superóxido	5
2.5. Determinação do teor de peróxido de hidrogênio	5
2.6. Avaliação da peroxidação de lipídeos	6
2.7. Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos	6
2.8. Determinação da concentração de nutrientes	6
2.9. Cinética de absorção de fosfato	7
2.10. Cinética de absorção de sulfato	7
2.11. Determinação da concentração de glutathione total	8
2.12. Determinação de atividades enzimáticas	9
2.12.1. Determinação da atividade das sulfotransferases do ATP	9
2.12.2. Determinação da atividade das sintetases da γ -glutamylcysteína ..	9
2.12.3. Determinação da atividade das peroxidases da glutathione	10
2.12.4. Determinação da atividade das redutases da glutathione	10
2.12.5. Determinação da atividade das sulfortransferases da glutathione	11
2.13. Delineamento experimental e análise estatística	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4. CONCLUSÕES	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
6. APÊNDICE.....	41

1. INTRODUÇÃO

Os níveis de arsênio (As), um metalóide muito tóxico, têm aumentado no ambiente devido a várias atividades antrópicas como mineração, produção de herbicidas e fungicidas, fabricação de vidros, produção de fármacos, dentre outras (Mylona *et al.*, 1998). A elevada toxicidade do As, associada ao acúmulo crescente em diversos locais do mundo (Matschullat *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 2000), fez com que técnicas para remediação de solos e águas contaminados fossem desenvolvidas ou aprimoradas.

Na fitoextração, uma biotecnologia aplicada a ambientes contaminados, plantas têm sido utilizadas para absorção e armazenamento do As contido no meio, reduzindo os seus teores a níveis seguros (Melo *et al.*, 2006). Algumas espécies vegetais hiperacumuladoras de As têm sido estudadas (Ma *et al.*, 2001, Francesconi *et al.*, 2002), permitindo o uso da fitoextração na descontaminação de ambientes poluídos com o metalóide.

A forma inorgânica mais oxidada do As é o arsenato, análogo químico do fosfato (Dhankher *et al.*, 2002), e, por causa dessa semelhança, é absorvido pelas plantas pelo mesmo sistema de transporte do fosfato (Meharg e Macnair, 1992), embora a afinidade desse sistema seja muito maior pelo fosfato do que pelo arsenato (Mascher *et al.*, 2002). A interação entre esses dois compostos tem sido alvo de vários estudos (Rahman *et al.*, 2008, Christophersen *et al.*, 2009, Wang e Duan, 2009) e é de grande importância para efetiva aplicação da fitoextração em ambientes contaminados com As.

Dentro da planta, embora o arsenato possa substituir o fosfato em diversos processos metabólicos, ele não é capaz de desempenhar suas funções (Shri *et al.*, 2009). É o que ocorre, por exemplo, na fosforilação oxidativa, em que o arsenato desloca o fosfato na síntese de ATP, diminuindo a produção de energia na planta (Terwelle e Slater, 1967, Ullrich-Eberius *et al.*, 1989). Devido a essa interferência nas reações de transferência de energia, vários trabalhos têm mostrado que o As parece estimular a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) (Khan *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2009). Adicionalmente, o arsenato absorvido é transformado em arsenito numa reação que produz diretamente peróxido de hidrogênio (Blecker *et al.*, 2006).

Assim, muitas das alterações metabólicas resultantes da presença de As estão relacionadas ao estresse oxidativo. Essas alterações incluem danos a lipídeos de membranas (Khan *et al.*, 2009), mudanças nos teores de pigmentos cloroplastídicos (Ozturk *et al.*, 2010), modificações nas atividades de enzimas antioxidantes e nos teores de antioxidantes não-enzimáticos (Mishra *et al.*, 2008, Shri *et al.*, 2009).

Embora a transformação do arsenato em arsenito resulte na produção de ROIs, essa transformação tem sido apontada como parte do mecanismo de tolerância das plantas ao As (Blecker *et al.*, 2006), pois, a principal rota de desintoxicação do As é através da quelação do arsenito via ligantes contendo enxofre reduzido, tais como glutathione e fitoquelatinas (polímero de glutathione) (Mishra *et al.*, 2008). Entretanto, esse mecanismo de defesa envolvendo glutathione depende de grande quantidade de enxofre, podendo levar à depleção de metabólitos contendo SH (Mishra *et al.*, 2008). O suprimento adicional de enxofre advém do incremento da absorção de sulfato e rotas assimilatórias (Srivastava e D'Souza, *in press*), como o aumento na atividade das sulfurilases do ATP (Oliveira *et al.*, 2009), primeira enzima da via de assimilação do sulfato.

A glutathione é um tiol de baixo peso molecular relacionada a vários processos metabólicos e constitui importante sistema de defesa contra estresse oxidativo e danos metabólicos ocasionados pelo As (Singh *et al.*, 2006). Além de manter o grupo tiol de proteínas protegido, em seu estado nativo (Singh *et al.*, 2006), ela participa diretamente da dissipação dos ROIs (Krinsky, 1994), do ciclo ascorbato-glutathione (Noctor e Foyer, 1998), da redução do arsenato em arsenito (Dhankher *et al.*, 2002), da síntese de fitoquelatinas (Schmoger *et al.*, 2000) e, possivelmente, forma conjugados com o As, os quais são transportados para o vacúolo (Dhankher *et al.*, 2002). Assim, a glutathione é bastante requerida na tolerância de plantas a estresses e, em diversas espécies vegetais, os maiores níveis constitutivos dessa substância têm sido relacionados a uma melhor adaptação a situações estressantes (Rausch e Wachter, 2005).

A quantidade de glutathione em um organismo é resultado da combinação dos processos de biossíntese, consumo e degradação. A glutathione é sintetizada em duas etapas, dependentes de ATP, sendo catalisadas pela sintetase da γ -glutamilcisteína, uma enzima limitante, e sintetase da glutathione (Noctor e Foyer, 1998). Ela é consumida por grande número de reações redox, visando combater o estresse

oxidativo, o que resulta na formação da glutathione oxidada, que é reciclada à sua forma reduzida pela redutase da glutathione (Mishra *et al.*, 2006). Além disso, a glutathione pode proteger as plantas contra vários xenobióticos, como o As (Bleeker *et al.*, 2006), por sua conjugação através das sulfotransferases da glutathione (Moons, 2003). A degradação da glutathione ocorre pela ação da enzima γ -glutamyltranspeptidase, a qual catalisa a hidrólise de um único resíduo N-ter de glutamato de glutathiones, conjugados de glutathione e, provavelmente, fitoquelatinas (Poléc-Pawlak *et al.*, 2005).

Lemna gibba e *Salvinia minima* são macrófitas aquáticas que têm absorvido grandes quantidades de metais tóxicos quando crescidas em locais contaminados e, ainda, apresentam alta produção de biomassa (Nichols *et al.*, 2000, Maine *et al.*, 2001, Maine *et al.*, 2004, Mkandawire e Dudel, 2005, Mkandawire *et al.*, 2006, Estrella-Gómez *et al.*, 2009), ambas características fundamentais para utilização de plantas na extração de poluentes (Melo *et al.*, 2006). Assim, torna-se necessário o estudo dessas espécies para maior conhecimento de suas alterações metabólicas após exposição ao As para que sejam verificadas suas potencialidades para uso na fitoextração.

Esse trabalho teve por objetivo estudar processos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pela tolerância de espécies vegetais ao As, a fim de permitir a remediação de ambientes aquáticos contaminados, de forma adequada e economicamente viável, e possibilitar a utilização de *L. gibba* e *S. minima* em programas de bioindicação e fitorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção, aclimação e exposição das plantas ao arsenato

Plantas aquáticas das espécies *Lemna gibba* L. e *Salvinia minima* Baker, obtidas no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa, foram aclimatadas por seis dias, em recipientes de polietileno (0,35 x 0,30 x 0,17 m), contendo 3 L de solução nutritiva de Clark (1975), pH 6,5, em sala de crescimento de plantas, com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C, $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sob fotoperíodo de 16 horas, sendo a solução nutritiva trocada a cada três dias.

Após o período de aclimação, uma quantidade de plantas das duas espécies com aproximadamente 1 g de massa de matéria fresca foi transferida para vasos de vidro contendo 0,5 L da solução nutritiva de Clark, pH 6,5, contendo ou não As, na forma de Na_2HAsO_4 , na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. No terceiro dia a partir do início dos tratamentos, o experimento foi encerrado, e as plantas removidas e lavadas por 30 s em água corrente desionizada.

2.2. Determinação da concentração interna de arsênio

As plantas secas em estufa foram submetidas à mineralização úmida com 3 mL de uma mistura nítrico-perclórica 2:1, à temperatura de 100-120 °C, para evitar a volatilização do As, até a completa oxidação da matéria orgânica (Marin *et al.*, 1993). Amostras mineralizadas foram diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, analisadas por espectrofotometria de absorção atômica, para determinação dos teores de As.

2.3. Determinação da taxa de crescimento relativo (TCR)

As taxas de crescimento relativo das plantas foram calculadas utilizando-se a equação proposta por Hunt (1978):

$$R_w = (\ln w_1 - \ln w_0) \times 1000 / (t_1 - t_0), \text{ em que:}$$

R_w = taxa de crescimento relativo, em termos de massa seca, no período experimental ($\text{mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$);

$\ln w_1$ e $\ln w_0$ = logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente;

$t_1 - t_0$ = duração do experimento (em dias).

A massa da matéria seca inicial foi estimada a partir de amostras de plantas do mesmo lote daquelas utilizadas no experimento. No quinto dia a partir do início dos tratamentos, o experimento foi encerrado, e as plantas removidas e lavadas por 30 s em água corrente e desionizada. Em seguida, foram colocadas para secar em estufa convencional a 80 °C até a obtenção de massa seca constante.

2.4. Determinação do teor de ânion superóxido

Amostras de 50 mg de plantas cortadas em pequenos segmentos foram incubadas em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (Na_2EDTA) 100 μM , β -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20 μM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). Os tubos, tipo “penicilina”, foram hermeticamente fechados e a reação iniciada pela introdução de 100 μL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, usando-se seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28 °C, sob agitação, por 5 min, os segmentos tissulares foram removidos e, a partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura da absorvância a 480 nm, durante 5 minutos. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem tecido vegetal. A produção de ânion superóxido foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ (mol/ L)}^{-1}$ (Boveris, 1984).

2.5. Determinação do teor de peróxido de hidrogênio

Amostras de 0,03 g de tecido vegetal foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionadas ao meio de extração constituído de 1,5 mL de TCA 0,1 % (p/ v) e centrifugadas a 12.000 x g por 15 min. Uma alíquota de 0,5 mL de amostra foi

misturada com 0,5 mL de tampão fosfato (pH 7,0). Então, 1,0 mL de iodeto de potássio 1,0 M foi adicionado e a absorvância lida a 390 nm. O conteúdo de H₂O₂ foi determinado utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 0,28 µM⁻¹ cm⁻¹ e expresso em nmol g⁻¹ MF (Sergiev *et al.*, 1997).

2.6. Avaliação da peroxidação de lipídeos

A concentração de malonaldeído (MDA) acumulado, foi determinada em cerca de 150 mg de tecido vegetal, macerado em 2 mL de ácido tricloroacético 0,1 % (p/ v), centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos, coletando-se o sobrenadante. A 350 µL do sobrenadante foi adicionado 1,0 mL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5 % (p/ v) em TCA 20 % (p/ v) e a mistura incubada a 95 °C. Após 2 horas a reação foi interrompida transferindo-se os tubos para banho de gelo e a absorvância medida a 532 e 600 nm. A absorvância de 600 nm foi subtraída da absorvância de 532 nm e a concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹cm⁻¹ (Heath e Packer, 1968).

2.7. Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos

Amostras de 100 mg de plantas foram trituradas em nitrogênio líquido após adição de uma pitada de CaCO₃ e, em seguida, homogeneizadas em 3 mL de acetona 80 % (v/ v) por um minuto. A suspensão resultante foi filtrada através de papel filtro, sendo o resíduo lavado por 3 vezes em acetona 80 % e o volume final ajustado para 25 mL com o mesmo solvente. As absorvâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 470, 646,8 e 663,2 nm, e os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b*, total e carotenóides) estimados conforme sugerido por Lichtenthaler (1987).

2.8. Determinação da concentração de nutrientes

As plantas secas em estufa foram submetidas à mineralização úmida com 3 mL de uma mistura nítrico-perclórica 2:1, até a completa oxidação da matéria orgânica

(Marin *et al.*, 1993). Amostras mineralizadas foram diluídas para 25 mL com água desionizada. Após digestão, os teores de Mn, Ca, Mg, Fe e P foram analisados por espectrofotometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) e os teores de enxofre foram determinados segundo a metodologia recomendada por Alvarez *et al.* (2001).

2.9. Cinética de absorção de fosfato

Plantas das duas espécies, após o período de adaptação em solução nutritiva de Clark e pH 6,5, tiveram a solução renovada a cada seis horas, por 24 horas, antes do ensaio de exaustão. No momento do ensaio propriamente dito, a solução nutritiva foi novamente renovada e metade das plantas receberam tratamento com solução de 1 mg L⁻¹ de As, adicionando-se, em seguida, 1 mL de solução de Na₂H³²PO₄ com atividade de 0,042 MBq mL⁻¹ a todos os vasos. O ensaio de esgotamento do fosfato da solução nutritiva foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Claassen e Barber (1974). Após a introdução das plantas na solução de absorção, foram coletadas alíquotas de 1 mL de cada vaso, a intervalos de 15 min na primeira hora e 30 min na segunda hora e, a partir daí, a cada 60 min até que ocorresse equilíbrio entre o influxo e o efluxo do ânion fosfato. A quantidade de radioatividade em cada alíquota, após adição de 10 mL de coquetel de cintilação líquida, foi determinada em espectrômetro de cintilação líquida Beckman, modelo LS 6500, no Laboratório de Aplicação de Radioisótopos, no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. Após o término do experimento, as plantas foram lavadas com água destilada e secas em estufa a 80 °C, até peso constante, para determinação do peso de matéria seca. Os parâmetros cinéticos K_M e V_{max} foram estimados mediante aproximação gráfico-matemática sugerida por Ruiz (1985). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2 x 2 (2 espécies x 2 doses), com 3 repetições.

2.10. Cinética de absorção de sulfato

Plantas das duas espécies, após o período de adaptação em solução nutritiva de Clark e pH 6,5, tiveram a solução renovada a cada seis horas, por 24 horas, antes

do ensaio de exaustão. No momento do ensaio propriamente dito, a solução nutritiva foi novamente renovada e metade das plantas receberão tratamento com solução de 1 mg L⁻¹ de As, adicionando-se, em seguida, 1 mL de solução de Na₂³⁵SO₄ com atividade de 0,042 MBq mL⁻¹ a todos os vasos. O ensaio de esgotamento do sulfato da solução nutritiva foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Claassen e Barber (1974). Após a introdução das plantas na solução de absorção, foram coletadas alíquotas de 1 mL de cada vaso, a intervalos de 15 min na primeira hora e 30 min na segunda hora e, a partir daí, a cada 60 min até que ocorresse equilíbrio entre o influxo e o efluxo do ânion sulfato. A quantidade de radioatividade em cada alíquota, após adição de 10 mL de coquetel de cintilação líquida, foi determinada em espectrômetro de cintilação líquida Beckman, modelo LS 6500, no Laboratório de Aplicação de Radioisótopos, no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. Após o término do experimento, as plantas foram lavadas com água destilada e secas em estufa a 80 °C, até peso constante, para determinação do peso de matéria seca. Os parâmetros cinéticos K_M e V_{max} foram estimados mediante aproximação gráfico-matemática sugerida por Ruiz (1985). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2 x 2 (2 espécies x 2 doses), com 3 repetições.

2.11. Determinação da concentração de glutathiona total (GSH + GSSG)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de material vegetal foram trituradas em nitrogênio líquido, seguido da adição de 2 mL de meio de homogeneização constituído de HCl 0,1 M contendo EDTA 1mM (Anderson, 1985). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4 °C.

A alíquotas de 200 µL de extrato bruto foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de sódio 125 µM, contendo EDTA 6,3 mM, pH 7,5, 500 µL de NADPH 0,3 mM e 100 µL de DTNB [ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzóico)] 6 mM. Após incubação a 30 °C, por 5 min, adicionaram-se 10 µL de redutase da glutathiona (50 U mL⁻¹) e determinou-se a absorvância a 412 nm durante 1 minuto. A concentração de glutathiona determinada por meio de curva de calibração. Os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ massa fresca.

2.12. Determinação de atividades enzimáticas

2.12.1. Sulfurilases do ATP (ATPS, EC 2.7.7.4)

Amostras de 0,2 g de matéria fresca foram colocadas em almofariz de porcelana gelado e homogeneizadas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 2 mL de tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 8,0, contendo MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹ e DTE (ditioeritritol) 10 mmol L⁻¹, acrescidos de 0,1 mg de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para avaliação da atividade da enzima.

A 0,8 mL do meio de reação contendo 10 μmoles de Tris-HCl, pH 8,0, 2,5 μmoles de pCMB (p-cloromercuribenzoato) e duas unidades de pirofosfatase foi adicionado 0,2 mL do extrato enzimático, seguido de incubação a 37 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados ao meio de reação 0,5 mL de solução contendo 20 μmoles de Na₂MoO₄ (ou 40 μmoles de NaCl, no caso do branco) e 10 μmoles de ATP, sendo feita nova incubação a 37 °C. Após 20 min, a reação foi paralisada com a adição de 1 mL de TCA 10 % (p/ v) gelado (Adams e Johnson, 1968). Após centrifugação a 5.000 x g durante 10 min a 4 °C, o teor de fosfato inorgânico no sobrenadante foi determinado pelo método do fosfo-molibdato (Lindeman, 1958).

2.12.2. Sintetases da γ-glutamilcisteína (γ-GCS, EC 6.3.2.2)

Amostras de 0,3 g de massa fresca foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, EDTA 5 mM (pH 8,0). O homogeneizado foi centrifugado a 30.000 x g por 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade enzimática foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação contendo 10 μmoles de glutamato de sódio, 10 μmoles de L-aminobutirato, 2 μmoles de Na₂EDTA, 0,2 mg de BSA, 20 μmoles de MgCl₂, 5 μmoles do sal dissódico de ATP e 100 μmoles de tampão Tris-HCl, pH 8,2. A mistura foi incubada em banho-maria, a 37 °C, durante 30 min e, então, a reação foi paralisada pela adição de 100 μL de TCA 50 % (p/ v) (Rueggsegger e

Brunold, 1992). A mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min e o teor de fosfato inorgânico no sobrenadante foi determinado pelo método do fosfo-molibdato (Lindeman, 1958).

2.12.3. Peroxidases da glutathione (GPX, EC 1.11.1.9)

Amostras de 0,3 g de massa fresca foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1mM e MgCl₂ 10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O homogeneizado foi centrifugado a 30.000 x g por 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade das peroxidases da glutathione foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto de tecido vegetal a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,114 M, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM e uma unidade de redutase da glutathione (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30 °C foi medido no primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ (Anderson e Davis, 2004) e o resultado expresso em nmol min⁻¹ g⁻¹ MF.

2.12.4. Redutases da glutathione (GR, EC 1.8.1.7)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de plantas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, EDTA 1 mmol L⁻¹, triton 0,02 % (p/v), DTT 2 mmol L⁻¹, PMSF 1 mmol L⁻¹ e PVPP 1 % (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 x g por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante utilizado para análise da atividade enzimática.

A atividade das redutases da glutathione 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 mol L⁻¹, pH 7,5, GSSG 20 mmol L⁻¹ e NADPH 2 mmol L⁻¹ (Carlberg e Mannervik,

1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm foi medido no primeiro minuto de reação, a 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e expressa em $\mu\text{moles de glutatona oxidada min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

2.12.5. Sulfotransferases da glutatona (GST, EC 2.5.1.18)

Amostras de 0,3 g de massa fresca foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM e PVPP 5 % (p/v) (Habig *et al.*, 1974). O homogeneizado foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade da sulfotransferases da glutatona foi determinada após adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, glutatona reduzida 20 mM e 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1 M (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O aumento na absorvância a 340 nm foi medido no primeiro minuto de reação a 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em $\text{nmoles min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

2.13. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em esquema fatorial: 2 x 2 (espécies vegetais x concentrações de As) com 6 repetições, no delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico "SAEG", da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Acúmulo de arsênio

As duas espécies vegetais estudadas foram capazes de acumular As em seus tecidos quando expostas a esse elemento, sendo que *Lemna gibba* apresentou teor de As onze vezes maior que *Salvinia minima* (Figura 1).

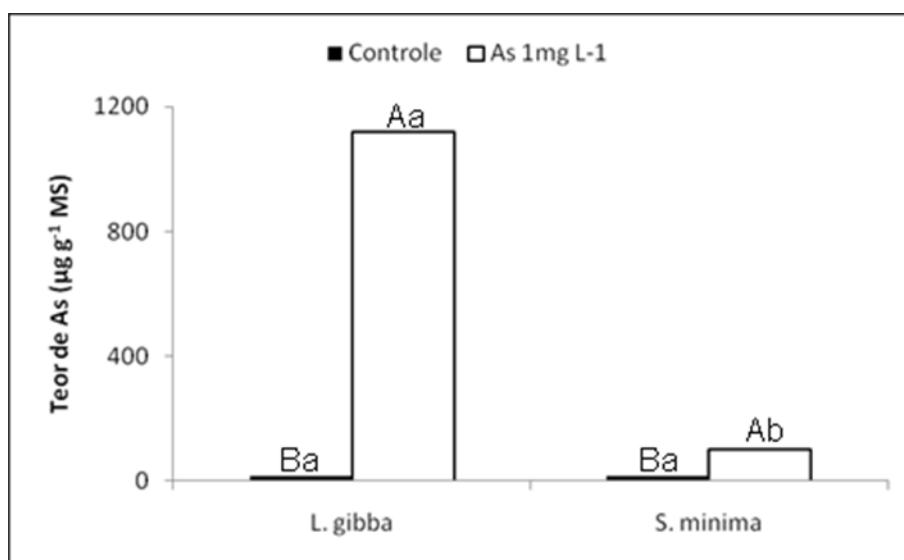


Figura 1. Teor de As em duas espécies de macrófitas aquáticas na ausência e na presença de As. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os níveis de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para o mesmo nível de As, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Salvinia minima apresentou teor de As encontrado na maioria das plantas submetidas ao As, como, por exemplo, *Brassica juncea* (Khan *et al.*, 2009) e *Pistacia lenticus* (Moreno-Jiménez *et al.*, 2009). Já o teor de As apresentado por *L. gibba* foi da mesma ordem que o teor acumulado por *Brassica rapa* (Shaibur e Kawai, 2009), *Tamarix gallica* (Moreno-Jiménez *et al.*, 2009) e *Nasturtium officinale* (Ozturk *et al.*, 2010) e este teor foi maior que 1000 mg/ kg MS. Caso este teor de As também seja acumulado em ambientes naturais, *L. gibba* passaria a ser classificada como uma

espécie hiperacumuladora de As (Reeves, 2003). Espécies vegetais hiperacumuladoras de elementos tóxicos, como o As, são importantes para fitorremediação haja vista ser a fitoextração um dos processos mais importantes na recuperação de locais contaminados.

Taxa de crescimento relativo

A taxa de crescimento relativo sofreu redução com a presença de As na solução nutritiva nas duas espécies analisadas. As reduções na TCR em *L. gibba* e em *S. minima* foram de 25,24 % e 38,79 %, respectivamente (Figura 2). Dessa forma, evidencia-se que as plantas de *L. gibba* apresentaram maior tolerância ao As que *S. minima*.

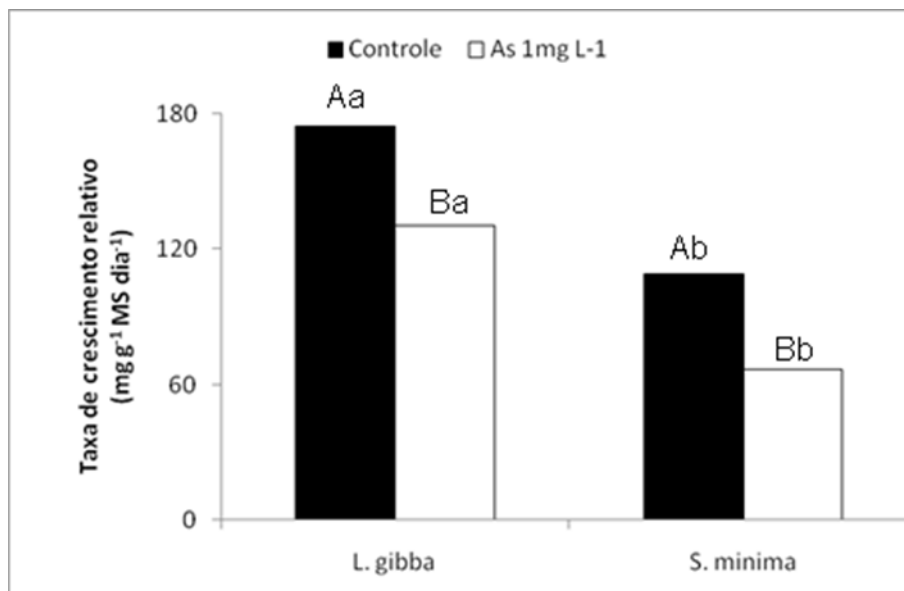


Figura 2. Taxa de crescimento relativo, em duas espécies de macrófitas aquáticas na ausência e na presença de As. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os níveis de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para o mesmo nível de As, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

A exposição de diversas espécies de plantas a níveis tóxicos de As tem resultado em reduções no crescimento (Khan *et al.*, 2009, Moreno-Jiménez *et al.*, 2009, Shri *et al.*, 2009, Shaibur e Kawai, 2009,), uma vez que nessa condição podem ocorrer restrições ao transporte radicular, prejudicando a absorção de água e nutrientes

(Carbonell-Barrachina *et al.*, 1997), aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio, causando vários danos celulares, como a peroxidação de lipídeos (Ozturk *et al.*, 2010) e ausência de mecanismos eficientes de defesa como, por exemplo, altas atividades de enzimas antioxidantes (Cao *et al.*, 2004).

Quando comparada com outras espécies como *Salvinia auriculata*, *Eichhornia crassipes*, *Cajanus cajan*, *Crotalaria spectabilis* e *Nasturtium officinale* (Oliveira, 1998, Felipe *et al.*, 2009, Ozturk *et al.*, 2010) *L. gibba* apresenta alta TCR na ausência de As e mantém alta TCR na presença desse elemento tóxico. Altas taxas de crescimento são requeridas para espécies a serem utilizadas em programas de fitorremediação (Fayiga *et al.*, 2004).

Teores do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídeos

L. gibba e *S. minima* apresentaram valores similares no conteúdo de ânion superóxido e esses valores não sofreram alterações com a exposição dessas espécies ao As (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de ânion superóxido ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), peróxido de hidrogênio (nmol g^{-1} MF) e MDA-TBA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), em duas espécies de macrófitas aquáticas na ausência e presença de As.

As (mg.L^{-1})	Lemna	Salvinia
Ânion superóxido		
0,0	0,160 Aa	0,180 Aa
1,0	0,163 Aa	0,201 Aa
Peróxido de hidrogênio		
0,0	56,01 Ba	12,35 Bb
1,0	70,25 Aa	16,90 Ab
MDA-TBA		
0,0	0,035 Aa	0,020 Bb
1,0	0,036 Aa	0,037 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os níveis de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para o mesmo nível de As, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Diferentemente da concentração de ânion superóxido, o teor de peróxido de hidrogênio apresentou-se de forma distinta nas duas espécies vegetais na ausência de As, sendo maior em *L. gibba*. A exposição das plantas ao As acarretou aumento na concentração deste intermediário reativo de oxigênio. Os aumentos nos teores de H₂O₂ em *L. gibba* e *S. minima* foram de 25,42 % e 36,84 %, respectivamente (Tabela 1).

A constância nos teores do ânion superóxido pode ter sido resultado de maior atividade de enzimas que utilizam este ânion como substrato, como a enzima dismutase do superóxido. Trabalhos realizados com diversas espécies expostas ao As demonstram aumento na atividade das dismutases do superóxido (Khan *et al.*, 2009, Shri *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2009). Outra evidência da atividade desta enzima é o aumento nos teores de H₂O₂ que pode também ser resultado da dismutação do ânion superóxido em H₂O₂. O aumento da concentração do peróxido de hidrogênio também pode ter ocorrido de forma independente do ânion superóxido, pela conversão de arsenato em arsenito, podendo resultar em danos a ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos (Mascher *et al.*, 2002). Estes aumentos nos teores de H₂O₂ após exposição ao As indicam a ocorrência de desbalanço oxidativo em ambas as espécies.

Em *L. gibba* exposta ao As não houve alteração da concentração de MDA, indicando que não ocorreu danos aos lipídeos de membrana. Em *Salvinia minima*, por sua vez, ocorreu aumento de 85 % no conteúdo de MDA quando exposta a este elemento tóxico, indicando ocorrência de estresse oxidativo (Tabela 1).

O conteúdo de MDA, produto final da peroxidação de lipídeos, tem sido avaliado como uma medida do grau de estresse oxidativo que é causado principalmente por intermediários reativos de oxigênio (Mishra *et al.*, 2008). Embora tenha ocorrido aumento nos teores de H₂O₂ em *L. gibba* quando submetida ao As, este aumento não correspondeu a incrementos nos teores de MDA. Dessa forma, *L. gibba* apresenta menor grau de estresse oxidativo que *S. minima* e deve possuir mecanismos específicos que dificultem a peroxidação de lipídeos de membranas como, por exemplo, maiores teores de antioxidantes apolares presentes em membranas (β -caroteno, α -tocoferol), tolerando melhor os efeitos tóxicos provocados pelo As. Khan *et al.* (2009) também encontrou aumentos nos teores de ROIs sem correlação com aumentos nos teores de MDA em baixas doses de As.

Pigmentos

Após exposição ao arsênio, os teores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total foram significativamente reduzidos nas duas espécies estudadas. Em *L. gibba*, as concentrações de carotenóides permaneceram constantes após exposição ao As, enquanto em *S. minima* ocorreu redução de 29.31 % (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações de pigmentos cloroplastídicos ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF), em duas espécies de macrófitas aquáticas na ausência e presença de As.

As (mg.L^{-1})	Lemna	Salvínia
Clorofila <i>a</i>		
0,0	520,95 Ab	984,53 Aa
1,0	318,46 Bb	499,91 Ba
Clorofila <i>b</i>		
0,0	178,86 Ab	357,04 Aa
1,0	83,51 Bb	169,82 Ba
Clorofila total		
0,0	699,81 Ab	1341,57 Aa
1,0	401,97 Bb	669,74 Ba
Carotenóides		
0,0	189,87 Ab	401,82 Aa
1,0	194,58 Ab	284,01 Ba

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os níveis de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para o mesmo nível de As, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Assim como neste estudo, diversos autores têm observado reduções nos teores de clorofilas como um dos efeitos tóxicos do As (Moreno-Jiménez *et al.*, 2009, Ozturk *et al.*, 2010). Essa diminuição na concentração de clorofilas em plantas expostas ao As pode ocorrer devido a várias modificações metabólicas, como a oxidação dos pigmentos, a oxidação dos lipídeos de membranas dos cloroplastos (Li *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 2006), a menor absorção de nutrientes como Mn, Cu, Fe e P (Srivastava *et al.*, 2007), a degradação do pigmento pelo aumento da atividade da clorofilase (Sharma e Dubey, 2005) e diminuição da biossíntese, devido à menor atividade da desidratase do ácido amino levulínico (Sanz-Munoz *et al.*, 1982 citado por Jain e Gadre, 1997).

Dessa forma, o decréscimo nos teores de clorofilas tem sido usado como indicativo da ocorrência de estresse induzido pelo As (Singh *et al.*, 2006). Em *S. minima*, a redução nos teores de clorofila total foi de 50,07 % enquanto em *L. gibba* a redução foi de 42,56 %, demonstrando ser *S. minima* alvo de maior estresse.

Carotenóides é uma classe de pigmentos hidrofóbicos encontrados em plantas que possuem papel fundamental no processo fotossintético bem como na atividade antioxidante associada a membranas (Singh *et al.*, 2006). Assim, a manutenção de concentrações altas desse pigmento em membranas de *L. gibba* após exposição ao As pode estar contribuindo para maior tolerância dessa espécie ao estresse oxidativo induzido pelo As, como evidenciado pela manutenção dos níveis de MDA.

Nutrientes

Modificações nos teores de nutrientes foram observadas em *L. gibba* e *S. minima* expostas ao As. Dos macronutrientes analisados, o cálcio, o magnésio e o fósforo tiveram suas concentrações diminuídas em ambas as espécies após exposição ao As, enquanto os teores de enxofre não apresentaram modificações em *S. minima* e aumentaram em *L. gibba*. Em relação aos micronutrientes analisados, as duas espécies apresentaram respostas semelhantes. Os teores de ferro e manganês permaneceram os mesmos (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações de macronutrientes (mg g⁻¹ MS) e micronutrientes (µg g⁻¹ MS), em duas espécies de macrófitas aquáticas na ausência e na presença de As.

As (mg.L ⁻¹)	Lemna	Salvinia
Cálcio		
0,0	12,80 Aa	5,44 Ab
1,0	9,76 Ba	3,04 Bb
Magnésio		
0,0	2,03 Aa	1,92 Aa
1,0	1,62 Ba	1,48 Ba
Fósforo		
0,0	7,90 Aa	7,97 Aa
1,0	5,30 Ba	5,47 Ba
Enxofre		
0,0	4,30 Bb	7,90 Aa
1,0	7,20 Aa	8,10 Aa
Ferro		
0,0	628,69 Ab	1193,43 Aa
1,0	681,31 Ab	1331,90 Aa
Manganês		
0,0	366,63 Aa	47,72 Ab
1,0	358,23 Aa	50,15 Ab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os níveis de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para o mesmo nível de As, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Embora o Ca exerça ação protetora contra a toxicidade de metais e metalóides (Mengel e Kirkby, 1987), *L. gibba* e *S. minima* parecem não contar com a proteção desse nutriente, haja vista ter ocorrido diminuição em seus teores após exposição ao As. Diminuições nos teores de Ca também foram apresentadas quando *Pteris cretica* foi exposta ao As (Baldwin e Butcher, 2006).

Atuar como cofator em muitas enzimas no processo de fosforilação (Mengel e Kirkby, 1987) e como átomo central da molécula de clorofila (Marschner, 1995) são os mais notáveis papéis relacionados ao magnésio nas plantas. O arsenato, além de vários efeitos tóxicos nas plantas, também tem ocasionado reduções nos teores de

clorofilas em muitas espécies vegetais (Moreno-Jiménez *et al.*, 2009, Ozturk *et al.*, 2010). Assim, sob exposição ao As, as plantas podem apresentar diminuição em suas altas necessidades de Mg, podendo diminuir sua absorção (Carbonell *et al.*, 1998).

Arsenato e fosfato são análogos químicos, sendo absorvidos pelo mesmo sistema de transportadores (Meharg e Macnair, 1992). Apesar dessa semelhança, este sistema possui maior afinidade pelo fosfato que pelo arsenato. Dessa forma, altas concentrações de arsenato comparadas às de fosfato, podem levar à diminuição na absorção deste ânion acarretando menores teores de fósforo nas plantas (Mascher *et al.*, 2002). Assim como em *L. gibba* e em *S. minima*, menores teores de fósforo também foram encontrados quando *Brassica rapa* (Shaibur e Kawai, 2009), *Pistacia lentiscus* e *Tamarix gallica* (Moreno-Jiménez *et al.*, 2009) foram expostas ao As.

Embora o arsenato possa substituir o fosfato na planta ele não é capaz de desempenhar o papel do fosfato, por exemplo, na transferência de energia (Shri *et al.*, 2009), assim a planta reage normalmente à deficiência de fosfato (Cox, 1995 citado por Carbonell *et al.*, 1998). Sintomas característicos da deficiência de fosfato, como aumento da biossíntese de antocianinas, já foram relatados quando *L. gibba* e *S. minima* foram expostas ao As (Santos, 2006).

A glutathione é uma das principais formas de enxofre reduzido na célula vegetal e está envolvida em diversos mecanismos de tolerância a metais e metalóides tóxicos (Noctor, 2006). Em experimentos em que plantas foram expostas a níveis tóxicos de As verificou-se maior crescimento sob nutrição com altas concentrações de sulfato (Zhang *et al.*, *in press*), indicando maior tolerância frente aos efeitos tóxicos do metalóide. Assim, os aumentos nos teores de enxofre encontrados em *L. gibba* pode ser um importante mecanismo para tolerância dessa espécie ao As. Aumentos nos teores de enxofre também foram encontrados em *Ricinus communis* (Melo *et al.*, 2009) e *Prosopis* sp. (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009) submetidas ao As.

Cinética de absorção de fosfato

A presença de arsenato em solução fez com que ambas as espécies diminuíssem a absorção de fosfato. Essa menor absorção ocorreu por alterações em

constantes cinéticas como K_M e V_{max} . Em *L. gibba* ocorreu diminuição do valor de V_{max} enquanto o K_M não apresentou diferença significativa. Em *S. minima* também houve redução do V_{max} , mas ocorreu expressivo aumento do K_M quando esta espécie foi exposta ao As (Tabela 4).

Tabela 4. Valores estimados de V_{max} ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$) e K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para absorção de fosfato em duas espécies de macrófitas aquáticas na ausência e presença de As.

As (mg L^{-1})	V_{max}		K_M	
	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	1,53 Aa	1,84 Aa	2,78 Ab	9,08 Ba
1,0	1,05 Ba	0,68 Bb	2,37 Ab	13,21 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os níveis de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para o mesmo nível de As, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Uma estratégia apresentada por diversas espécies para aumentar a tolerância ao arsenato é a diminuição da absorção de arsenato pela supressão de transportadores de fosfato (Meharg e Macnair, 1991; Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). Essa estratégia parece ter sido utilizada pelas duas espécies estudadas e pode ter sido responsável pela diminuição nos teores de P encontrados quando *L. gibba* e *S. minima* foram expostas ao As.

As variações nas constantes cinéticas foram maiores para *S. minima* que para *L. gibba* quando essas espécies foram expostas ao As, refletindo em maiores diminuições nas atividades desses transportadores em *S. minima*. Embora outros fatores também possam interferir, essa pode ser uma das razões para os menores teores de As encontrados em *S. minima* que em *L. gibba*, uma vez que o arsenato é absorvido pelo mesmo transportador que o fosfato.

Cinética de absorção de sulfato

A exposição de *L. gibba* ao As resultou em maior absorção de sulfato da solução nutritiva, enquanto em *S. minima* não ocorreu alteração nesta absorção. Esse

acrécimo, indicado pelo valor de V_{max} , foi 133,3 % maior do que no controle (Tabela 5).

Tabela 5. Valores estimados de V_{max} ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$) e K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$) para absorção de sulfato em duas espécies de macrófitas aquáticas na ausência e presença de As.

As (mg L^{-1})	V_{max}		K_M	
	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	0,09 Ba	0,14 Aa	9,10 Aa	9,44 Aa
1,0	0,21 Aa	0,15 Aa	8,78 Aa	9,41 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os níveis de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para o mesmo nível de As, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

O aumento do V_{max} em *L. gibba* exposta ao As pode ser resultante de uma crescente demanda de enxofre para síntese de compostos tiolados, determinantes na tolerância ao As (Raab *et al.*, 2005). Glutathione é necessária em várias frentes de defesa e requer grandes quantidades de enxofre, dependendo do influxo crescente de íons sulfato (Mishra *et al.*, 2008). A expressão gênica de transportadores de sulfato em plantas é regulada por vários fatores como, por exemplo, pelo requerimento de sulfato intracelular e por baixos níveis de glutathione (Smith *et al.*, 2000).

Aumentos na absorção de sulfato têm ocorrido em várias espécies expostas ao As e têm sido apontados como fator importante na manutenção dos diversos mecanismos de tolerância ao metalóide (Zhang *et al.*, *in press*, Srivastava e D'Souza, *in press*). Assim, o aumento na absorção de sulfato por *L. gibba* deve ter sido o fator responsável pelos aumentos nos teores de enxofre encontrados nessa espécie após exposição ao As e parece contribuir para tolerância dessa espécie ao As.

Glutathione total

A presença de As na solução nutritiva reduziu significativamente os teores de glutathione total nas duas espécies, sendo de 44,14% em *L. gibba* e 38,93% em *S. minima* (Figura 3A).

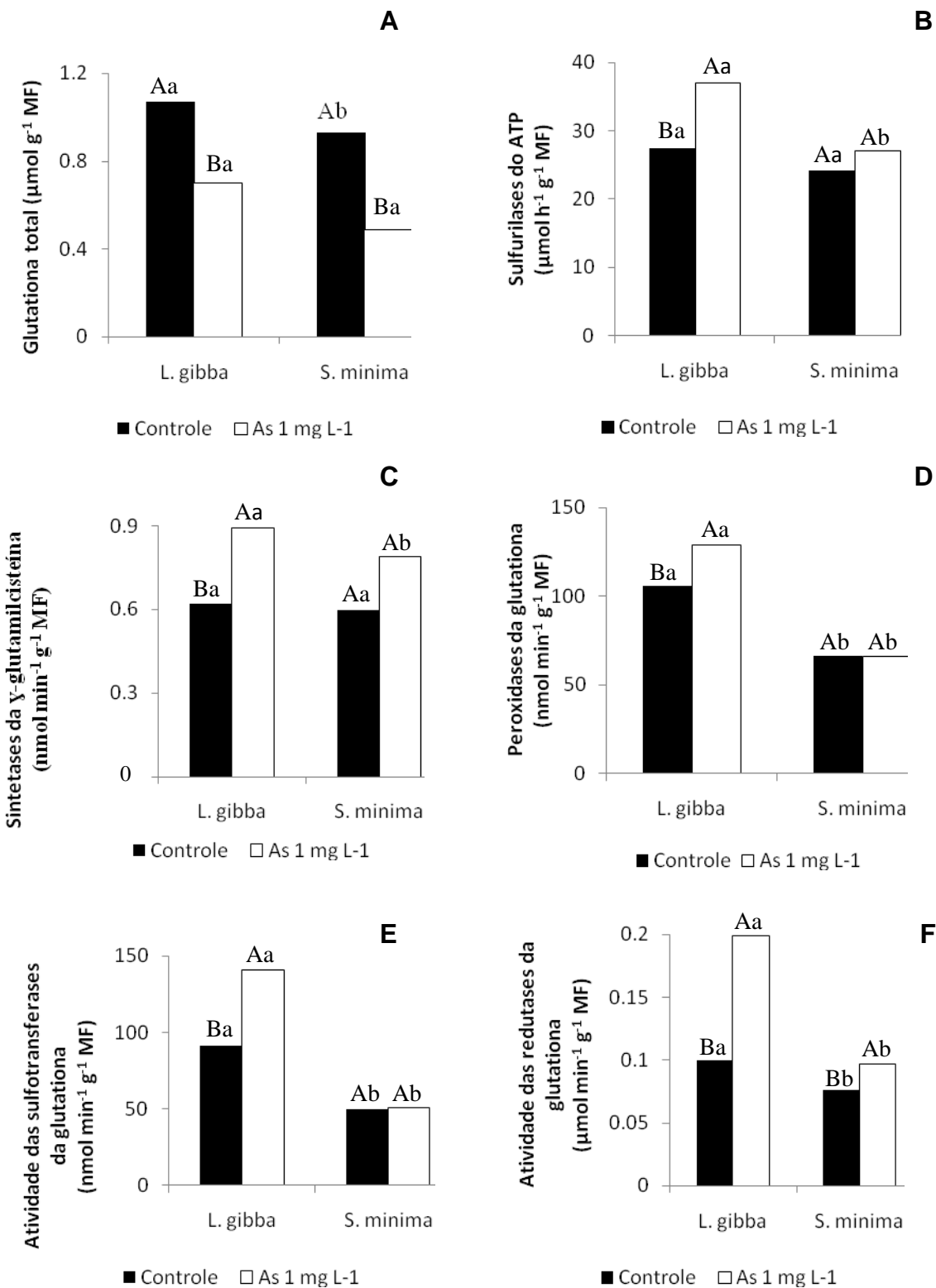


Figura 3. Teor de glutaciona (A), atividade das sulfurilases do ATP (B), atividade das sintetases da γ -glutamilcisteína (C), atividade das peroxidases da glutaciona (D), atividade das sulfotransferases da glutaciona (E) e atividade das redutases da glutaciona (F), em duas espécies de macrófitas aquáticas na ausência e presença de As. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os níveis de As para a mesma espécie, e pela mesma letra minúscula, entre espécies para o mesmo nível de As, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Além de manter o estado redox celular, apresentando participação em grande quantidade de processos metabólicos (Noctor e Foyer, 1998), a glutathione é imprescindível nos dois mais importantes mecanismos de defesa contra a toxicidade do As em plantas: ela pode ser diretamente complexada ao As pela sulfotransferase da glutathione e, também, ser utilizada pela sintetase da fitoquelatina durante a biossíntese de fitoquelatinas (Mishra *et al.*, 2008). As fitoquelatinas são peptídeos ricos em grupos SH, derivados da glutathione, e têm estrutura geral $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-gly}$ ($n=2-11$), sendo capazes de formar complexos com o As, reduzindo seus efeitos tóxicos (Schmoger *et al.*, 2000). Em diversas espécies vegetais, o mecanismo de defesa que envolve a participação de fitoquelatinas resulta em diminuições nos teores de glutathione (Pawlik-Skowronska *et al.*, 2004). Dessa forma, a tolerância de *L. gibba* ao As parece estar relacionada a diminuições em seus teores de glutathione, podendo indicar a ocorrência da complexação do As com a glutathione e, também, a ocorrência da síntese de fitoquelatinas nessa espécie. Assim, mais estudos são necessários para se verificar a real ocorrência da formação desses complexos em *L. gibba* bem como a síntese de fitoquelatinas, após tratamento com As.

A maior sensibilidade ao As de *S. minima* em relação à *L. gibba* pode, também, ser devido ao menor teor constitutivo de glutathione. Embora após exposição ao As essas espécies não tenham apresentado diferenças em relação aos seus teores de glutathione, na solução sem As, *L. gibba* apresentou teor 28,75 % maior do que *S. minima*. Conclusões semelhantes foram apresentadas por Hartley-Whitaker *et al.* (2001) ao submeterem clones tolerantes e não tolerantes de *Holcus lanatus* ao As.

Sulfurilases do ATP e Sintetases da γ -glutamilcisteína

As atividades das sulfurilases do ATP e das sintetases da γ -glutamilcisteína apresentaram resultados similares tanto para *L. gibba* quanto para *S. minima*.

Em plantas-controle, não houve diferenças nas atividades dessas enzimas entre as duas espécies vegetais estudadas. Ao ser exposta ao As, *L. gibba* apresentou aumento significativo tanto na atividade das sulfurilases do ATP quanto na atividade

das sintetases da γ -glutamilcisteína, enquanto, em *S. minima*, as atividades dessas enzimas não apresentaram diferenças significativas (Figura 3B e 3C).

O primeiro passo na via de assimilação de sulfato inorgânico é catalisado pela sulfúrilase do ATP. Esta enzima ativa o sulfato numa reação dependente de ATP levando à formação de adenosina 5'fosfossulfato e pirofosfato. Características termodinâmicas fazem dessa reação catalisada pela ATPS um passo limitante na via de assimilação do sulfato (Rausch e Wachter, 2005). Em algumas espécies vegetais, essa reação tem sido regulada por glutathione (Kopriva, 2006). Assim, os baixos teores de glutathione, bem como o aumento na absorção de sulfato encontrados em *L. gibba* após exposição ao As, devem ter sido responsáveis diretamente pelo aumento da atividade das sulfúrilases do ATP.

Várias espécies têm apresentado aumento na atividade das sulfúrilases da ATP ao serem submetidas a elementos tóxicos (Bonato, 1999, Oliveira *et al.*, 2009). Esses aumentos na assimilação de sulfato, como encontrado em *L. gibba*, parecem ser essenciais para suprir a demanda de enxofre reduzido pelas plantas nessas situações de estresse.

As sintetases da γ -glutamilcisteína (γ -ECS) catalisam a primeira reação do metabolismo de enxofre que está comprometida com a biossíntese de glutathione. Nessa reação, γ -glutamilcisteína é formada a partir de L-glutamato e L-cisteína (Kopriva, 2006). A sintetase da γ -glutamilcisteína é uma enzima limitante dessa via, tendo sua atividade regulada pelos níveis de glutathione (Noctor e Foyer, 1998).

Aumentos na atividade das sintetases da γ -glutamilcisteína têm sido verificados em algumas espécies expostas a diversos elementos tóxicos como Cd (Vestena, 2004), Cu (Nagalakshmi e Prasad, 2001) e, também, ao As (Mishra *et al.*, 2008). Plantas transformadas superexpressando esta enzima têm apresentado aumentos nos teores de glutathione, nos teores de As e na tolerância a esse elemento (Li *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008), um importante resultado do ponto de vista da fitorremediação.

Em *L. gibba*, os aumentos nas atividades das sulfurilases do ATP e das sintetases da γ -glutamilcisteína parecem importantes para tolerância dessa espécie ao As, mas foram insuficientes para manter o *pool* de glutathione nessa espécie, podendo ser devido à síntese de fitoquelatinas ou a interação direta do As com glutathione.

Peroxidases da glutathione, sulfotransferases da glutathione e redutases da glutathione

Lemna gibba apresentou atividades constitutivas das peroxidases da glutathione, sulfotransferases da glutathione e redutases da glutathione significativamente maiores que *S. minima*.

A presença de As na solução nutritiva aumentou as atividades das GPXs e GSTs em *L. gibba*, enquanto em *S. minima* essas atividades não apresentaram diferenças significativas. A atividade das GRs, por sua vez, apresentou incremento nas duas espécies estudadas quando estas foram submetidas ao As, sendo que em *L. gibba* esse aumento foi 99,00 % e em *S. minima* foi de 27,63 % (Figura 3D, 3E e 3F).

Peroxidases da glutathione fazem parte de um conjunto de enzimas antioxidantes que consomem peróxido de hidrogênio durante o estresse oxidativo (Eschdat *et al.*, 1997). Podem também funcionar removendo peróxidos e hidroperóxidos lipídicos das membranas, sendo responsável pela menor peroxidação de lipídeos e extravasamento de eletrólitos (Mishra *et al.*, 2008). Embora tenham ocorrido aumentos nos teores de H₂O₂ em *L. gibba*, mostrando que o aumento na atividade dessa enzima não foi suficiente para consumir estes ROIs formados, não foram observados aumentos nos teores de MDA-TBA nessa espécie, após exposição ao As. Este resultado sugere possível participação dessa enzima na proteção a peroxidação de lipídeos em *L. gibba*, contribuindo para sua tolerância ao As.

Sulfotransferases da glutathione formam uma família de enzimas que catalisam a conjugação de GSH via grupo sulfidril a uma variedade de compostos eletrofilicos (Agusa *et al.*, 2010). Vários trabalhos têm apresentado aumento nas atividades dessa enzima após exposição de espécies vegetais a diversos metais (Nagalakshmi e

Prasad, 2001) e também ao As (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009). Essa enzima deve participar da destoxificação ao As em *L. gibba*, uma vez que, após exposição a este elemento, houve aumento em sua atividade além da diminuição nos teores de glutatona, substrato dessa enzima. Segundo Hartley-Whitaker *et al.* (2001), a formação do complexo As-glutatona bem como a biossíntese de fitoquelatinas podem levar a redução do potencial da planta em dissipar seus ROIs dada a diminuição nos teores de glutatona. Estes resultados foram apresentados por *L. gibba* neste trabalho, mostrando a limitação dessa espécie em manter níveis adequados de glutatona.

Redutases da glutatona participam do ciclo ascorbato-glutatona regenerando glutatona reduzida, utilizando NADPH como agente redutor. A participação dessa enzima nesse ciclo é fundamental para manutenção da homeostase celular dada a importância desse ciclo no consumo de ROIs (Noctor e Foyer, 1998). Além do aumento da demanda de altas atividades das redutases da glutatona devido ao estresse oxidativo provocado pelo As (Singh *et al.*, 2009), este elemento pode reduzir significativamente o conteúdo de glutatona reduzida devido a sua complexação ao As e conversão a fitoquelatinas (Shri *et al.*, 2009). Assim, os aumentos nas atividades dessa enzima poderiam constituir importantes mecanismos de defesa tanto para *L. gibba* quanto para *S. minima*, mas altas razões GSH/ GSSG não parecem estar sendo mantidas, principalmente em *S. minima*, dado aparecimento de danos oxidativos. Incrementos na atividade dessas enzimas também foram apresentados quando *Pteris vittata* (Srivastava *et al.*, 2007), *Ceratophyllum demersum* (Mishra *et al.*, 2008) e *Brassica juncea* (Khan *et al.*, 2009) foram expostas ao As.

4. CONCLUSÕES

Baseando-se no teor de As absorvido pelas plantas, o estresse induzido pelo As em *L. gibba* deveria ser onze vezes maior que em *S. minima*. Entretanto, *S. minima*, além de apresentar maiores teores de ROIs apresentou sintomas de toxidez mais intensos que *L. gibba* após o período de exposição ao As. Dessa forma, *L. gibba*, uma possível hiperacumuladora de As, deve ter desenvolvido um sistema de defesa mais eficiente para mitigar o estresse induzido por esse metalóide. Além de menor redução nos teores de clorofilas e carotenóides e modificações nos teores de nutrientes, esse sistema de defesa parece envolver respostas correlacionadas de várias enzimas do metabolismo da glutathiona.

A diminuição nos teores de glutathiona mesmo com o aumento de sua biossíntese em *L. gibba* sugere que essa espécie possa apresentar maior quantidade de As quelado, causando menor intensidade de estresse oxidativo e, conseqüentemente, menor redução do crescimento. Mais estudos são necessários para o entendimento da verdadeira participação das fitoquelatinas na tolerância ao As apresentada por esta espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams C.A., Johnson R.E., (1968) ATP Sulfurylase Activity in the Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Physiology** 43:2041-2044.
- Agusa T., Iwata H., Fujihara J., Kunito T., Takeshita H., Minh B.T., Trang P.T.K., Viet P.H., Tanabe S., (2010) Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase (GST) superfamily and arsenic metabolism in residents of the Red River Delta, Vietnam. **Toxicology and Applied Pharmacology** 242:352-362.
- Alvarez V.H., Dias L.E., Ribeiro Jr. E.S., Souza R.B., Fonseca C.A. (2001) **Análise de Enxofre em Materiais Vegetais**. Viçosa: Editora UFV 131 p.
- Anderson, J.V., Davis, D.G., (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum** 120:421-433.
- Anderson, M.E., (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology** 113:548-555.
- Baldwin P.R., Butcher D.J., (2006) Phytoremediation of arsenic by two hyperaccumulators in a hydroponic environment. **Microchemical Journal** 85:297-300.
- Bleeker P.M., Hakyort H.W.J., Blik M., Souer E., Schat H., (2006) Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. **Plant Journal** 45:917-929.
- Bonato C.M., (1999) Efeito do alumínio e do sulfato sobre a atividade da sulfúrilase do ATP e sobre o teor de tióis solúveis em dois cultivares de sorgo. **Acta Scientiarum** 21:549-553.
- Boveris, (1984) **Methods in Enzymology** 105:429-435.

- Cao X., Ma L.Q., Tu C., (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). **Environmental Pollution** 128:317-325.
- Carlberg I., Mannervik, B., (1985) Glutathione reductase. **Methods in Enzymology** 113:484-495.
- Carbonell-Barrachina A.A, Burló F., Burgos-Hernández A., López E., Mataix J., (1997) The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Scientia Horticulturae** 71:167-176.
- Carbonell A.A., Aarabi M.A., DeLaune R.D., Gambrell R.P., Patrick Jr. W.H., (1998) Arsenic in wetland vegetation: Availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. **The Science of the Total Environment** 217:189-199.
- Christophersen H.M., Smith S.E., Pope S., Smith F.A., (2009) No evidence for competition between arsenate and phosphate for uptake from soil by medic or barley. **Environment International** 35:485-490.
- Clark R.B., (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal Agricultural Food Chemistry** 23:458-460.
- Claassen N., Barber S.A., (1974) A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. **Plant Physiology** 54:564-568.
- Cox M.C., (1995) **Arsenic characterization in soil and arsenic effects on canola growth**. Ph.D. dissertation. Louisiana State University, Louisiana.
- Dhankher O.P., Li Y., Rosen B.P., Shi J., Salt D., Senecott J.F., Sashti N.A., Meagher R.B., (2002) Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. **Nature Biotechnology** 20:1140-1145.

- Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G., (1997) Plant glutathione peroxidases. **Physiologia Plantarum** 100:234-240.
- Estrella-Gómez N., Mendoza-Cózatl D., Moreno-Sánchez R., González-Mendoza D., Zapata-Pérez O., Martínez-Hernández A., Santamaría J.M., (2009) The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatins via changes in s_m PCS expression and phytochelatin synthase activity. **Aquatic Toxicology** 91:320-328.
- Fayiga A.O., Ma L.Q., Cao X., Rathinasabapathi B., (2004) Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulation for *Pteris vittata* L.. **Environmental Pollution** 132:289-296.
- Felipe R.T.A., Oliveira J.A., Leão G.A., (2009) Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Árvore** 33:245-254.
- Francesconi K., Visoottiviseth P., Sridokchan W., Goessler W., (2002) Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. **The Science of the Total Environment** 284:27-35.
- Guo J., Dai X., Xu W., Ma M., (2008) Overexpressing GSH1 and A_s PCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. **Chemosphere** 72:1020-1026.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B., (1974) Glutathione-S-transferase. The first step in mercapturic and formation. **Journal of Biological Chemistry** 249:7130-7139.
- Hartley-Whitaker J., Ainsworth G., Vooijs R., Bookum W.T., Schat H., Meharg A.A., (2001) Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Plant Physiology** 126:299-306.
- Heath R.L., Packer L., (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 125:189-198.

- Hunt R., (1978) **Plant growth analysis**. London: Edward Arnold Limited 67p.
- Jain M., Gadre R., (1997) Effect of As on chlorophyll and protein contents and enzymic activities in greening maize tissues. **Water, Air, and Pollution** 93:109-115.
- Khan I., Ahmad A., Iqbal M., (2009) Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 72:626-634.
- Kopriva S., (2006) Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. **Annals of Botany** 97:479-495.
- Krinsky N.I., (1994) The biological properties of carotenoids, **Pure Applied Chemistry** 66:1003-1010.
- Li, Y., Dhankher, O.P., Carreira, L., Balish, R.S., Meagher, R.B., (2005) Arsenic and mercury tolerance and cadmium sensitivity in *Arabidopsis* plants expressing bacterial gamma-glutamylcysteine synthetase. **Environmental Toxicology and Chemistry** 24:1376–1386.
- Li W.X., Chen T.B., Huang Z.C., Lei M., Liao X.Y., (2006) Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L.. **Chemosphere** 62:803-809.
- Lichtenthaler H.K., (1987) Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** 148:350-381.
- Lindeman W., (1958) Observations on the behavior of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light, Proc, 2nd Int. **Conference on the Peaceful Uses Atomic Energy** 24:8-15.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W.H., Cai, Y., Kennelley, E.D., (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic: a hardy, versatile, fastgrowing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. **Nature** 409:579-579.

- Maine M.A., Duarte M.A.V., Sune N.L., (2001) Cadmium uptake by floating macrophytes. **Water Research** 35:2629-2634.
- Maine M.A., Sune N.L., Lager S.C., (2004) Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. **Water Reserch** 38:1494-1501.
- Marin A.R., Pezeshki S.R., Masscheleyn P.H., Choi H.S., (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. **Journal Plant Nutrition** 16:865-880.
- Marschner, H., (1995) **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Acadmic Press 902p.
- Mascher R., Lippmann B., Holzinger S., Bergmann H., (2002) Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. **Plant Science** 163:961-969.
- Matschullat J., Borba R.P., Deschamps E., Figueiredo B.R., Gabrio T., Schwenk M., (2000) Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. **Applied Geochemistry** 15:192-202.
- Meharg A.A., Hartley-Whitaker J., (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist** 154:29-43.
- Meharg A.A., Macnair M.R., (1991) Uptake, accumulation and translocation of arsenate in arsenate-tolerant and non-tolerant *Holcus lanatus* L.. **New Phytologist** 117:225-231.
- Meharg A.A., Macnair M.R., (1992) Supression of the high-affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L.. **Journal of Experimental Botany** 43:519-524.
- Melo E.E.C., Costa E.T.S., Guilherme L.R.G., Faquin V., Nascimento C.W.A., (2009) Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials** 168:479-483.

- Melo E.E.C., Nascimento C.W.A., Santos A.C.Q., (2006) Solubilidade, fracionamento e fitoextração de metais pesados após aplicação de agentes quelantes. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 30:1051-1060.
- Mengel K., Kirkby E.A., (1987) **Principles of Plant Nutrition**. Worblaufen-Bern, Switzerland: International Potash Institute 687p.
- Mkandawire M., Dudel E.G., (2005) Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. **Science of the Total Environment** 336:81-89.
- Mkandawire M., Taubert B., Dudel E.G., (2006) Limitations of growth-parameters in *Lemna gibba* bioassays for arsenic and uranium under variable phosphate availability. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 65:118-128.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V., (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant Physiology and Biochemistry** 44:25-37.
- Mishra S., Srivastava S., Tipathi R.D., Trivedi P.K., (2008) Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L.. **Aquatic Toxicology** 86:205-215.
- Misra H.P., Fridovich I., (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **The Journal of Biological Chemistry** 246:6886-6890.
- Mohammadi M., Karr A.L., (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology** 158:1023-1029.
- Mokgalaka-Matlala N.S., Flores-Tavizón E., Castillo-Michel H., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L., (2009) Arsenic tolerance in mesquite (*Prosopis* sp.): Low molecular weight thiols synthesis and glutathione activity in response to arsenic. **Plant Physiology and Biochemistry** 47:822-826.

- Moons A., (2003) Osgtu3 and Osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. **FEBS Letters** 553:427-432.
- Moreno-Jiménez E., Esteban E., Carpena-Ruiz R.O., Peñalosa J.M., (2009) Arsenic- and Mercury- induced phytotoxicity in the Mediterranean shrubs *Pistacia lentiscus* and *Tamarix gallica* grown in hydroponic culture. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 72:1781-1789.
- Mylona P.V., Polidoros A.N., Scandalios J.G., (1998) Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. **Free Radical Biology & Medicine** 25:576–585.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M.N.V. (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Science** 160:291-299.
- Nichols P.B., Couch J.D., Al-hamdani S.H., (2000) Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. **Aquatic Botany** 68:313-319.
- Noctor G., Foyer C.H., (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 49:249-279.
- Noctor G., 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. **Plant Cell and Environment** 29:409–425.
- Oliveira J.A., (1998) **Efeito do cádmio sobre a absorção, a distribuição e a assimilação de enxofre em aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart) Solms) e salvinia (*Salvinia auriculata* Aubl.)**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Oliveira J.A., Cambraia J., Sousa M.V., Oliva M.A., (2009) Sulphate uptake and metabolism in water hyacinth and salvinia during cadmium stress. **Aquatic Botany** 91:257-261.

- Ozturk F., Duman F., Leblebici Z., Temizgul R., (2010) Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. **Environmental and Experimental Botany** 67:65-70.
- Pawlik-Skowronska B., Kalinowska P.R., Skowronski T., (2004) Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. **Aquatic Toxicology** 70:201-212.
- Połéc-Pawlak, K., Ruzik, R., Abramski, K., Ciurzyńska, M., Gawrónska, H., (2005) Cadmium speciation in *Arabidopsis thaliana* as a strategy to study metal accumulation system in plants. **Analytica Chimica Acta** 540:61–70.
- Raab A., Schat H., Meharg A.A., Feldmann J., (2005) Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complex during exposure to high arsenic concentrations. **New Phytologist** 168:551-558.
- Rahman M.A., Hasegawa H., Ueda K., Maki T., Rahman M.M., (2008) Arsenic uptake by macrophyte *Spirodela polyrhiza* L.: Interactions with phosphate and iron. **Journal of Hazardous Materials** 160:356-361.
- Rausch T., Wachter A., (2005) Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. **Trends in Plant Science** 10:503–509.
- Revees R.D., (2003) Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. **Plant and Soil** 249:57-65.
- Rüegsegger A., Brunold C.H., (1992) Effect of cadmium and/or removal of kernels or shoots on the levels of cysteine, γ -glutamyl-cysteine, glutathione, and TCA-soluble thiols in maize seedlings. **Phyton** 32:109-112.
- Ruiz H.A., (1985) Estimativa dos parâmetros cinéticos K_M e V_{max} por uma aproximação gráfico-matemática. **Revista Ceres** 32:79-84.
- Santos G.A., (2006) **Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao arsênio**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- Sanz-Munoz M., Mendez-Marco M., Mendez-Marco M.T., (1982) Dextro Amino Levulinic-Acid Dehydrase in Germinating Pinus-Pinea Seed. **Revista Espanola de Fisiologia** 38:91-96.
- Schmoger M.E., Oven M., Grill E., (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiology**. 122:793-801.
- Sergiev, V. Alexieva, E. Karanov., (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. **Comptes Rendus Bulgaria Academy of Sciences** 51:121–124.
- Shaibur M.R., Kawai S., (2009) Effect of arsenic on visible symptom and arsenic concentration in hydroponic Japanese mustard spinach. **Environmental Botany** 67:65-70.
- Sharma P., Dubey R.S., (2005) Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 17:35-52.
- Shri, M., Kumar S., Chakrabarty D., Trivedi P.K., Mallick S., Misra P., Shukla D., Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D., Tuli R., (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 72:1102-1110.
- Singh N., Ma L.Q., Srivastava M., Rathinasabapathi B., (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L.. **Plant Science** 170:274-282.
- Singh H.P., Kaur S., Batish D.R., Sharma V.P., Sharma N., Kohli R.K., (2009) Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). **Nitric Oxide** 20:289-297.
- Smith A.H., Lingas E.O., Rahman M., (2000) Contamination of drinking water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency, Bull. **World Health Organization** 9:1093-1103.

- Smith F.W., Rae A.L., Hawkesford M.J., (2000) Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1465:236-245.
- Srivastava S., D'Souza S.F., (*in press*) Effect of variables sulfur supply on arsenic tolerance and antioxidant responses in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.
- Srivastava S., Mishra S., Tripathi R.D., Dwivedi S., Trivedi P.K. Tandon P.K., (2007) Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Environmental Science & Technology** 41:2930-2936.
- Terwelle H.F., Slater E.C., (1967) Uncoupling of respiratory chain phosphorylation by arsenate. **Biochimica et Biophysica Acta** 143:1-17.
- Ullrich-Eberius C. I., Sanz A., Novacky J., (1989) Evaluation of arsenate and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. **Journal Experimental Botany** 40:119-128.
- Wang L., Duan G., (2009) Effect of external and internal phosphate status on arsenic toxicity and accumulation in Rice seedlings. **Journal of Environmental Sciences** 21:346-351.
- Vestena S., (2004) **Efeito do Cádmio sobre a atividade de enzimas antioxidativas e sobre o metabolismo de glutathiona em aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart) Solms) e salvínia (*Salvinia auriculata* Aubl.)**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Zhang J., Zhao Q., Huang Y., (*in press*) Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings. **Environmental and Experimental Botany**.

6. APÊNDICE

Quadro 1. Análise de variância sumarizada do teor de arsênio em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença deste elemento.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	2227845,0	227,11*
ESPÉCIE	1	1553523,0	158,37*
DOSE X ESPÉCIE	1	1553523,0	158,37*
RESÍDUO	20	9809,3	
CV (%)		32,5	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 2. Análise de variância sumarizada da taxa de crescimento relativo em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	11157,8	232,6*
ESPÉCIE	1	25122,1	523,7*
DOSE X ESPÉCIE	1	4,8	0,1 ^{NS}
RESÍDUO	20	47,9	
CV (%)		5,7	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 3. Análise de variância sumarizada da concentração de ânion superóxido em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	0,9375E-03	1,1 ^{NS}
ESPÉCIE	1	0,5104167E-02	1,7 ^{NS}
DOSE X ESPÉCIE	1	0,5041667E-03	0,6 ^{NS}
RESÍDUO	20	0,8108333E-03	
CV (%)		5,9	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 4. Análise de variância sumarizada da concentração de peróxido de hidrogênio em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	529,6	122,0*
ESPÉCIE	1	14114,9	3253,2*
DOSE X ESPÉCIE	1	140,9	32,4*
RESÍDUO	20	4,3	
CV (%)		5,3	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 5. Análise de variância sumarizada da concentração de MDA em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	0,4411838E-03	65,3*
ESPÉCIE	1	0,2094504E-03	31,0*
DOSE X ESPÉCIE	1	0,4242004E-03	62,8*
RESÍDUO	20	0,674875E-05	
CV (%)		8,0	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 6. Análise de variância sumarizada da concentração de clorofila *a* em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	708181,9	499,5*
ESPÉCIE	1	624105,2	440,2*
DOSE X ESPÉCIE	1	119396,0	84,2*
RESÍDUO	20	1417,5	
CV (%)		6,4	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 7. Análise de variância sumarizada da concentração de clorofila *b* em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	119765,9	93,6*
ESPÉCIE	1	104933,8	82,0*
DOSE X ESPÉCIE	1	12656,9	9,8*
RESÍDUO	20	1279,0	
CV (%)		18,1	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 8. Análise de variância sumarizada da concentração de clorofila total em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	1410412,0	857,9*
ESPÉCIE	1	1240858,0	754,8*
DOSE X ESPÉCIE	1	209800,9	127,6*
RESÍDUO	20	1643,8	
CV (%)		5,2	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 9. Análise de variância sumarizada da concentração de carotenóides em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	19184,8	31,4*
ESPÉCIE	1	136240,5	223,6*
DOSE X ESPÉCIE	1	22518,7	36,9*
RESÍDUO	20	609,1	
CV (%)		9,2	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 10. Análise de variância sumarizada da concentração de cálcio em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	44,2	18,3*
ESPÉCIE	1	297,2	123,5*
DOSE X ESPÉCIE	1	0,614	0,2 ^{NS}
RESÍDUO	20	2,4	
CV (%)		19,9	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 11. Análise de variância sumarizada da concentração de magnésio em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	1,1	16,6*
ESPÉCIE	1	0,9397E-01	1,4 ^{NS}
DOSE X ESPÉCIE	1	0,1844E-02	0,02 ^{NS}
RESÍDUO	20	0,6671E-01	
CV (%)		14,6	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 12. Análise de variância sumarizada da concentração de fósforo em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	39,0	37,5*
ESPÉCIE	1	0,81189E-01	0,07 ^{NS}
DOSE X ESPÉCIE	1	0,1741509E-01	0,01 ^{NS}
RESÍDUO	20	1,0	
CV (%)		15,29	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 13. Análise de variância sumarizada da concentração de enxofre em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	0,1	66,6*
ESPÉCIE	1	0,3	142,9*
DOSE X ESPÉCIE	1	0,1	47,0*
RESÍDUO	20	0,2221E-02	
CV (%)		6,8	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 14. Análise de variância sumarizada da concentração de ferro em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	54775,0	1,0 ^{NS}
ESPÉCIE	1	2215528,0	44,3 *
DOSE X ESPÉCIE	1	11054,6	0,2 ^{NS}
RESÍDUO	20	49978,1	
CV (%)		23,3	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 15. Análise de variância sumarizada da concentração de manganês em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	53,3	0,02 ^{NS}
ESPÉCIE	1	589677,6	239,9*
DOSE X ESPÉCIE	1	176,1	0,07 ^{NS}
RESÍDUO	20	2457,3	
CV (%)		24,1	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 16. Análise de variância sumarizada do V_{max} para absorção de fosfato em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	2,0	132,1*
ESPÉCIE	1	0,308802E-01	2,0*
DOSE X ESPÉCIE	1	0,3	22,9*
RESÍDUO	8	0,1523414E-01	
CV (%)		9,6	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 17. Análise de variância sumarizada do K_M para absorção de fosfato em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	10,3	22,9*
ESPÉCIE	1	220,2	485,4*
DOSE X ESPÉCIE	1	15,5	34,2*
RESÍDUO	8	0,4	
CV (%)		9,8	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 18. Análise de variância sumarizada do V_{max} para absorção de sulfato em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	0,129429E-01	23,0*
ESPÉCIE	1	0,6302083E-04	0,1 ^{NS}
DOSE X ESPÉCIE	1	0,1066244E-01	19,0*
RESÍDUO	8	0,5608283E-03	
CV (%)		15,5	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 19. Análise de variância sumarizada do K_M para absorção de sulfato em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	0,8670E-01	0,5 ^{NS}
ESPÉCIE	1	0,7	1,1 ^{NS}
DOSE X ESPÉCIE	1	0,6163333E-01	0,3 ^{NS}
RESÍDUO	8	0,6	
CV (%)		5,3	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 20. Análise de variância sumarizada do teor de glutatona em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	0,9	110,4*
ESPÉCIE	1	0,2	36,2*
DOSE X ESPÉCIE	1	0,4743704E-01	5,7*
RESÍDUO	20	0,8271708E-02	
CV (%)		12,3	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 21. Análise de variância sumarizada da atividade das sulfurilases do ATP em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	237,9	22,6*
ESPÉCIE	1	261,9	24,8*
DOSE X ESPÉCIE	1	68,8	6,5*
RESÍDUO	20	10,5	
CV (%)		11,2	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 22. Análise de variância sumarizada da atividade das sintetases da - glutamilcisteína em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	383848,3	5,0*
ESPÉCIE	1	383587,9	5,0*
DOSE X ESPÉCIE	1	383595,4	5,0*
RESÍDUO	20	76676,32	
CV (%)		10,1	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 23. Análise de variância sumarizada da atividade das peroxidases da glutathione em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	802,3	15,7*
ESPÉCIE	1	15657,5	306,8*
DOSE X ESPÉCIE	1	843,1	16,5*
RESÍDUO	20	51,0	
CV (%)		7,7	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 24. Análise de variância sumarizada da atividade das redutases da glutathione em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	0,2154004E-01	1834,4*
ESPÉCIE	1	0,23500004E-01	2001,4*
DOSE X ESPÉCIE	1	0,9165042E-02	780,55*
RESÍDUO	20	0,1174167E-04	
CV (%)		2,8	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

Quadro 25. Análise de variância sumarizada da atividade das sulfotransferases da glutationa em duas espécies de plantas aquáticas, na ausência e presença de As.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO	F
DOSE	1	3782,5	82,0*
ESPÉCIE	1	25997,5	563,8*
DOSE X ESPÉCIE	1	3525,9	76,4*
RESÍDUO	20	46,1	
CV (%)		8,1	

^{NS} Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade