

NAIARA VIANA CAMPOS

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE *Borreria verticillata*
(RUBIACEAE) EXPOSTAS A DIFERENTES DOSES DE ARSÊNIO E
FÓSFORO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

NAIARA VIANA CAMPOS

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE *Borreria verticillata*
(RUBIACEAE) EXPOSTAS A DIFERENTES DOSES DE ARSÊNIO E
FÓSFORO**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2011.

Prof^a. Dr^a. Luzimar Campos da Silva
(Co-orientadora)

Prof^a. Dr^a. Kellen Lagares Ferreira Silva

Prof^a. Dr^a. Aristéa Alves Azevedo
(Orientadora)

Aos meus amáveis pais, Oldac e Lúdia, que enchem minha vida de luz e amor;
Aos meus queridos irmãos: Fernando, Ana Cristina, Giovane, Gisele, Vagner e Oldac, que
embora sejam muitos são únicos e enchem meu coração de alegria;
Ao Vitor, meu noivo, que sempre compartilha das minhas conquistas, tristezas e sonhos;
Aos meus amigos, de longe e de perto, que são tesouros imensuráveis na minha vida.

A todos vocês,

DEDICO

"Sempre que me batem o desânimo, a desesperança e o temor, procuro me desvencilhar destes sentimentos, lembrando que, lá no final, está um sonho muito maior que o meu.

Está o sonho de Deus" (Ivna de Sá).

“Tudo é possível àquele que crê” (Mc 9, 23).

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu melhor amigo, fonte de todas as coisas, por me sustentar ao longo dessa caminhada e conceder-me a graça da felicidade!

A Universidade Federal de Viçosa que possibilitou a conclusão de mais uma etapa na minha formação profissional e a CAPES pela concessão da bolsa vinculada ao PNADB.

A minha orientadora, Aristéa Alves Azevedo, pela sua dedicação, incentivo e pela amizade que cresce a cada ano. Obrigada pelo carinho e por todos os ensinamentos!

A professora Luzimar Campos da Silva (Tia Lú), pela atenção e acolhimento, por sempre torcer pelas nossas conquistas (muito obrigada pela viagem para a Espanha!).

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro, pelo auxílio e aconselhamento, que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Fábio Murilo da Matta pelo empréstimo do MINI-PAN.

A todos os professores do Departamento de Biologia Vegetal que contribuíram para a minha formação profissional.

A Nívea, que mais que do que uma técnica é uma amiga e companheira para todas as horas. Menina, você vale ouro!

A Mercês (DBV), pela confiança e auxílio nos trabalhos de laboratório.

Ao Carlinhos (DPS) pelo auxílio nas leituras no plasma.

Ao Gilmar Valente, pelo auxílio nas coletas e no envio das espécimes para especialistas.

A Dr^a. Zefa Valdivina Pereira e ao Prof. Elnatan Bezerra de Souza pela identificação das populações de *Borreria verticillata*.

Ao Rogério Gomide, pelo auxílio na montagem dos experimentos.

Ao Samuel (Samu) por ter me ajudado inúmeras vezes durante esse trabalho com toda paciência e disponibilidade do mundo. Deus te abençoe!

Ao Ivan pelo auxílio na tradução do resumo, pela troca de experiências e amizade, por ter aturado todos os meus momentos de desespero.

A Izabela Fialho (Bela, Mis-Texas), pela amizade e pela preciosa dedicação durante todo o experimento. Não sei o que eu teria feito sem a sua ajuda!

A Larissa e a Talita (garotas pH-metro), que foram um auxílio “sem noção” nesse trabalho, tornando os momentos difíceis alegres e divertidos. “Eu gosto é de emoção!”

A Mariana (Mari), ao Tiago (Tica), ao Anderson, a Loiane, a Jaque, ao Ignácio e a Polly, por terem me socorrido nos momentos mais “hard”. Vocês são demais!

Aos colegas de laboratório pela convivência agradável e frutuosa: Day, Diego, Dya, Cléber, Clébio, Elisa, Ítalo, Karina, Narah, Pé, Samuel, Sara(s), Vanessa, Victor... Vocês moram no meu coração!

Aos BIC-Júniors: Dani, Elaine, Eluana, Luana e Marcel. Obrigada por tudo!

Aos colegas de turma por todos os momentos de convivência e aprendizado, em especial a Lorena, Gláucia, Carol, Josi, Márcia, Evelyn ... “Tá acabando galera!”

Aos funcionários da Botânica por todo apoio concedido.

As amigas da Biologia: Carla, Letícia, Brenda, Marcela, Marina, Lorena... pelas conversas amigas e por tudo que passamos juntas.

As meninas da Q-ública: Teca, Naiara, Lauana, Alaila, Nínive e Natália, por serem minhas irmãzinhas de coração. Obrigada pelo carinho e compreensão! Saudades...

Aos amigos de Sete Lagoas: Alessandra, Bruninha, Fernandinha, Janssen, João Marcos, Luíza, Vanessa, Vinícius e Thomaz, por serem meus eternos amigos!

Aos meus amigos do MUR e da RCC, de modo especial ao G.O.U. Cenáculo e a Equipe Estadual-MG, por serem instrumentos de Deus na minha vida! Amo!!!

A Patrícia (Paty), a Jana (Perseverança) e a Quênia, por deixarem sempre sua marca na minha vida, mesmo estando longe...

Ao pessoal do Acampamento Manaim e do FAC por todas as lições de amor e fé.

Aos meus pais por serem meu refúgio, por me amarem do jeito que sou e por me ensinarem sempre a seguir em frente. “Je t’aime”!!!

Aos meus irmãos, por todo o carinho e cuidado que tem comigo e por tudo que representam na minha vida!

Aos meus cunhados e cunhada, pela presença amiga e alegre na nossa família.

A toda minha família, aos amigos de família e aos meus Padrinhos por serem apoio e torcida em cada etapa da minha vida.

Ao Vitor, meu noivo, por todo seu zelo comigo, por se fazer presente em todos os momentos, por sua paciência e simplicidade, por completar a minha vida de uma maneira única e inexplicável! Amo você!

A todos que mesmo sem saber e mesmo sem serem citados aqui nominalmente foram fundamentais para o meu crescimento humano e pessoal.

MUITO OBRIGADA!!!

BIOGRAFIA

Naiara Viana Campos, filha de Oldac Campos e Ilídia Vieira Viana Campos, nasceu em Sete Lagoas, MG, em 16 de março de 1985.

Cursou o ensino médio no colégio Impulso, em Sete Lagoas, concluindo em 2003.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa em março de 2004 e concluiu o curso de licenciatura e bacharelado em Ciências Biológicas em janeiro de 2009.

Foi monitora da disciplina de Anatomia Vegetal de Espermatófitas durante um ano e bolsista de Iniciação Científica durante três anos no laboratório de anatomia vegetal, onde desenvolveu trabalhos relacionados aos efeitos de poluentes em plantas.

Em março de 2009, iniciou o Mestrado em Botânica, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso com a defesa da dissertação intitulada “Respostas morfofisiológicas em plantas de *Borreria verticillata* (Rubiaceae) expostas a diferentes doses de arsênio e fósforo”, em fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Arsênio: um problema ambiental	1
1.2. Arsênio: efeitos tóxicos em plantas.....	3
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1. Procedência das mudas e condições de cultivo	6
2.2. Acúmulo de biomassa e concentração de arsênio (As) e fósforo (P).....	7
2.3. Fatores de translocação de As e P e bioacumulação de As	7
2.4. Análise visual e microscópica	8
2.5. Determinação do nível de fenóis totais (FST) e de aldeído malônico (MDA).....	8
2.6. Parâmetros de fluorescência da clorofila.....	9
2.7. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....	10
2.8. Análises estatísticas.....	10
3. RESULTADOS.....	10
3.1. Análise visual e microscópica	10
3.2. Concentração de fenóis solúveis totais (FST) e de aldeído malônico (MDA).....	12
3.3. Acúmulo de biomassa	12
3.4. Concentração de arsênio (As) e fósforo (P)	12
3.5. Fatores de translocação de As e P e bioacumulação de As	13
3.6. Parâmetros de fluorescência da clorofila e teor de pigmentos fotossintetizantes.....	13
4. DISCUSSÃO.....	14
5. CONCLUSÃO	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

RESUMO

CAMPOS, Naiara Viana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. Respostas morfofisiológicas em plantas de *Borreria verticillata* (Rubiaceae) expostas a diferentes doses de arsênio e fósforo. Orientadora: Aristéa Alves Azevedo. Coorientadores: Luzimar Campos da Silva e Marcelo Ehlers Loureiro.

Plantas que crescem em ambientes contaminados com arsênio podem exibir estratégias de tolerância a esse elemento, as quais são selecionadas durante a evolução da espécie. Este trabalho teve como objetivo comparar o acúmulo e a translocação de arsênio (As) e fósforo (P) em plantas de *Borreria verticillata*, provenientes de locais contaminados (MG) e não contaminados (MP) com As, e caracterizar as alterações morfoanatômicas e fisiológicas da espécie em resposta a esse poluente. Plantas de *B. verticillata* foram cultivadas em sistema hidropônico e expostas a diferentes doses de As (0, 33, 66 e 132 μM) e P (0,5; 1,0 e 1,5 mM). Após doze dias de exposição, foram mensurados os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e coletadas amostras de folhas, para a análise do teor de pigmentos fotossintéticos e de fenóis solúveis totais (FST), e de raízes, para análise do conteúdo de FST e de aldeído malônico (MDA). Fragmentos de raízes e folhas foram coletados e fixados em Karnovsky e em formalina e sulfato ferroso para análise em microscopia de luz e para histoquímica de compostos fenólicos, respectivamente. As plantas foram secas em estufa de ventilação forçada, para a obtenção da biomassa seca, e reduzidas em moinho para a quantificação do acúmulo de As e P, em espectrofotômetro de absorção atômica com plasma indutivamente acoplado. Os teores de As e P foram utilizados para o cálculo dos fatores de bioacumulação (FB) de As e de translocação (FT) de As e P. Ao final do experimento, a parte aérea das plantas não apresentava sintomas visuais como cloroses ou necroses. O As não alterou a concentração de clorofilas e não promoveu danos anatômicos nas folhas das plantas de ambas as populações. O sistema radicular foi bastante afetado apresentando sinais de estresse oxidativo e alterações no desenvolvimento de primórdios radiculares em respostas ao arsênio. O As promoveu o aumento do conteúdo de MDA nas raízes das plantas de ambas as populações e de FST na raiz das plantas da MP. As raízes das plantas do MG do tratamento controle apresentaram um maior nível de FST e um menor conteúdo de MDA. As plantas da MP cultivadas em solução nutritiva com 0,5mM de P se mostraram mais sensíveis ao As que as plantas do MG, apresentando sinais de murcha, decréscimo da biomassa seca, alteração no formato de elementos de vaso e redução expressiva da dissipação fotoquímica. As plantas do MG

exibiram um menor acúmulo de As e uma maior concentração de P nos tecidos, especialmente em baixo nível de P, o que se traduziu em menores alterações morfofisiológicas em resposta ao arsênio. Acredita-se que a maior tolerância ao As das plantas do MG esteja associada ao maior nível constitutivo de compostos fenólicos e à regulação mais apurada do sistema de transporte de fosfato/arsenato.

ABSTRACT

CAMPOS, Naiara Viana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Morphophysiological responses in plants of *Borreria verticillata* (Rubiaceae) exposed to different doses of arsenic and phosphorus.** Adviser: Aristéa Alves Azevedo. Co-advisers: Luzimar Campos da Silva and Marcelo Ehlers Loureiro.

It was observed that some plants growing on arsenic-contaminated sites exhibit specific strategies of arsenic tolerance, which are selected during evolution. Considering that, the aim of this study was compare the accumulation and translocation of arsenic (As) and phosphorus (P) in *Borreria verticillata* plants from arsenic-contaminated (MG) and uncontaminated (MP) sites, and characterize some physiological and morphoanatomic changes in response to this pollutant. Plants of *B. verticillata* were grown under hydroponic conditions and exposed to different As (0, 33, 66 and 132 μM) and P (0,5; 1,0 and 1,5 mM) levels. After twelve days of exposure, the parameters of chlorophyll fluorescence were measured, leaf samples were collected for photosynthetic pigments and total soluble phenolics (TSP) content analysis, while root samples in turn, were collected for (TSP) and malondialdehyde (MDA) content analysis. Fragments of roots and leaves were collected and fixed in Karnovsky and formalin and ferrous sulfate for light microscopy and histochemistry of phenolic compounds analysis, respectively. For dry biomass evaluation, plants were oven dried, ground in a mill and subsequently weight. As and P accumulation analysis were performed from dried samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometer, and the results provided were used for As bioaccumulation factor (BF), as well as As and P translocation factors (TF). At the end of the experiment, shoots had no visual symptoms such as chlorosis or necrosis. Exposure to arsenic did not alter chlorophyll contents, and no anatomical damage was observed in leaves of both populations. On the other hand, the root system was visible affected by As, with signs of oxidative stress and changes in root primordia development. Treatment with the metalloid increased MDA content in roots of both populations, and TSP content only in roots of MP plants. Plant of MG showed a higher level of TSP and lower MDA content in the roots, in the control treatment, than MP plants. A higher sensitivity to As was observed in MP plants grown in nutrient solution containing 0.5 mM P, compared to MG plants under the same P treatment, which showed symptoms of wilting, biomass reducing, changes in vessel elements shape, and a substantial reduction of photochemical dissipation. In addition, MG plants exhibited lower As accumulation and higher P content in their

tissues, especially at low P levels, which resulted in reduced morphophysiological changes by As treatment. Higher As tolerance observed in MG plants might be associated with higher constitutive phenolic levels and more accurate regulation of the phosphate/arsenate transport system.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arsênio: um problema ambiental

Metal pesado é um termo geral aplicado ao grupo de metais e metaloides que possuem densidade maior que $6,0 \text{ g cm}^{-3}$ (Alloway, 1993), comumente associados a problemas de contaminação ambiental. Entretanto, alguns metais e metaloides com densidade menor que $6,0 \text{ g cm}^{-3}$, a exemplo do arsênio (As), são incluídos no grupo dos metais pesados devido aos seus efeitos tóxicos ao meio ambiente (Corrêa, 2006). A contaminação de solos e de águas subterrâneas por arsênio representa um problema de escala mundial, resultante da atividade geológica natural e de fontes antropogênicas como mineração, manufatura de semicondutores, produtos florestais, fertilizantes, pesticidas e esgotos (Francisco *et al.*, 2002).

Águas subterrâneas com elevadas concentrações naturais de As estão geralmente relacionadas à presença de rochas ígneas e sedimentares ricas em minérios sulfetados (Ladeira *et al.*, 2002; Rhodes, 2010) e representam um sério problema ambiental e de saúde em países como Bangladesh, Vietnã, Índia e China (Berg *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002; Milton *et al.*, 2005). O arsênio está presente em mais de duzentos minerais, sendo o mais comum a arsenopirita (Mandal & Susuki, 2002). A arsenopirita é um dos principais minerais associados ao ouro (Pulz *et al.*, 1992), tornando a mineração aurífera um processo estritamente relacionado à liberação de As para o meio ambiente (Percival *et al.*, 1996).

No Brasil, as fontes naturais de contaminação por As, identificadas até o momento, estão relacionadas às rochas que hospedam depósitos auríferos sulfetados, como as da região do Quadrilátero Ferrífero (MG), da Fazenda Brasileiro (Teofolândia-BA), da Mina III (Crixás, GO) e do Vale do Ribeira (SP) (Pataca, 2005). As atividades de mineração e refino de minério constituem as principais fontes antropogênicas de arsênio no país. A exploração mineral do Quadrilátero Ferrífero desde o século XVII foi responsável pela produção de 1.300 t de Au e, considerando a razão As/Au nos minérios, estima-se que pelo menos 390.000 t de As devem ter sido liberadas para o ambiente (Borba, 2002). A mineração de ouro e o funcionamento de fábricas de trióxido de arsênio nessa região levaram à contaminação do solo e da água com As, colocando em risco a vida dos moradores de cidades como Ouro Preto, Mariana, Santa Bárbara e Nova Lima (Borba, 2002; Deschamps & Matschullat, 2007).

A exposição humana ao arsênio pode provocar doenças de pele, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e diabetes (Barra *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 2009). Segundo a Agência de Proteção Ambiental (USA-EPA, 1988) o As é um elemento carcinogênico do grupo A, conhecido por causar câncer de pele, de bexiga e de pulmão. O arsênio pode atravessar a barreira placentária, produzindo morte fetal e má formação em muitas espécies animais, incluindo o homem (US-EPA, 1998). A ingestão de água contaminada é a maior causa de intoxicação humana por arsênio (Matschullat, 2000), tendo sido associada ao aumento do número de abortos espontâneos e de natimortos em Bangladesh (Milton *et al.*, 2005) e da ocorrência de câncer e lesões na pele em Taiwan (Chen *et al.*, 2003), Índia e Bangladesh (Rahman *et al.*, 2001) e no Chile (Ferrecio *et al.*, 2000), dentre outros países.

A poluição por arsênio é agravada pelo longo tempo de persistência desse elemento no ambiente (Mercedes *et al.*, 2002), exigindo a adoção de medidas eficientes para sua remoção. Métodos físico-químicos tradicionais utilizados na remoção de poluentes apresentam elevados custos e geram grandes volumes de material tóxico, além de alterarem a estrutura e a ecologia dos solos (Salt *et al.*, 1995). A utilização de plantas na remediação de sítios impactados constitui uma alternativa economicamente viável e de baixo impacto ambiental (Cunningham & Ow, 1996), que tem atraído o interesse de pesquisadores e de órgãos públicos.

A fitorremediação consiste em um conjunto de tecnologias que faz uso de processos naturais, pelos quais as plantas e a população microbiana em sua rizosfera degradam e sequestram poluentes orgânicos e inorgânicos de solos e águas contaminadas (Pilon-Smits, 2005). Segundo Jadia & Fulekar (2009), a fitorremediação engloba quatro processos principais: fitoextração (extração e translocação de contaminantes para a parte aérea da planta), fitoestabilização (redução da mobilidade de poluentes no solo através da sua adsorção e complexação), rizofiltração (concentração de poluentes, provenientes de águas contaminadas, no sistema radicular da planta) e fitovolatilização (transformação de contaminantes do solo em compostos voláteis que podem ser eliminados pela planta).

A fitoextração é aplicada em várias partes do mundo e, em muitos países, em escala comercial (Lasat, 2002). Estudos realizados na Suécia demonstraram que a espécie *Salix vitaminali* pode reduzir em mais de 60% a concentração de Pb no solo após três anos de plantio (Greger *et al.*, 2003). A revegetação de um antigo sítio de atividades metalúrgicas na Bélgica foi realizada com êxito através da aplicação de um agente químico sequestrante

e da utilização das espécies tolerantes *Agrostis capillaris* e *Festuca rubra* (Vangronsveld & Cunningham, 1998). Plantas de sorgo, que apresentam sistema radicular fibroso, profundo e bem ramificado, são capazes de reduzir a lixiviação de metais pesados no solo através da imobilização e da concentração de metais na raiz (Jadia & Fulekar, 2008). Diversas espécies de clima temperado tem sido apontadas como promissoras em estudos de fitorremediação, entretanto, no Brasil, as investigações nesse campo ainda são pouco expressivas (Pereira, 2005). A fitorremediação é uma técnica promissora que requer ação conjunta de profissionais de diversas áreas, no intuito de identificar espécies capazes de atuar na descontaminação de solos, principalmente em condições edafoclimáticas brasileiras (Pires *et al.*, 2003).

A seleção de espécies fitorremediadoras deve levar em conta características como: capacidade de tolerar elevadas concentrações do contaminante no meio, através da retenção no sistema radicular ou translocação do poluente para a parte aérea, possuir alta taxa de crescimento e produção de biomassa, ser de fácil propagação, e de ocorrência natural em áreas poluídas (Vose *et al.*, 2000). Além disso, é necessário conhecer as repostas morfológicas e fisiológicas das espécies quando expostas a determinadas concentrações do poluente, de modo a avaliar a sua real tolerância ao estresse, tendo em vista o tempo de permanência da planta no ambiente contaminado.

1.2. Arsênio: efeitos tóxicos em plantas

O arsênio é um nutriente não essencial para plantas, que pode estimular o crescimento vegetal, quando presente em pequenas concentrações, ou promover efeitos fitotóxicos em espécies não tolerantes ao As expostas a elevadas doses desse elemento (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1998; Horswell & Speir, 2006). A fitotoxicidade do arsênio depende, dentre outros fatores, da sua forma química e concentração (Patra *et al.*, 2004), sendo as formas inorgânicas, arsenato (As^{+5}) e arsenito (As^{+3}), as mais tóxicas (Barra *et al.*, 2000). O arsenito se liga a grupos sulfidrilas de enzimas e proteínas, resultando em disfunção celular (Hughes, 2002; Raquel & Tena, 2005). O arsenato é absorvido como um análogo não funcional do fosfato e pode substituir o fósforo nas moléculas de ATP (Ullrich-Eberius *et al.*, 1989), alterando o fluxo energético celular (Meharg, 1994; Hughes, 2002).

Metais pesados afetam diretamente vários processos bioquímicos e fisiológicos, ocasionando redução do crescimento, inibição da fotossíntese e da respiração e degeneração de organelas celulares (Vangronsveld & Clijsters, 1994). O arsênio pode alterar a eficiência fotossintética por meio do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), da danificação das membranas dos tilacóides e da redução do conteúdo de clorofilas e carotenóides, da atividade fotoquímica e da fixação de CO₂ (Päivöke & Simola, 2001; Stoeva & Bineva, 2003; Stoeva *et al.*, 2003).

Espécies reativas de oxigênio atuam como mensageiros intracelulares durante os processos de crescimento e diferenciação celular (Sauer *et al.*, 2001). Alterações no formato das células parenquimáticas do córtex e na diferenciação de elementos condutores foram relatadas para raízes de *Pisum sativum* (Päivöke, 1983), *Phaseolus aureus* (Singh *et al.*, 2007) e *Cajanus cajan* (Barbosa, 2009) expostas ao arsênio. Em folhas de *Borreria verticillata* o arsênio promoveu alterações na estrutura de estômatos e de tricomas, desorganização do mesofilo e retração do protoplasma de células do parênquima clorofiliano (Silva, 2008). Alterações ultraestruturais foram encontradas em mitocôndrias de *Raphanus sativus* (Simon *et al.*, 2000) e em cloroplastos de *Pteris vitata*, em reposta ao arsênio (Li *et al.*, 2006).

Plantas e microorganismos apresentam dois mecanismos principais de tolerância ao arsênio (Inouhe, 2005). O primeiro consiste na restrição da absorção de As (Meharg & Macnair, 1990; Fujiwara *et al.*, 2000), e o segundo na sua detoxificação intracelular (Edmonds & Francesconi, 1981; Kaise *et al.*, 1988). A supressão do sistema de transporte de alta afinidade de fosfato é um importante mecanismo de tolerância encontrado em *Holcus lanatus*, que possibilita a redução do influxo de arsenato (Meharg & Macnair, 1992). A detoxificação de As envolve a complexação do arsenito com peptídeos ricos em tióis, particularmente as fitoquelatinas (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001a; Schmöger *et al.*, 2000). A complexação de As pode ser aumentada pela ação da enzima arsenato redutase que reduz arsenato a arsenito, o qual é imobilizado. Entretanto, esse mecanismo não é suficiente para explicar a elevada capacidade de detoxificação presente em plantas hiperacumuladoras de arsênio (Gonzaga *et al.*, 2006), as quais apresentam fator de translocação e de bioacumulação de As > 1 e acúmulo total de As superior a 1000 mg Kg⁻¹ na sua biomassa (Ma *et al.*, 2001).

Os compostos fenólicos constituem também importantes moléculas antioxidantes que atuam na neutralização de radicais livres e na quelação de metais de transição, agindo

tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Michalak, 2006; Shahidi *et al.*, 1992). Outro possível mecanismo de sequestro de metais pesados é a sua incorporação na estrutura de cristais de oxalato (Choi *et al.*, 2001; Mazen *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2001).

Os mecanismos de tolerância ao arsênio envolvem tanto respostas constitutivas quanto adaptativas (Meharg, 1994), sugerindo que a tolerância a este elemento varia de acordo com a espécie e com local onde os indivíduos se desenvolvem. Embora espécies vegetais possam diferir substancialmente na sua habilidade de absorver, translocar e acumular arsênio (Bernal *et al.*, 1975; Macnair *et al.*, 1992), populações distintas de uma mesma espécie podem apresentar um grau de tolerância variado, de acordo com as pressões seletivas presentes em cada um dos ambientes. Plantas que crescem em sítios contaminados com metais pesados podem exibir estratégias de tolerância a metais, as quais são selecionadas durante a evolução da espécie (Patra *et al.*, 2004). Populações de *Agrostis tenuis* provenientes de áreas com funcionamento de minas apresentam tolerância a metais presentes em grandes concentrações no solo dessas regiões, ao contrário de populações dessa espécie que se desenvolvem em pastagens comuns (Gregory & Bradshaw, 1965).

Borreria verticillata (L.) G.F.W. Mayer (Rubiaceae), também denominada de vassourinha ou erva-botão, é uma planta herbácea com propriedades fitoterápicas (Simões *et al.*, 1986; Ferreira & Rosa, 2009) muito conhecida como espécie invasora de pastagens e áreas cultivadas (Modesto Júnior & Mascarenhas, 2001), devido ao seu crescimento rápido e fácil adaptação a diversos tipos de ambiente. Essa espécie é nativa do continente americano (Maynard *et al.*, 1980) e possui distribuição ampla no território brasileiro, desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (Dimitri, 1959).

A ocorrência de *Borreria verticillata* na região de Nova Lima (MG, Brasil), cidade que abriga a mais antiga mina de ouro em operação do mundo (Deschamps & Matschullat, 2007), foi o primeiro indício da sua tolerância ao arsênio. Essa espécie é encontrada de modo particular no Morro do Galo, região que apresenta um teor médio de $10.975 \text{ mg Kg}^{-1}$ As no solo em função do depósito de antigos rejeitos provenientes de uma fábrica de trióxido de arsênio (Deschamps & Matschullat, 2007). Estudos experimentais realizados por Silva (2008) constataram que plântulas de *Borreria verticillata*, obtidas a partir de sementes provenientes do Morro do Galo, possuem capacidade de acumular quantidades expressivas de arsênio nas raízes e na parte aérea, sem apresentarem redução na concentração de fósforo nos tecidos.

Este trabalho teve como objetivo comparar o acúmulo e a translocação de arsênio e fósforo em plantas de *Borreria verticillata* provenientes de locais contaminados e não contaminados com As e caracterizar as alterações morfoanatômicas e fisiológicas dessa espécie em resposta ao arsênio, com destaque para a síntese de compostos fenólicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedência das mudas e condições de cultivo

Plantas de *Borreria verticillata* (L.) G.F.W. Mayer (Rubiaceae) foram coletadas em sítios contaminados e não contaminados com arsênio. O sítio não contaminado situa-se na Mata do Paraíso (20°38'07" S e 42°51'31" W), município de Viçosa (MG), e o sítio contaminado com arsênio no Morro do Galo (19°57'45" S e 43°51'07" W), Nova Lima (MG), em região de depósito de antigos rejeitos de uma fábrica de trióxido de arsênio.

As plantas coletadas foram cultivadas em areia até a emissão de novos ramos. Posteriormente, estacas com 3 a 4 nós foram retiradas e plantadas em vasos individuais contendo areia, recebendo irrigação diária e adubação semanal com solução nutritiva de Hoagland ½ F (Hoagland & Arnon, 1950). Após dois meses de cultivo, as mudas foram transferidas para sistema hidropônico em caixas de isopor (4 L), protegidas com plástico preto para evitar a entrada de luz externa (Fig. 1D). As raízes das mudas foram lavadas previamente com hipoclorito de sódio (20%) para desinfestação. As plantas foram mantidas em solução nutritiva de Hoagland (½ F) sob aeração constante. O pH da solução foi ajustado diariamente para 5,5 e a solução nutritiva foi renovada a cada 3 dias.

Após dez dias da transferência das mudas para o sistema hidropônico, foi aplicado o tratamento com arsênio, na forma de arseniato de sódio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), e fosfato, fornecido na forma de KH_2PO_4 . Foi utilizada uma combinação entre quatro concentrações de arsênio (0, 33, 66 e 132 μM) e três de fosfato (0,5; 1,0 e 1,5 mM), totalizando doze tratamentos para cada população. As doses de arsênio foram as mesmas utilizadas por Silva (2008) e as doses de fósforo foram adaptadas de Huang *et al* (2007). Foram utilizadas três caixas para cada tratamento e em cada caixa foram colocadas duas plantas. A exposição ao arsênio foi feita progressivamente e cada planta permaneceu por 48 h nas concentrações mais baixas de As até atingir a concentração determinada para cada tratamento (Quadro 1). Para padronizar o tempo de exposição das plantas ao arsênio os

tratamentos com as maiores doses de As foram iniciados primeiro. As plantas permaneceram expostas ao tratamento durante doze dias.

Tratamento	0 horas	48 horas	96 horas	144 horas
0 μM As + 0,5 μM P	0 + 1,0	0 + 1,0	0 + 1,0	0 + 0,5
0 μM As + 1,0 μM P	0 + 1,0	0 + 1,0	0 + 1,0	0 + 1,0
0 μM As + 1,5 μM P	0 + 1,0	0 + 1,0	0 + 1,0	0 + 1,5
33 μM As + 0,5 μM P	0 + 1,0	0 + 1,0	0 + 1,0	33+ 0,5
33 μM As + 1,0 μM P	0 + 1,0	0 + 1,0	0 + 1,0	33+ 1,0
33 μM As + 1,5 μM P	0 + 1,0	0 + 1,0	0 + 1,0	33+ 1,5
66 μM As + 0,5 μM P	0 + 1,0	0 + 1,0	33+ 0,5	66+ 0,5
66 μM As + 1,0 μM P	0 + 1,0	0 + 1,0	33+ 1,0	66+ 1,0
66 μM As + 1,5 μM P	0 + 1,0	0 + 1,0	33+ 1,5	66+ 1,5
132 μM As + 0,5 μM P	0 + 1,0	33+ 0,5	66+ 0,5	132 + 0,5
132 μM As + 1,0 μM P	0 + 1,0	33+ 1,0	66+ 1,0	132 + 1,0
132 μM As + 1,5 μM P	0 + 1,0	33+ 1,5	66+ 1,5	132 + 1,5

Quadro 1. Esquema de aclimação das plantas a diferentes doses de arsênio e fósforo.

2.2. Acúmulo de biomassa e concentração de arsênio (As) e fósforo (P)

O peso seco das plantas, da raiz e da parte aérea, foi obtido após a secagem das plantas em estufa de ventilação forçada, a 70 °C, e foi utilizado para a determinação do acúmulo de biomassa seca. As amostras secas foram reduzidas, em moinho do tipo Wiley, a partículas com dimensões inferiores a 1mm.

Amostras de matéria seca de raízes (0,2 g) e da parte aérea (0,5 g) foram adicionadas a tubos contendo 10 ml de solução nitroperclórica (3:1), e submetidas à pré-digestão à temperatura ambiente por 24 h (Tedesco *et al.*, 1995). A digestão completa das amostras foi obtida aumentando-se a temperatura do bloco digestor até 150 °C. Amostras contendo apenas solução nitroperclórica foram utilizadas como branco e para o preparo da curva padrão ($r^2 = 0,99$). Os teores de arsênio e fósforo foram determinados em espectrofotômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (modelo 3300 DV, Perkin Elmer Optima, EUA).

2.3. Fatores de translocação de As e P e bioacumulação de As

A partir do teor de As acumulado por unidade de matéria seca, foi calculado o fator de translocação (FT), definido como a razão entre a concentração de arsênio na parte aérea da planta e a concentração de arsênio presente nas raízes (Fayiga & Ma, 2005; Huang *et al.*, 2006) e o fator de bioacumulação (FBA), definido pela razão entre a concentração de

arsênio na planta e a concentração de arsênio no meio de crescimento (Huang *et al.*, 2006; Tu *et al.*, 2002). De modo similar, foi calculado também o fator de translocação de fósforo.

2.4. Análise visual e microscópica

Observações diárias das plantas foram feitas durante o período do experimento com o intuito de caracterizar possíveis alterações visuais na parte aérea e na raiz em resposta ao arsênio. Ao final do experimento, as raízes laterais finas foram observadas e fotografadas em Microscópio estereoscópio (modelo Olympus SZX7) com sistema de captura de imagens acoplado (modelo Olympus E-330).

Foram coletadas amostras das raízes adventícias principais, das raízes laterais finas e amostras da região mediana da lâmina foliar de folhas totalmente expandidas. As amostras foram fixadas em Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). Cortes transversais (8 µm) e longitudinais (4 µm) foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (Modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e corados em azul de Toluidina/pH=4,0 (O'Brian & McCully, 1981). As lâminas foram montadas em Permount.

Para a detecção histoquímica de compostos fenólicos, amostras de raízes e da lâmina foliar foram fixadas em solução de formalina (4%) com sulfato ferroso (10%) durante 24 horas, sob vácuo. O controle do teste foi realizado com amostras previamente armazenadas em metanol sob vácuo, durante 72 horas. Após lavagem em água destilada, as amostras foram submetidas à desidratação em série etílica/butílica (Johansen, 1940), incluídas em parafina histológica (Histosec, Merck) e seccionadas com 10 µm de espessura em micrótomo rotativo. Lâminas permanentes foram montadas em Permount.

As observações e a documentação fotográfica foram feitas em fotomicroscópio (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo, com câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments inc. New York, USA).

2.5. Determinação do nível de fenóis totais (FST) e de aldeído malônico (MDA)

A determinação do conteúdo de fenóis solúveis totais (FST) e de aldeído malônico (MDA) foi realizada para amostras vegetais do tratamento com 0,5 mM de P submetidas a 0 e 132 µM As. A quantificação de FST foi realizada segundo o método de Bielecki & Turner (1966) com adaptações. Foram adicionados 2ml de metanol 80% a cerca de 0,5 g

de matéria fresca de folhas e raízes. O material foi triturado em almofariz à 4°C e centrifugado a 10.000 g por 15 min. As reações foram preparadas a partir da adição de 10µl do sobrenadante (extrato metanólico), 65 µl de H₂O destilada, 37 µl do reagente Folin-Ciocalteu (1:1) e 188 µl de carbonato de sódio a 20%. Após 30 minutos, foi feita a leitura da absorbância em 725 nm em leitor de placa de Elisa (Asys-UVM 340, Eugendorf, Áustria). No controle negativo, foi utilizada água destilada no mesmo volume do extrato vegetal. A curva padrão ($r^2 = 0,99$) foi preparada utilizando quantidades conhecidas de ácido tânico (AT) na faixa de 0 a 50 mg/ml. O resultado foi expresso em mg de AT Kg⁻¹ de massa fresca.

A quantificação de MDA, composto que indica o grau de peroxidação lipídica associada ao estresse oxidativo, foi feita de acordo com o descrito por Gomes-Júnior *et al* (2006). Amostras de raízes (0,5 g) foram maceradas em nitrogênio líquido na presença de 10% (p/p) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Em seguida, foi adicionado 2,0 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) às amostras e estas foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, 250 µL do sobrenadante foi adicionado a 1,0 mL da solução de TCA 20% (p/v) contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico. No controle negativo, foi adicionado apenas o TCA 20% sem ácido tiobarbitúrico. As amostras foram misturadas vigorosamente e incubadas a 95 °C por 30 minutos. Os tubos foram colocados no gelo para paralisação da reação. As amostras foram centrifugadas a 10000 g durante 4 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida a 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath & Packer, 1968).

2.6. Parâmetros de fluorescência da clorofila

Os parâmetros de fluorescência da clorofila foram mensurados com auxílio de um fluorômetro modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido), para as plantas submetidas aos diferentes níveis de fósforo e a 0 e 132 µM de As. Amostras foliares, após adaptação ao escuro por 30 minutos, receberam um fluxo de radiação de 0,12 µmol m⁻²s⁻¹ para obtenção da fluorescência inicial (F₀). A fluorescência máxima (F_m) foi determinada durante um pulso de fótons saturante de 4.000 µmol m⁻²s⁻¹. Em seguida, as mesmas folhas foram aclimatadas no claro, durante 30 minutos, e receberam um feixe saturante de luz actínica, permitindo a obtenção da F_s (fluorescência quando os processos de transporte de

elétrons e as reações bioquímicas de redução de carbono acopladas estão equilibradas), F_m' (fluorescência máxima em estado adaptado à luz) e F_o' (fluorescência mínima em estado adaptado à luz). A partir desses parâmetros, foi calculado a eficiência quântica do FSII (F_v/F_m), o coeficientes de extinção fotoquímico (qP) e não fotoquímico (NPQ), o rendimento quântico do FSII ($Y(II)$) e a taxa de transporte de elétrons (ETR).

2.7. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos

O conteúdo de pigmentos fotossintetizantes foi mensurado para as plantas cultivadas em solução nutritiva contendo 0,5 mM P e expostas a 0 e 132 μ M de As. Para a análise de pigmentos fotossintéticos, amostras de folhas inteiras (~0,1 g) foram incubadas em 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) em banho-maria (65 °C) durante 15 h. Os extratos foram diluídos em DMSO (1:1), transferidos para cubetas e os valores de absorvância (A_{663} , A_{645} , para clorofilas *a* e *b*, A_{470} para carotenóides) foram lidos em espectrofotômetro (Genesys 2 PC, Thermo Spectronic). A estimativa das concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenóides foi feita segundo as equações de Wellburn (1994).

2.8. Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado utilizando-se um esquema fatorial 4 x 3 x 2 (arsênio x fósforo x população). Para todas as análises realizadas foram utilizadas 5 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) empregando-se o programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância) da Universidade Federal de Lavras (Ferreira, 2000). Os testes de médias (teste T e teste de Tukey) foram aplicados em nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Análise visual e microscópica

As duas populações estudadas apresentaram diferenças visíveis na arquitetura da parte aérea, em todos os tratamentos, como o porte mais ereto e menor número de ramificações laterais no caule nas plantas do Morro do Galo (Fig. 1A-B). Ao término do experimento, a parte aérea das plantas da Mata do Paraíso (MP) e do Morro do Galo (MG) não apresentava sintomas visuais como cloroses ou necroses em resposta ao arsênio (Fig. 1A-B) e não foram encontradas diferenças entre plantas cultivadas nos distintos níveis de

fósforo. Entretanto, alguns indivíduos da MP exibiram sinal de murcha na dose de 132 μ M As (Fig. 1C).

Em relação à morfologia interna, não foram observados danos na anatomia foliar das plantas das duas populações frente à exposição ao As (Fig. 2A-C). As folhas são dorsiventrais, anfi-hipoestomáticas e apresentam uma grande quantidade de idioblastos contendo compostos fenólicos e cristais de oxalato de cálcio, do tipo ráfide. Os idioblastos fenólicos ocorreram principalmente no parênquima clorofiliano, frequentemente associados aos feixes vasculares (Fig. 2C, E-F), sendo evidenciados pela coloração negra em resposta à formalina e sulfato ferroso (Fig. 2D). As amostras do controle do teste histoquímico para detecção de fenóis não apresentaram coloração escura.

O sistema radicular, por sua vez, foi severamente afetado, exibindo coloração amarronzada, aspecto gelatinoso e menor volume radicular após o tratamento com arsênio (Fig. 3). O efeito do escurecimento da raiz foi intensificado de acordo com a concentração de As e com o tempo de exposição das plantas, e foi mais drástico para as plantas da Mata do Paraíso. A observação morfológica das raízes laterais, expostas ao As, evidenciou o aspecto necrosado dos ápices radiculares (Fig. 4C-D) e a inibição do desenvolvimento das raízes laterais secundárias (Fig. 4D). No tratamento controle, as raízes laterais apresentaram padrão de ramificação normal e coloração clara (Fig. 4A-B), enquanto que no tratamento com arsênio as raízes apresentaram manchas escuras e superfície irregular (Fig. 4C-D).

Em análise anatômica, foi observado o colapso total de células do ápice radicular (Fig. 5B) e o desenvolvimento anormal de primórdios radiculares, os quais também apresentaram células colapsadas com conteúdo intensamente corado pelo azul de toluidina (Fig. 5D e F). O arsênio promoveu ainda a proliferação e desintegração celular próximo à região de emissão da raiz lateral (Fig. 5D). Adicionalmente, o arsênio não afetou o desenvolvimento das raízes principais nas plantas do MG (Fig. 6D), mas causou a obliteração e a alteração do formato de elementos de vaso do xilema secundário nas plantas da MP (Fig. 6C e G). Idioblastos contendo compostos fenólicos e ráfides foram abundantes no parênquima cortical da raiz (Fig. 6E-F), sendo os fenóis evidenciados através de teste histoquímico específico (Fig. 6H). Aparentemente, as plantas do MG apresentaram um maior número constitutivo de idioblastos contendo fenóis ou ráfides, entretanto, o As parece ter induzido o aumento do número de idioblastos nas raízes das plantas provenientes da MP (Fig. 6 A-D).

3.2. Concentração de fenóis solúveis totais (FST) e de aldeído malônico (MDA)

As plantas do Morro do Galo apresentaram um nível constitutivo de FST na raiz três vezes maior que as plantas da Mata do Paraíso (Fig. 7A). Em presença de 132 μM As, a concentração de FST na raiz foi semelhante para as duas populações, uma vez que o As aumentou em cerca de três vezes o nível de FST na raiz das plantas da Mata do Paraíso. Não houve diferença significativa entre as populações em relação ao nível de FST nas folhas no tratamento controle. Na dose de 132 μM As, as plantas do Morro do Galo apresentaram uma maior quantidade de FST nas folhas, embora essa diferença tenha sido pequena ($< 1\%$).

O arsênio promoveu o incremento do conteúdo de MDA nas raízes de *Borreria verticillata* das duas populações estudadas (Fig. 7B). As plantas do Morro do Galo apresentaram um conteúdo de MDA 50% menor do que as plantas da Mata do Paraíso na ausência de As. A concentração de aldeído malônico na raiz, no tratamento com 132 μM As, foi semelhante para as plantas das duas populações.

3.3. Acúmulo de biomassa

Enquanto o aumento dos níveis de arsênio não afetou o acúmulo de biomassa das plantas do Morro do Galo, o peso seco de raízes e da parte aérea, das plantas da Mata do Paraíso, mostrou-se significativamente influenciado pela interação entre arsênio e fósforo (Fig. 8). O menor nível de arsênio testado (132 μM) associado à menor dose de fósforo (0,5 mM) promoveu a redução da biomassa da parte aérea, do sistema radicular, e biomassa total somente em plantas da MP. Na comparação entre as populações, o peso seco total das plantas do Morro do Galo expostas a 132 μM As foi 33% e 26% maior quando cultivadas em solução nutritiva contendo 0,5 mM e 1,5 mM P.

3.4. Concentração de arsênio (As) e fósforo (P)

A concentração de As nas raízes e na parte aérea das plantas de *Borreria verticillata*, aumentou significativamente com o incremento do nível de arsênio na solução nutritiva (Fig. 9A-D), mesmo com o aumento dos níveis de P na solução. O acúmulo de As na parte aérea das plantas da MP e do MG, no tratamento com 132 μM As, foi cerca de 5 vezes maior do que o encontrado na ausência de arsênio. Nas raízes essa relação foi de 30 a 47 vezes maior para ambas as populações. As plantas do Morro do Galo apresentaram um menor acúmulo de As na raiz e na parte aérea, em relação às plantas da Mata do Paraíso,

quando cultivadas em solução nutritiva contendo 0,5 mM de P (Tab. 1). Na maior dose de P (1,5mM), houve uma redução do acúmulo de As nas raízes das plantas da Mata do Paraíso (Fig. 9C). Em contraste, o aumento do nível de fósforo na solução não alterou a absorção de As nas plantas do Morro do Galo (Fig. 9D).

A aplicação de arsênio na solução nutritiva, independente da dose, reduziu drasticamente a concentração de fósforo nas raízes (Fig. 9G-H). As plantas do Morro do Galo apresentaram uma maior absorção de fósforo na ausência de As, entretanto, o acréscimo de arsênio na solução nutritiva promoveu uma redução mais expressiva da concentração de P na raiz dessas plantas, em comparação com as plantas da Mata do Paraíso (Tab. 2). O As não interferiu no acúmulo de fósforo na parte aérea das plantas da Mata do Paraíso, mas reduziu a concentração de P na parte aérea das plantas do Morro do Galo no tratamento com 132 μ M As (Fig. 9E-F). Apesar dessa redução, as plantas do Morro do Galo apresentaram um maior acúmulo de fósforo na parte aérea nas doses de 1,0 e 1,5 mM P (Tab. 2). O incremento da concentração de P na solução nutritiva não alterou o acúmulo de fósforo na parte aérea das plantas da Mata do Paraíso, mas, aumentou a concentração de P na parte aérea das plantas do Morro do Galo.

3.5. Fatores de translocação de As e P e bioacumulação de As

O fator de translocação (FT) de As foi menor que 0,1 em todos os tratamentos e, de modo geral, não apresentou diferença significativa entre as duas populações (Tab. 3). O fator de bioacumulação (FBA) de As variou de 53 a 166 (Tab. 3) e foi maior para as menores doses de arsênio em solução (teste Tukey, $p < 0,05$). Nas doses de 33 e 66 μ M As, no tratamento com 0,5 mM de P, as plantas provenientes do Morro do Galo apresentaram um menor FBA, quando comparadas com as plantas da Mata do Paraíso. O FT de P foi significativamente maior para as plantas do Morro do Galo em praticamente todos os tratamentos (Tab. 3).

3.6. Parâmetros de fluorescência da clorofila e teor de pigmentos fotossintetizantes

A relação F_v/F_m manteve-se próxima a 0,8, evidenciando que a exposição ao arsênio não alterou a eficiência quântica máxima do FSII (Tab. 3). Entretanto, o arsênio reduziu o rendimento quântico do FSII ($Y(II)$), o coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) nas plantas da Mata do Paraíso cultivadas em

solução nutritiva contendo 0,5mM P. Para as plantas do Morro do Galo, submetidas à 0,5mM P, houve redução apenas do qP, sendo o percentual de redução menor do que o encontrado para as plantas da Mata do Paraíso. Nos tratamentos com 1,0 e 1,5 mM P o arsênio não afetou os parâmetros de fluorescência da clorofila.

A exposição ao arsênio, de modo geral, não alterou a concentração de clorofilas *a* e *b*, de clorofilas totais e de carotenóides em *Borreria verticillata* (Tab. 4). As plantas do Morro do Galo apresentaram uma maior concentração de clorofilas totais em todos os tratamentos (teste T, $p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Em plantas que não apresentam hiperacumulação de arsênio, este metaloide é acumulado principalmente nas raízes (Marin *et al.*, 1992), afetando de modo diferenciado a anatomia e a fisiologia dos órgãos vegetativos. *Borreria verticillata* não se caracteriza como uma espécie hiperacumuladora de As em virtude do baixo fator de translocação de As ($<0,1$) e da concentração total deste elemento encontrada nas plantas de ambas as populações ($<1000 \text{ mg Kg}^{-1}$). O elevado acúmulo de As nas raízes promoveu alterações na morfologia e no desenvolvimento do sistema radicular de *B. verticillata*. O desenvolvimento das raízes laterais, formadas durante o período de exposição ao poluente, foi mais afetado pelo As do que o das raízes de maior calibre, formadas antes do início do experimento e que já apresentavam-se em crescimento secundário. Em *Cajanus cajan* o crescimento das raízes laterais foi mais afetado pelo As do que o da raiz principal, uma vez que o desenvolvimento das raízes laterais ocorreu integralmente na presença do poluente (Barbosa, 2009).

Os estágios iniciais de desenvolvimento são mais sensíveis aos poluentes uma vez que os mecanismos de defesa ainda não estão completamente desenvolvidos (Liu *et al.*, 2005). Em *Borreria verticillata*, os efeitos do As foram mais drásticos nos ápices radiculares e em primórdios radiculares em formação. A deformação dos ápices radiculares e o desenvolvimento atípico das raízes laterais em *B. verticillata* sugerem que o arsênio possa ter comprometido os processos de divisão e alongamento celular. Barbosa (2009) constatou a redução do índice mitótico em ápices radiculares de plântulas de *Cajanus cajan* expostas ao arsênio, os quais apresentaram alteração do formato e má-formação da coifa.

As alterações macroscópicas observadas no sistema radicular e o colapso de células das raízes laterais são indícios da ocorrência de danos oxidativos na raiz, o que pode estar associado com o aumento da peroxidação lipídica encontrada para esse órgão. A peroxidação de lipídeos pode levar à destruição da maquinaria celular e promover a desintegração de células e tecidos (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001b; Mascher *et al.*, 2002; Nascimento, 2007). O menor conteúdo de MDA nas plantas do Morro do Galo do tratamento controle, em comparação com as plantas da Mata do Paraíso, somado ao menor efeito de altos níveis de arsênio na morfologia dessas plantas, pode estar associado ao maior nível constitutivo de compostos fenólicos, os quais atuam como moléculas antioxidantes. Os compostos fenólicos podem inibir a peroxidação lipídica de diversas formas (Michalak, 2006), inclusive servindo de substrato para a detoxificação de H₂O₂ por peroxidases (Takahama & Oniki, 2000). No tratamento com 132µM As, o conteúdo de MDA e o nível de FST foi equivalente para as duas populações, indicando que o acúmulo de compostos fenólicos nas raízes de *B. verticillata* pode ter contribuído para redução do estresse oxidativo. Contudo, a atuação dos compostos fenólicos não foi suficiente para inibir totalmente o aumento da peroxidação lipídica, indicando os limites da tolerância de ambas as populações a este metaloide.

As alterações morfoanatômicas nas raízes sugerem que as plantas da Mata do Paraíso são mais sensíveis ao arsênio, visto que apresentam alterações nos elementos de vaso do xilema secundário, conforme já relatado na literatura (Päivöke, 1983; Singh *et al.*, 2007). Barbosa (2009) também constatou, em raízes de *Cajanus cajan*, a interferência do As na diferenciação dos elementos de vaso, os quais apresentaram formato contorcido e uma menor área em secção transversal. As alterações estruturais mais acentuadas nas raízes das plantas da Mata do Paraíso ocasionaram, possivelmente, o déficit hídrico indireto, culminando no sintoma de murcha, conforme relatado por Carbonell-Barrachina *et al.* (1997) em plantas de feijão. Silva (2008) também constatou a ocorrência de murcha em plântulas de *Borreria verticillata* expostas ao As e correlacionou esse sintoma com a redução da condutância estomática e da taxa fotossintética nessas plantas. A ausência de sintomas microscópicos nas folhas de *Borreria verticillata* indica que a concentração de arsênio na parte aérea das plantas, bem inferior àquela observada em raízes, não promoveu efeitos citotóxicos evidentes. A baixa translocação de arsênio limita a chegada desse metaloide aos tecidos fotossinteticamente ativos (Melo *et al.*, 2010), constituindo um mecanismo de resistência ao As.

Acredita-se que em *Borreria verticillata* esse mecanismo esteja relacionado com a presença de compostos fenólicos, os quais podem desempenhar um papel semelhante ao das fitoquelatinas, na complexação de As nas raízes e restrição da sua translocação para a parte aérea (Hartley-Whitaker *et al.*, 2002; Schmöger *et al.*, 2000). Segundo Sánchez-Viveros (2010), o aumento do conteúdo total de fenóis em plantas de *Azolla* em resposta ao arsênio representa um mecanismo de tolerância a esse poluente. O aumento do nível de FST nas raízes das plantas da MP expostas ao As foi coerente com o aumento aparente da quantidade de idioblastos fenólicos presente nessas plantas. O maior nível constitutivo de FST nas plantas do MG, em comparação com as plantas da MP, pode estar relacionado ao maior número de idioblastos fenólicos encontrados nessas plantas na ausência de As. Entretanto, essas observações são qualitativas sendo necessária a quantificação do número de idioblastos presentes nas raízes.

Cristais de oxalato de cálcio também podem participar na quelação de metais pesados (Choi *et al.*, 2001; Mazen *et al.*, 2004). A formação de cristais de oxalato de Al é um mecanismo de detoxificação interna presente em plantas de *Fagopyrum esculentum* que se desenvolvem em solos com elevada concentração desse metal (Ma *et al.*, 1998). Entretanto, não existem relatos desse mecanismo envolvendo o As. O maior nível constitutivo de FST e, possivelmente, de idioblastos cristalíferos na raiz de plantas do MG, podem ser características adaptativas dessas plantas a altos níveis de As no solo. Plantas tolerantes a estresses usualmente contem elevados níveis constitutivos de metabólitos protetores, enquanto espécies mais sensíveis apresentam resposta indutiva para esses compostos sob condições de estresse (Constabel & Ryan, 1998).

Silva (2008) utilizando plântulas de *Borreria verticillata*, obtidas a partir de sementes provenientes do Morro Galo, encontrou um fator de translocação de arsênio 20 vezes maior do que o encontrado nesse trabalho, e constatou alterações no formato das células epidérmicas, colapso das células estomáticas e retração do protoplasma de células do parênquima clorofiliano. Essa diferença pode ser atribuída basicamente a idade das plantas, uma vez que raízes mais jovens apresentam uma menor quantidade de idioblastos fenólicos e, possivelmente, uma menor capacidade de complexação de As, permitindo uma maior translocação desse elemento para a parte aérea. A exemplo do que ocorre para outros poluentes, a tolerância ao arsênio depende da composição genética e da idade das plantas, dentre outros fatores (Treshow & Anderson, 1991).

A competição entre arsenato e fosfato por transportadores de membrana nas células da raiz de *Borreria verticillata* foi evidenciada pela redução da absorção de fósforo nos tratamentos com arsênio. O menor acúmulo de As na raiz das plantas do Morro do Galo, cultivadas em solução nutritiva com 0,5mM de P, pode indicar que o arsênio promove uma regulação negativa dos canais de absorção de P em condições de baixa disponibilidade fósforo. Clones tolerantes de *Holcus lanatus* exibem uma menor absorção e acúmulo de arsênio devido a supressão dos canais de alta afinidade de Pi (Meharg & Macnair, 1992). Essa hipótese é reforçada pela redução mais expressiva da concentração de P na raiz de plantas do Morro do Galo na presença de arsênio.

A maior concentração de fósforo na parte aérea das plantas do Morro do Galo, em doses nas mais elevadas de P, e o maior fator de translocação deste elemento sugerem que essas plantas apresentem uma maior expressão de canais envolvidos no transporte de fósforo da raiz para a parte aérea e/ou transportadores com menor afinidade pelo arsênio. Apesar de possuírem um maior fator de translocação de P, fato não alterado mesmo com o aumento das doses de As, as plantas do MG não diferem das plantas MP quanto ao fator de translocação de As e, sob baixas doses de fósforo, possuem um menor fator de bioacumulação de As. A maior eficiência de transporte de P das raízes para a parte aérea pode estar relacionada com a quantidade e o tipo de transportadores de fosfato presentes nos tecidos que dão acesso ao transporte de longa distância (Silva *et al.*, 2008).

Os dados de fluorescência da clorofila, indicam que houve um efeito mais pronunciado do As na redução das reações fotoquímicas nas plantas da MP. Paralelamente, observou-se que, sob baixos níveis de P e na presença de As, essas plantas apresentaram menor acúmulo de biomassa, efeitos mais drásticos na morfologia e anatomia das raízes, e murcha foliar de forma específica. A associação destes fatos indica uma menor tolerância das plantas da MP ao arsênio, embora essas plantas também apresentem mecanismos de tolerância ao As, como o aumento de FST. Adicionalmente, o maior peso seco total das plantas do MG sob altos níveis de As, a menor concentração de As em raízes e os maiores níveis de P na parte aérea, confirmam a idéia de que as plantas do MG sejam mais tolerante ao As que as plantas da MP. Em *Thalaspia caerulescens*, maiores tolerâncias ao Zn e Cd foram associadas com a menor taxa de acumulação deste metal (Meerts & Van Isacker, 1997; Escarré *et al.*, 2000).

A redução da absorção de fósforo em *B. verticillata* parece não ter interferido diretamente na eficiência fotossintética, uma vez que a translocação de fósforo para a parte

aérea foi pouco alterada. A translocação de fósforo permite a manutenção da competição interna por canais de fosfato, minimizando os efeitos do As nas reações dependentes de ATP. Entretanto, os efeitos tóxicos do arsênio nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e no acúmulo de biomassa seca, nas plantas da Mata do Paraíso, foram significativos apenas na menor dose de P, quando a absorção de As foi geralmente maior. Em sistemas hidropônicos, a baixa disponibilidade de fósforo proporciona uma maior absorção de arsenato, em função da competição entre esses dois ânions por canais de transporte (Meharg & Harttley-Whitaker, 2002; Tu & Ma, 2003; Wang *et al.*, 2002).

Os resultados desse trabalho confirmam a tolerância de *Borreria verticillata* ao arsênio, e demonstram que as plantas do MG são mais tolerantes que as plantas da MP. Estudos a cerca da especiação de arsênio, da expressão gênica de canais de transporte de P e da atividade de enzimas antioxidantes são fundamentais para compreensão dos mecanismos de tolerância ao As que ocorrem em *B. verticillata*. Sugere-se ainda que seja realizada a análise micromorfométrica do diâmetro de elementos de vaso e do número de idioblastos fenólicos e cristalíferos para averiguar as respostas anatômicas ao As.

5. CONCLUSÕES

1. O maior acúmulo de arsênio na raiz foi responsável pela ocorrência de danos nesse órgão, enquanto a baixa concentração de arsênio na parte aérea foi coerente com a ausência de sintomas visuais e microscópicos nas folhas.
2. A presença de arsênio na solução nutritiva interfere na absorção de fósforo em *Borreria verticillata* e pode ou não alterar a concentração de fósforo na parte aérea.
3. Na menor dose de fósforo, em solução nutritiva, as plantas de *Borreria verticillata*, provenientes da Mata do Paraíso, apresentaram uma maior absorção de As, o que promoveu maiores danos na atividade fotoquímica e redução no acúmulo de biomassa.
4. Plantas de *Borreria verticillata* provenientes do Morro do Galo apresentam um mecanismo diferencial de absorção e translocação de fósforo, possuindo menores níveis de As na raiz e maior fator de translocação de P. Esse mecanismo, associado ao maior nível constitutivo de fenóis, confere a essas plantas uma maior tolerância ao arsênio.
5. A elevada capacidade de absorção e complexação de arsênio na raiz e o crescimento rápido sugerem a utilização de *Borreria verticillata* como espécie pioneira na revegetação de áreas contaminadas com arsênio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alloway, B.J., 1993. **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley, 339p.
- Barbosa, A.P., 2009. **Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae)**. Dissertação de Mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 50p.
- Barra, C.M., Santelli, R.E., Abrão, J.J., Guardia, M., 2000. Especificação de arsênio, uma revisão. **Quim. Nova** 23, 58-70.
- Berg, M., ConTran, Y.H., Chuyen, N.T., Viet, P.H., Roland, S., Walter, Y.G., 2001. Arsenic contamination of ground and drinking water in Vietnam: a human health threat. **Environ. Sci. Technol.** 35, 2621-2626.
- Bernal, J., Peterson, A.L., 1975. Arsenic in soils and its accumulation by food crops. **J. Environ. Qual.** 4, 145-158.
- Bieleski, R.I., Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of aminoacids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Anal. Biochem.** 17, 278-293.
- Borba, R.P., 2002. **Arsênio em ambiente superficial: processos geoquímicos naturais e antropogênicos em uma área de mineração aurífera**. Tese de Doutorado. Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 113 p.
- Carbonell-Barrachina, A.A., Burlo, F., Burgos-Hernandez, A., Lopez, E., Mataix, J., 1997. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Sci. Hort.** 71, 167-176.
- Carbonell-Barrachina, 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. **Sci. Total Environ.** 217, 189-199.
- Chen, Y.C., Guo, Y.L., Su, H.J., Hsueh, Y.M., Smith, T.J., Ryan, L.M., Lee, M.S., Chao, S.C., Lee, J.Y., Christiani, D.C., 2003. Arsenic methylation and skin cancer risk in southwestern Taiwan. **J. Occup. Environ. Med.** 45, 241-248.
- Choi, Y., Harada, E., Wada, M., Tsuboi, H., Morita, Y., Kusano, T., Sano, H., 2001. Detoxification of cadmium in tobacco plants, formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. **Planta** 213, 45-50.
- Constabel, C.P., Ryan, C.A., 1998. A survey of wound- and methyljasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. **Phytochemistry** 47, 507-511.
- Corrêa, T.L., 2006. **Bioacumulação de metais pesados em plantas nativas a partir de suas disponibilidades em rochas e sedimentos: o efeito na cadeia trófica**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Minas. 140p.
- Cunningham, S.D., Ow, D.W., 1996. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiol.** 100, 715-719.
- Deschamps, E., Matschullat, J. (org.), 2007. **Arsênio antropogênico e natural, um estudo em regiões do Quadrilátero Ferrífero**. Belo Horizonte, FEAM (Fundação Estadual do Meio Ambiente). 330p.

- Dimitri, S.B., 1959. Rubiaceae da cidade do Rio de Janeiro: tribo Spermaceae. **Rodriguésia** 22: 241-283.
- Edmonds, J.S., Francesconi K.A., 1981. Arseno-sugars from brown kelp (*Ecklonia radiata*) as intermediates in cycling of arsenic in a marine ecosystem. **Nature** 289, 602-604.
- Escarré, J., Lefèbvre, C., Gruber, W., Leblanc, M., Lepart, J., Rivière, Y., Delay, B., 2000. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. **New Phytol.** 145, 429-437.
- Fayiga, A.O., Ma, L.Q., 2005. Arsenic uptake by two hyperaccumulator ferns from four arsenic contaminated soils. **Water Air Soil Pollut.** 168, 71-89.
- Ferreccio, C., Gonzalez, C., Milosavljevic, V., Marshall, G., Sancha, A.M., Smith, A.H., 2000. Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. **Epidemiology** 11, 673-679.
- Ferreira, D.F., 2000. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0.** In 45^a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, p.255-258.
- Ferreira, A.G., Rosa, S.G.T., 2009. Germinação de sementes de sete espécies medicinais nativas do sul do Brasil. **Rev. Bras. Plant. Med.** 11: 230-235.
- Francisco, F.R., Joni, M.B., Debby, F., 2002. Evaluation of a GPF reporter gene construct for environmental arsenic detection. **Talanta** 58: 181-188.
- Fujiwara, S., Kobayashi, I., Hoshino, S., Kaise, T., Shimogawara, K., Usuda, H., Tsuzuki, M., 2000. Isolation and characterization of arsenate-sensitive and resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Cell Physiol.** 41, 77-83.
- Gomes-Júnior, R.A., Moldes, C.A., Delite, F.S., Pompeu, G.B., Gratão, P.L., Mazzafera, P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2006. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere** 65, 1330-1337.
- Gonzaga, M.I.S., Santos, J.A.G., Ma, L.Q., 2006. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. **Sci. Agric.** 63, 90-101.
- Greger, M., Lanberg, T., Berg, B., 2003. **Efficient phytoextraction of metals by *Salix* in field influence of biomass and removal of leaf litter.** Workshop “Phytoremediation of toxic metals”. Stockholm, Sweden, p. 2.
- Gregory, R.P.G., Bradshaw, A.D., 1965. Heavy metal tolerance in populations of *Agrostis tenuis* Sibth. and other grasses. R. P. G. **New Phytol.** 64, 131-143.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Bookum-Dez, W., Schat, H., Meharg, A.A., 2001a. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Plant Physiol.** 126, 299-306.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A.A., 2001b. Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. **Plant Cell Environ.** 24, 713-722.
- Hartley-Whitaker, J., Woods, C., Meharg, A.A., 2002. Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*? **New Phytol.** 155, 219-225.

- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.** 125,189-198.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. **The water-culture method for growing plants without soil.** Berkeley, California Agricultural Experiment Station. 32p.
- Horswell, J., Speir, T., 2006. Arsenic Phytotoxicity. *In* Naidu, R., Smith, E., Owens, G., Bhattacharya, P., Nadebaum, P. (Eds.) **Managing Arsenic in the Environment. From soil to human health.** Collingwood, CSIRO Publishing.
- Huang, R.Q., Gao, S.F., Wang, W.L., Staunton, S., Wang, G., 2006. Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, Southeast China. **Sci. Total Environ.** 368, 531-541.
- Huang, Z., An, Z., Chen, T., Lei, M., Xiao, X., Liao, X., 2007. Arsenic uptake and transport of *Pteris vittata* L. as influenced by phosphate and inorganic arsenic species under sand culture. **J. Environ. Sci.** 19, 714-718.
- Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. **Toxicol. Lett.** 133, 1-16.
- Hughes, M.F., Thomas, D.J., Kenyon, E.M., 2009. Toxicology and Epidemiology of Arsenic and its Compounds. *In* Henke, K. (ed.) **Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment.** New Jersey, John Wiley & Sons. p 237-275.
- Inouhe, M., 2005. Phytochelatins. **Braz. J. Plant Physiol.** 17, 65-78.
- Jadia, C.D., Fulekar, M.H., 2008. Phytotoxicity and remediation of heavy metals by fibrous root grass (sorghum). **J. Appl. Biosci.** 10, 491- 499.
- Jadia, C.D., Fulekar, M.H., 2009. Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques (review). **Afr. J. Biotechnol.** 8, 921-928.
- Johansen, D.A., 1940. **Plant microtechnique.** New York, Mc Graw Hill. 532p.
- Kaise, T., Hanaoka, K., Tagawa, S., Hirayama, T., Fukui, S., 1988. Distribution of inorganic arsenic and methylated arsenic in marine organisms. **Appl. Organomet. Chem.** 2, 539-546.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.** 27, 137-138.
- Ladeira, A.C.Q., Ciminelli, V.S.T., Nepomuceno, A.L., 2002. Seleção de solos para a imobilização de arsênio. **Rev. Esc. Minas** 55, 215-221.
- Lasat, M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. **J. Environ. Qual.** 31,109-120.
- Li, W.X., Chen, T.B., Huang, Z.C., Lei, M., Liao, X.Y., 2006. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Chemosphere** 62, 803-809.
- Liu, X., Zhang, S., Shan, X., Zhu, Y.G., 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination seedling growth and amylolytic activity of wheat. **Chemosphere** 61, 293-301.
- Ma, J.F., Hiradate, S., Matsumoto, H., 1998. High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. **Plant Physiol.** 117, 753-759.

- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., CAI, Y., Kennelley, E.D., 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature** 409, 579.
- Macnair, M.R., Cumbes, Q.J., Meharg A.A., 1992. The genetics of arsenate tolerance in Yorkshire fog, *Holcus lanatus* L. **Heredity**, 69, 325-335.
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T., 2002. Arsenic round the world: a review. **Talanta** 58, 201-235.
- Marin, A.R., Masscheleyn, P.H., Patrick, W.H. Jr, 1992. The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. **Plant Soil**.139, 175-183.
- 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. Tot. Environ.** 249: 297-312.
- Maynard, G., Pousset, J.L., Mboup, S., Denis, F., 1980. Antibacterial effect of borreverine, an alkaloid isolated from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). **C R Seances Soc. Biol. Fil.** 174, 925-928.
- Mazen, A., Zhang, D.Z., Franceschi, V.R., 2004. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*, Physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. **New Phytol.** 161, 435-448.
- Meerts, P., Van Isacker, N., 1997. Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. **Plant Ecol.** 133, 221-231.
- Meharg, A.A., MacNair, M.R., 1990. An altered phosphate uptake system in arsenate tolerant *Holcus lanatus*. **New Phytol.** 16, 29-35.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R., 1992. Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system, a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. **J. Exp. Bot.** 43, 519-524.
- Meharg, A.A., 1994. Integrated tolerance mechanisms-constitutive and adaptive plant-responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant Cell Environ.** 17, 989-993.
- Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytol.** 154, 29-43.
- Melo, R.F., Dias, L.E., Mello, J.W.V., Oliveira, J.A., 2010. Behavior of *Eucalyptus grandis* and *E. cloeziana* seedlings grown in arsenic-contaminated soil. **R. Bras. Ci. Solo** 34, 985-992.
- Mercedes, D.R., Rafael, F., Concepcin, A., 2002. Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcollar mine. **J. Biotechnol.** 98: 125-137.
- Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Pol. J. Environ. Stud.** 15, 523-530.
- Milton, A.H., Smith, W., Rahman, B., Hasan, Z., Kulsum, U., Dear, K., Rakibuddin, M., Ali, A., 2005. Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in Bangladesh. **Epidemiology** 16, 82-86.

- Modesto Júnior, M.S., Mascarenhas, R.E.B., 2001. Levantamento da infestação de plantas daninhas associada a uma pastagem cultivada de baixa produtividade no nordeste paraense **Planta Daninha** 19, 11-21.
- Nascimento, K.J.T., 2007. **Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio**. Dissertação de Mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 36p.
- O'Brian, P.P., McCully, M.E., 1981. **The study of plants structure principles and select methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltda. 45p.
- Päivöke, A., 1983. Anatomical responses of the roots of pea seedlings to lead and arsenate ions. **Ann. Bot. Fennici** 20, 307-315.
- Päivöke, A.E.A., Simola, L.K., 2001. Arsenate toxicity to *Pisum sativum*, mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. **Ecotoxicol. Environ. Safety** 49, 111-121.
- Pataca, L.C.M., Bortoleto, G.G., Bueno, M.I.M.S., 2005. Determination of arsenic in contaminated waters using energy dispersive X-ray fluorescence. **Quim. Nova** 28, 579-582.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A., 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environ. Exp. Bot.** 52, 199-223.
- Percival, J.B., Dumaresq, C.G., Kwong, Y.T.J., Hendry, K.B., Michel, F.A., 1996. **Arsenic in surface waters, Cobalt, Ontario**. Current Research, Geological Survey of Canada, p. 137-146.
- Pereira, B.F.F., 2005. **Potencial fitorremediador das culturas de feijão-de-porco, girassol e milho cultivadas em latossolo vermelho contaminado com chumbo**. Dissertação de Mestrado. Campinas, Instituto Agrônômico, 68p.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.** 56, 15-39.
- Pires, F.R., Souza, C.M., Silva, A.A., Procópio, S.O., Ferreira, L.R., 2003. Fitorremediação de solos contaminados por herbicidas. **Planta Daninha** 21, 335-341.
- Pulz, G.M., Martins, E.S., Fuck, E.R.A., 1992. Morfologia dos minerais de ouro e arsenopirita no depósito Maria Lázara (Guarinos, Goiás) e suas implicações nos mecanismos de deposição. **Rev. Bras. Geoc.** 22, 257-261.
- Rahman, M.M., Chowdhury, U.K., Mukherjee, S.C., Mondal, B.K., Paul, K., Lodh, D., Biswas, B.K., Chanda, C.R., Basu, G.K., Saha, K.C., Roy, S., Das, R., Palit, S.K., Quamruzzaman, Q., Chakraborti, D., 2001. Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India - a review and commentary. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.** 39, 683-700.
- Raquel, R., Tena, M., 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. **Phytochemistry** 66, 1519-1528.
- Rhodes, V.P., 2010. **Distribuição de mercúrio e arsênio nos sedimentos de área afetada por garimpo de ouro – Rio Gualaxo do Norte, Mariana-MG**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Minas. 93p.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I., 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Biotechnology** 13, 468-475.

- Sánchez-Viveros, G., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., 2010. Short-term effects of arsenate-induced toxicity on growth, chlorophyll and carotenoid contents, and total phenolic compounds of *Azolla filiculoides*. **Water Air Soil Pollut.** 12, 365-368.
- Sauer, H., Wartenberg, M., Hescheler, J., 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. **Biochem Cell Physiol.** 11, 173-86.
- Schmöger, M.E.V., Oven, M., Grill, E., 2000 Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiol** 122, 793-801.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. **Cr. Rev. Food Sci. Nutr.** 32, 67-103.
- Silva, I.R., Smytz, T.J., Raper, C.D., Carter, T.E., Rufty, T.W., 2001. Differential aluminium tolerance in soybean, an evaluation of the role of organic acids. **Plant Physiol.** 112, 200-210.
- Silva, K.L.F., 2008. **Avaliação de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio.** Tese de doutorado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 97p.
- Silva, A.A., Arns, I., Lima, C.V.S., Schneider, A.B., Delatorre, C.A., 2008. Diferenciação de genótipos de trigo quanto à tolerância à deficiência de fósforo, em solução hidropônica. **Rev. Bras.Ciênc. Solo** 32, 1949-1958.
- Simões, C.M.O., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Irgang, B.E., Stehmann, J.R., 1986. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre, Ed. UFRGS. 174p.
- Simon, T., Eberhard, A., Rohr, R., 2000. Effect of Ni and As on radish tuber cultivated on artificially polluted soils. **Eur. J. Soil Biol.** 36, 73-80.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K., Arora, K., 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regul** 53, 65-73.
- Smith, A.H., Lopipero, P.A., Bates, M.N., Steinmaus, C.M., 2002. Arsenic epidemiology and drinking water standards. **Science** 296, 2145-2146.
- 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. Physiological response of maize to arsenic contamination. **Biol. Plantarum** 47, 449-452.
- Takahama, U., Oniki, T., 2000. Flavonoid and some other phenolics as substrates of peroxidase, physiological significance of the redox reactions. **J. Plant Res.** 113, 301-309.
- Tedesco, M.J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H., Volkweiss, S.J., 1995. **Análise de solo, plantas e outros materiais.** Porto Alegre, UFRGS. 174p.
- Treshow, M., Anderson, F.K., 1991. **Plant stress and air pollution.** Chichester, John Wiley & Sons. 283p.
- Tu, C., Ma, L.Q., Bondada, B., 2002. Plant and environmental interactions, Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. **J. Environ. Qual.** 31, 1671-1675.

- Tu, S., Ma, L.Q., 2003 Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. **Environ. Exp. Bot.** 50, 243-251.
- 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. **J. Exp. Bot.** 40, 119-128.
- Vangronsveld, J., Clijsters, H., 1994. **Toxic effects of metals.** In Farago, M.E. (ed.) Plants and the chemical elements. Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity. Weinheim, VCH Publishers, p. 150-177.
- Vangronsveld, J., Cunningham, S.D. (ed.), 1998. **Metal-contaminated soils. In situ inactivation and phytoremediation.** Berlin, Springer, p. 51-63.
- Vose, J.M., Wayne, T.S., Harvey, G.J., Clinton, B.D., Sobek, C., 2000. Leaf water relations and sapflow in Eastern cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.) trees planted for phytoremediation of a groundwater pollutant. **Intern. J. Phytoremed.** 2, 53-73.
- US-EPA: Environmental Protection Agency, 1998. Guidelines for neurotoxicity risk assessment. **Fed. Regist.** 63: 26926-26954.
- Wang, J., Zhao, F.J., Meharg, A.A., Raab, A., Feldmann, J., McGrath, S.P., 2002. Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. **Plant Physiol.** 130, 1552-1561.
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol.** 144, 307-313.

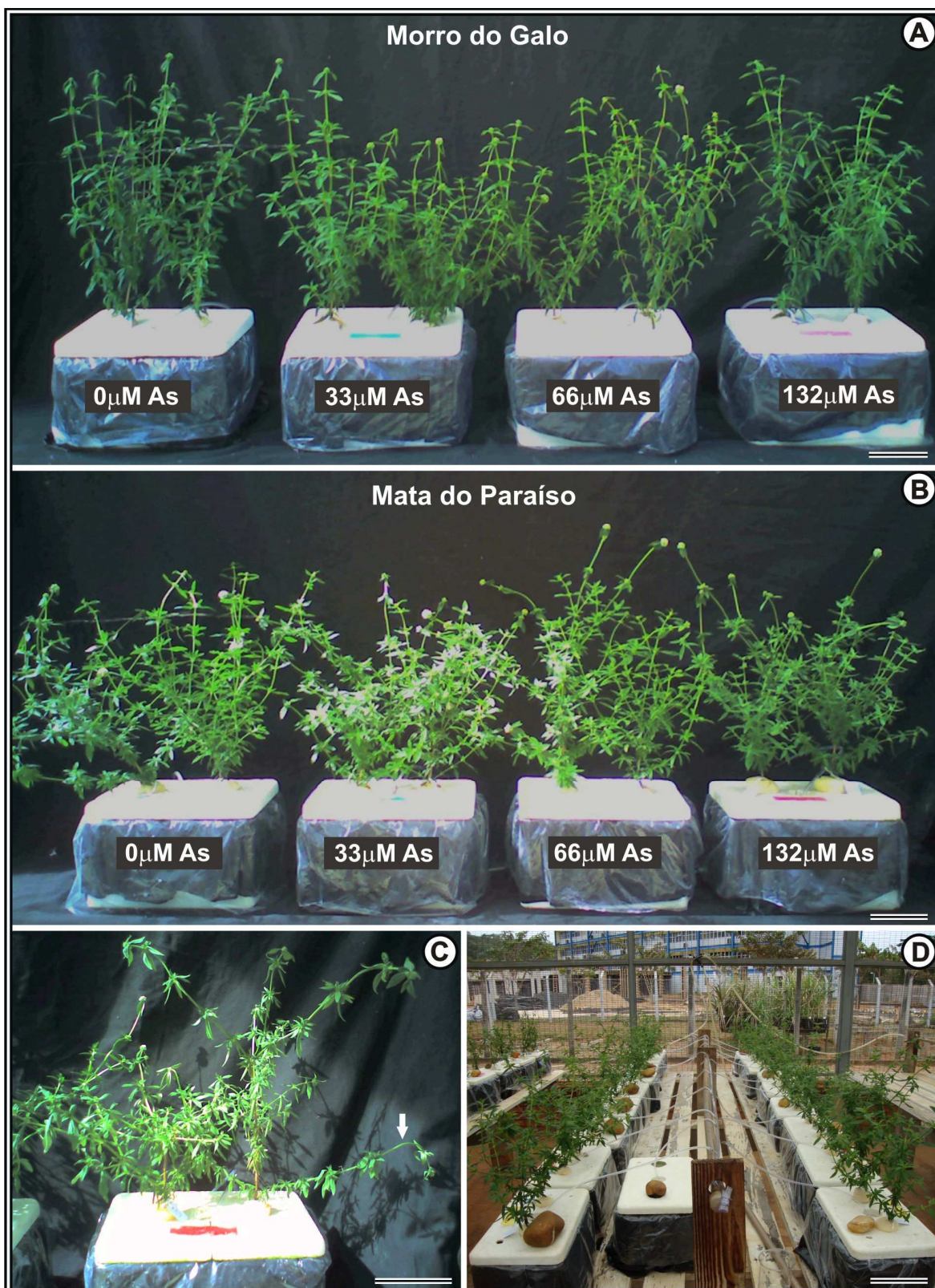


Figura 1. Aspecto geral de plantas de *Borreria verticillata* após 12 dias de exposição ao arsênio. A. Plantas do Morro do Galo (sítio contaminado com As). B-C. Plantas da Mata do Paraíso (sítio não contaminado com As). C. Planta com sintoma de murcha (seta). D. Sistema de hidroponia. Barra: 10cm.

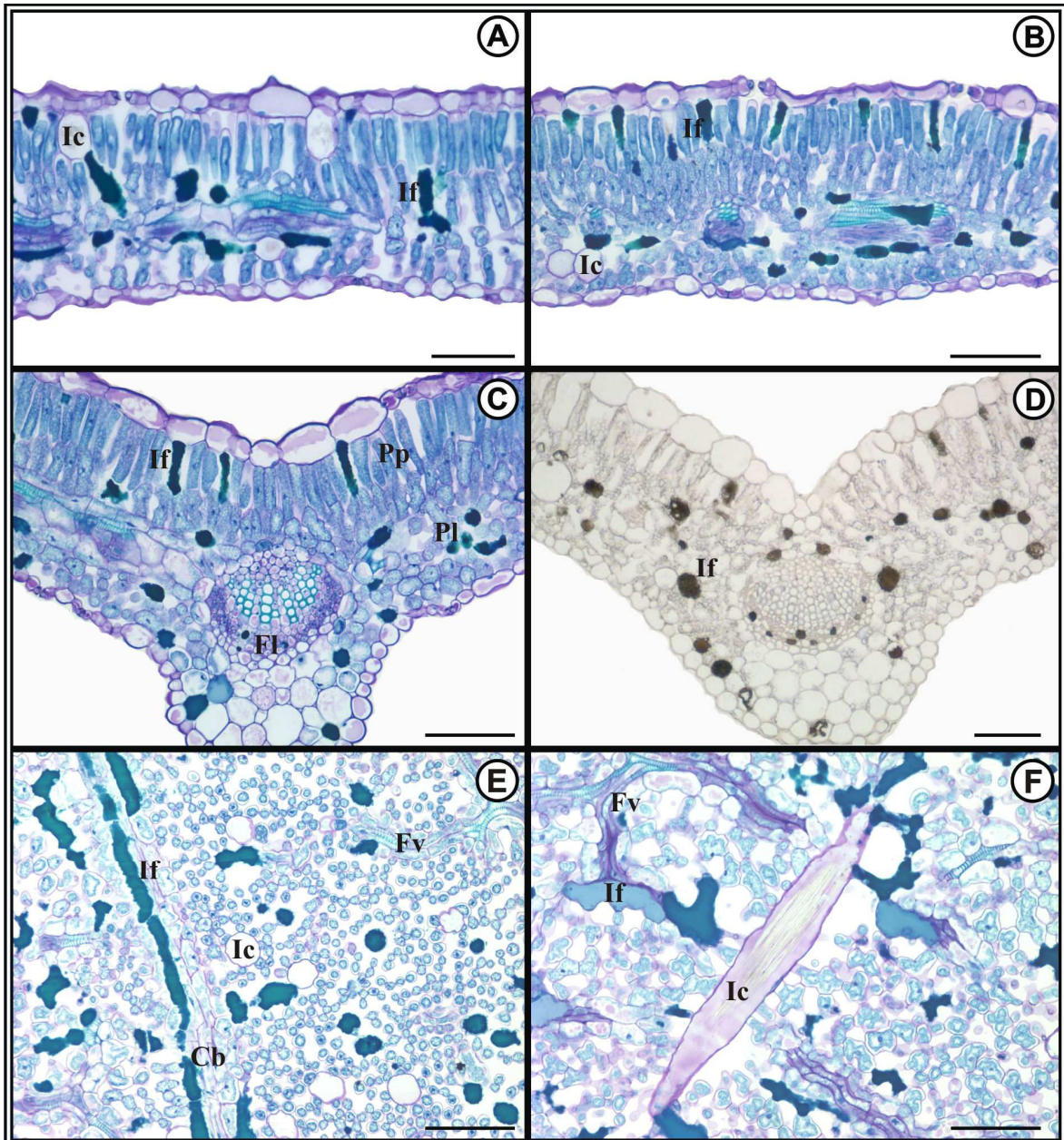


Figura 2. Estrutura da lâmina foliar de plantas de *Borreria verticillata* provenientes de sítio não contaminado (A) e de sítio contaminado com As (B-F) cultivadas em solução nutritiva e expostas a 132µM de As (microscopia de luz). A-C. Corte transversal da lâmina foliar; D. Teste histoquímico para compostos fenólicos. E-F. Cortes paradérmicos na região do parênquima clorofiliano. Cb: células da bainha do feixe vascular; Fl: Floema; Fv: feixe vascular; Ic: idioblasto cristalífero; If: idioblasto fenólico; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico. Barra: 100µm.

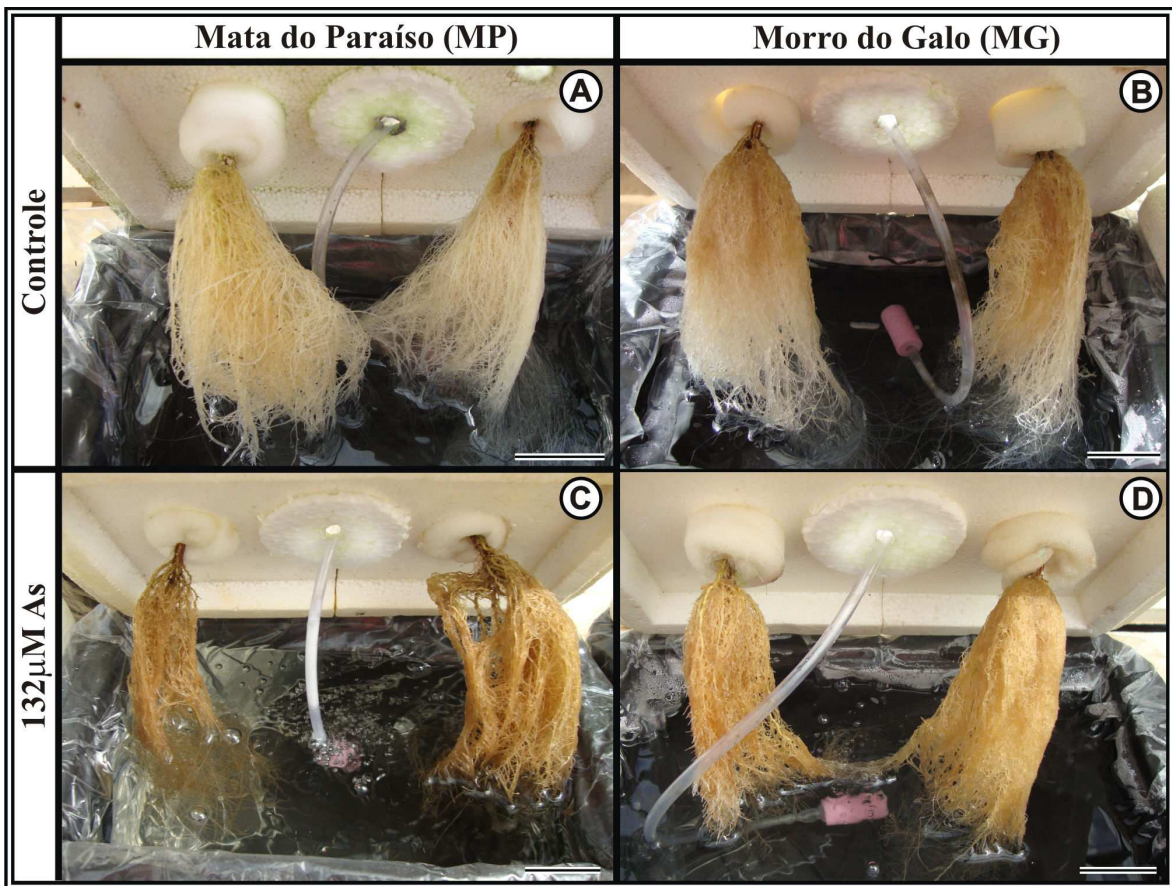


Figura 3. Efeitos do arsênio sobre o sistema radicular de plantas de *Borreria verticillata* provenientes da MP, sítio não contaminado (A e C), e do MG, sítio contaminado com As (B e D), após cultivo em solução nutritiva. A-B. Tratamento controle. C-D. Tratamento com 132µM As. Barra: 3cm.

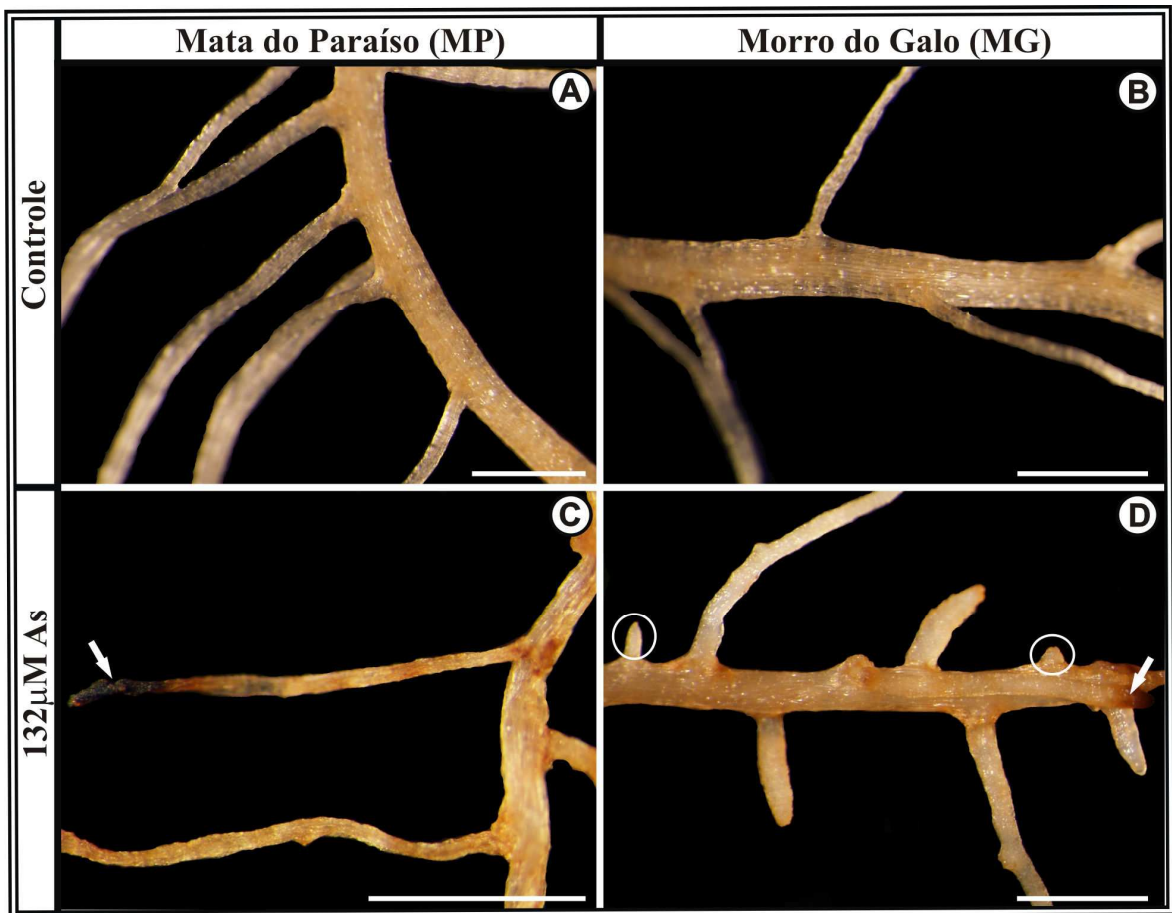


Figura 4. Efeitos do arsênio em raízes laterais de plantas de *Borreria verticillata* provenientes da MP, sítio não contaminado (A e C), e do MG, sítio contaminado com As (B e D), após cultivo em solução nutritiva (microscopia estereoscópica). A-B. Tratamento controle. C-D. Tratamento com 132µM As. Seta: ápice radicular com aspecto necrosado; Círculo: inibição do desenvolvimento de raízes laterais secundárias. Barra: 1mm.

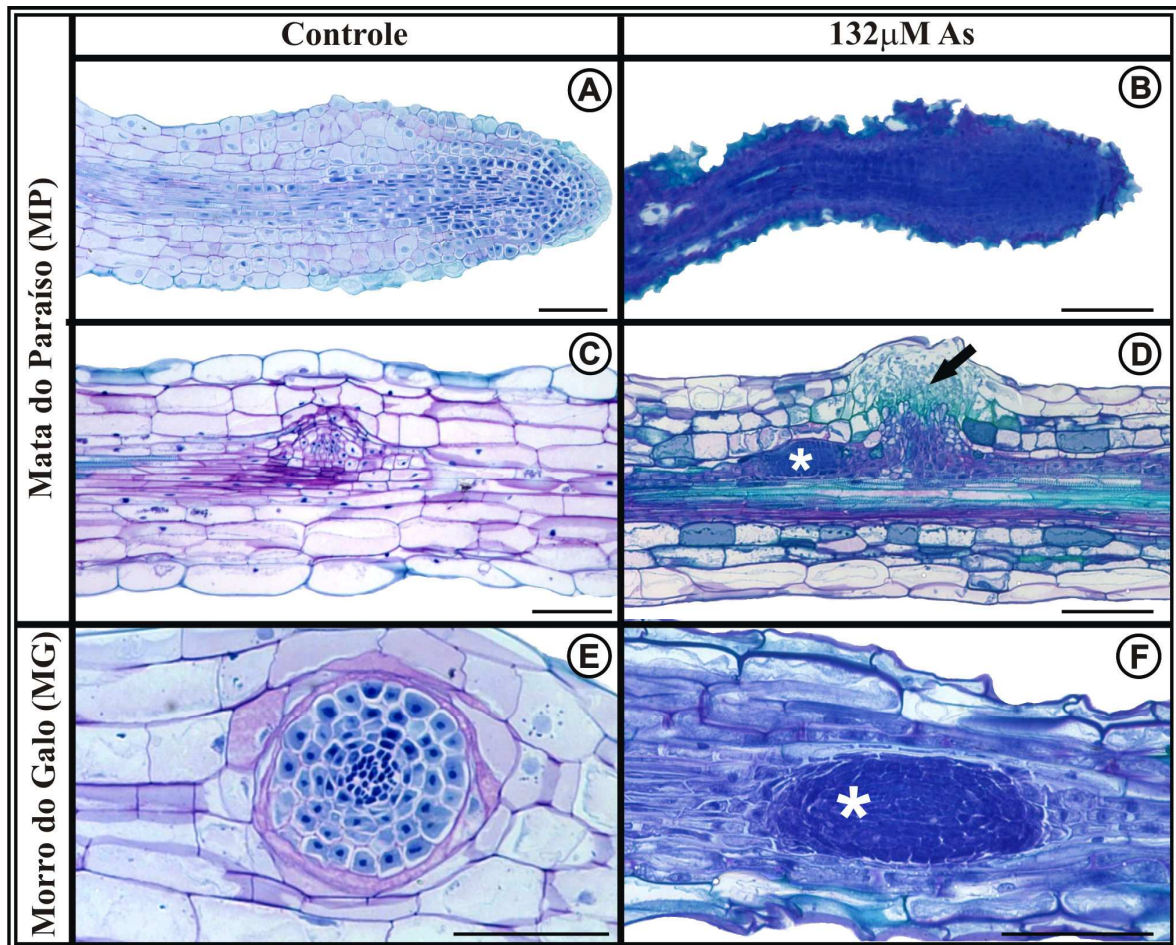


Figura 5. Estrutura de raízes laterais de plantas de *Borreria verticillata* provenientes da MP, sítio não contaminado (A-D), e do MG, sítio contaminado com As (E-F), após cultivo em solução nutritiva (microscopia de luz, cortes longitudinais). A, C e E. Tratamento controle. B, D e F. Tratamento com 132 μ M As. A-B. Ápice radicular. C-D. Início da emissão do primórdio radicular. E-F. Primórdio radicular cortado transversalmente. Seta: proliferação e desintegração celular; (*): primórdio radicular com células colapsadas e com conteúdo intensamente corado pelo azul de toluidina. Barra: 100 μ m.

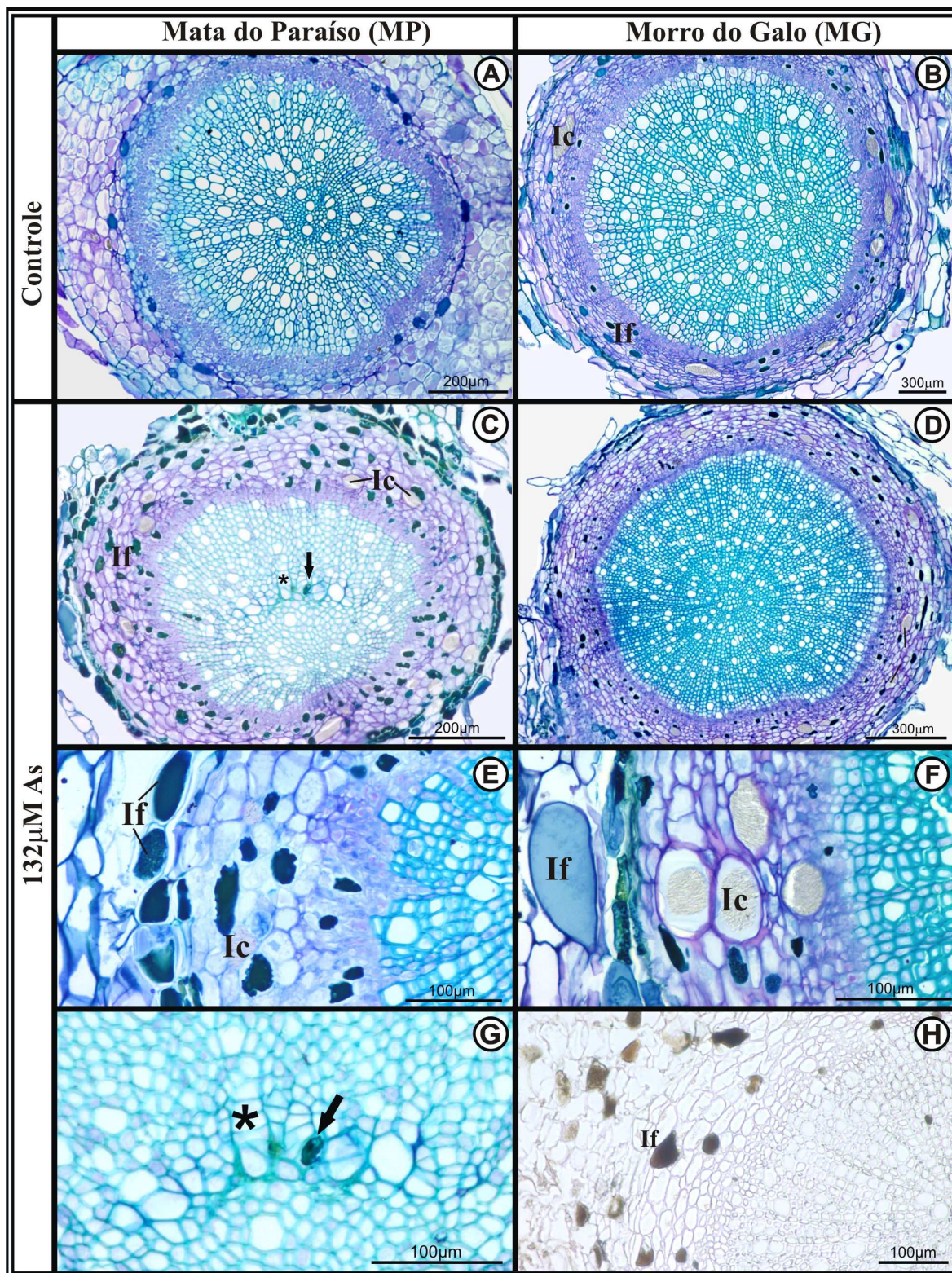


Figura 6. Estrutura de raízes laterais de plantas de *Borreria verticillata* provenientes da MP, sítio não contaminado (A, C, E e G), e do MG, sítio contaminado com As (B, D, F e H), após cultivo em solução nutritiva (microscopia de luz, cortes transversais). A-B. Tratamento controle. C-F. Tratamento com 132µM As. G. Detalhe de C, obstrução (seta) e alteração no formato (*) de elementos de vaso. H. Teste histoquímico para compostos fenólicos. Ic: idioblastos cristalíferos; If: idioblastos fenólicos.

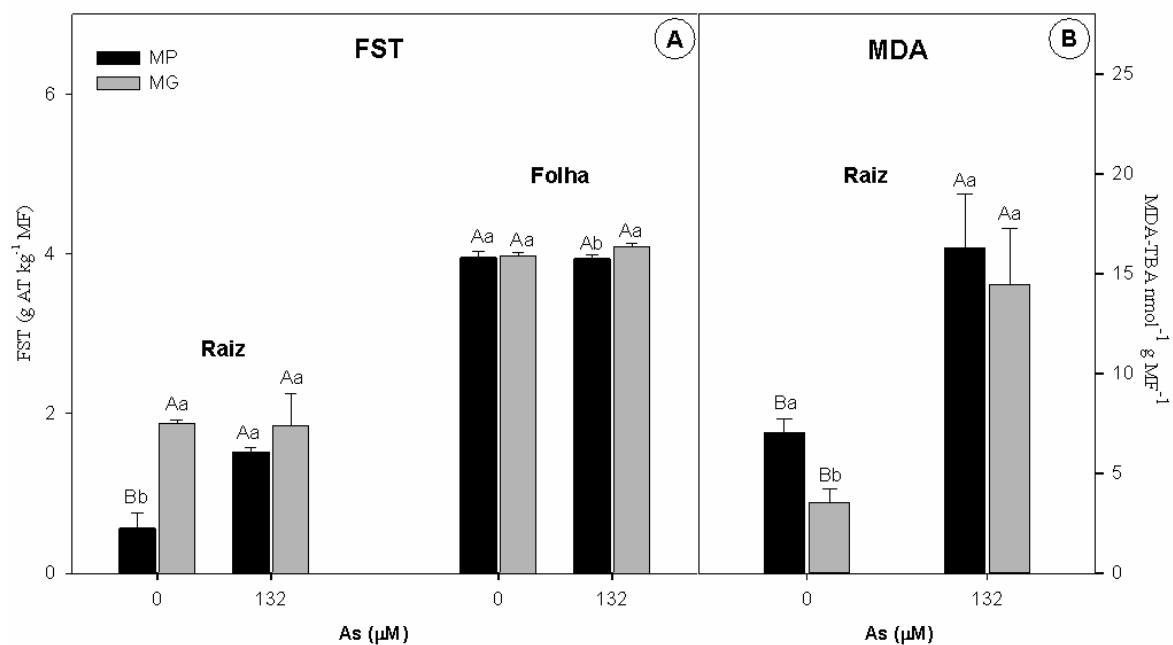


Figura 7. Acúmulo de fenóis solúveis totais (FST) em raízes e folhas (A) e de aldeído malônico (MDA) em raízes (B) de plantas de *Borreria verticillata* cultivadas em solução nutritiva com 132µM de As e 0,5mM de P. Médias representadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade. (Letras maiúsculas representam comparações entre os tratamentos e letras minúsculas comparações entre as duas populações). MP: Mata do Paraíso, sítio não contaminado com As; MG: Morro do Galo, sítio contaminado com As.

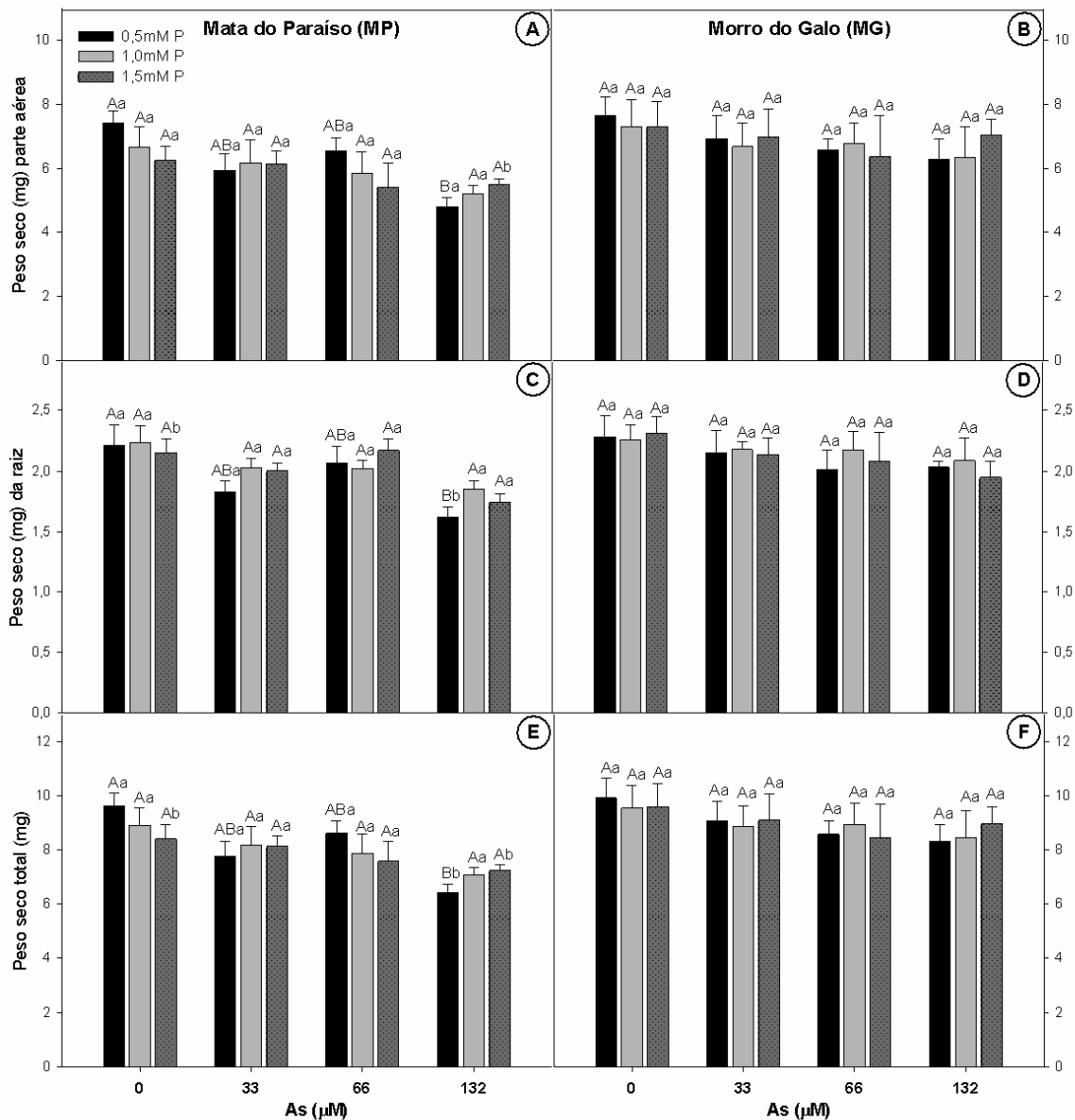


Figura 8. Efeitos da interação de As e P no peso seco da parte aérea (A-B), da raiz (C-D) e peso seco total (E-F) de plantas de *Borreria verticillata* cultivadas em solução nutritiva. Médias representadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. (Letras maiúsculas referem-se a comparação entre as doses de As, em cada nível de P, e as letras minúsculas representam a comparação entre as populações para cada tratamento). MP: Mata do Paraíso, sítio não contaminado com As; MG: Morro do Galo, sítio contaminado com As.

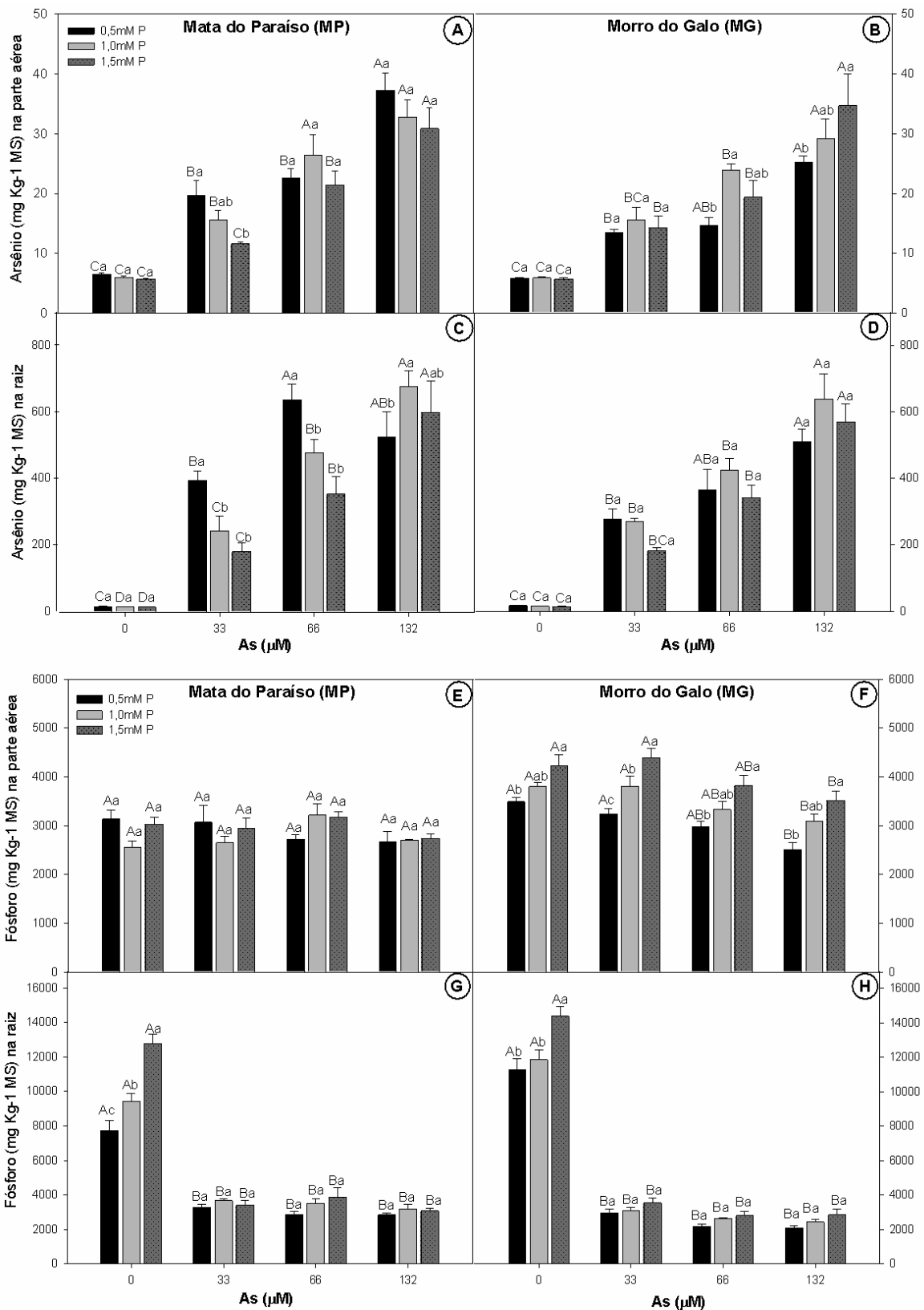


Figura 9. Efeitos da interação entre As e P na concentração de arsênio (A-D) e de fósforo (E-H) em raízes (C-D; G-H); e na parte aérea (A-B; E-F) de plantas de *Borreria verticillata* cultivadas em solução nutritiva. Médias representadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se a comparação entre as doses de As, em cada nível de P, e as letras minúsculas entre os níveis de P, em cada dose de As. MP: Mata do Paraíso, sítio não contaminado com As; MG: Morro do Galo, sítio contaminado com As.

Tabela 1. Comparação entre acúmulo de arsênio (mg Kg⁻¹ MS) na parte aérea e na raiz de plantas de *Borreria verticillata* provenientes de sítios contaminado (MG) e não contaminado com As (MP), cultivadas em solução nutritiva com diferentes doses de As (0, 33, 66 e 132µM) e P (0,5, 1,0 e 1,5mM).

P	Gen/As	Parte aérea				Raiz			
		0	33	66	132	0	33	66	132
0,5	MP	6,54a	19,65a	22,61a	37,30a	16,04b	395,95a	637,91a	526,19a
0,5	MG	5,87b	13,45b	14,67b	25,20b	16,78a	276,74b	363,96b	508,80b
1,0	MP	6,02a	15,56a	26,43a	32,83a	14,43a	244,06a	478,65a	678,21a
1,0	MG	5,90a	15,63a	23,85a	29,13a	14,60a	269,42a	423,08a	637,70a
1,5	MP	5,71a	11,62a	21,44a	30,88a	14,50a	182,54a	355,96a	599,08a
1,5	MG	5,74a	14,23a	19,44a	34,70a	14,12a	181,61a	341,81a	569,27a

*Médias representadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade. (Comparações entre as populações para cada tratamento).

Tabela 2. Comparação entre acúmulo de fósforo (mg Kg⁻¹ MS) na parte aérea e na raiz de plantas de *Borreria verticillata* provenientes de sítios contaminado (MG) e não contaminado com As (MP), cultivadas em solução nutritiva com diferentes doses de As (0, 33, 66 e 132µM) e P (0,5, 1,0 e 1,5mM).

P	Gen/As	Parte aérea				Raiz			
		0	33	66	132	0	33	66	132
0,5	MP	3131,88b	3066,44a	2720,62a	2667,63a	7730,50b	3293,17a	2875,08a	2839,18a
0,5	MG	3488,64a	3238,70a	2968,53a	2506,69a	11265,00a	2962,55a	2168,63a	2082,32a
1,0	MP	2551,99b	2644,88b	3215,31a	2699,58b	9424,89b	3679,10a	3515,92a	3183,91a
1,0	MG	3800,63a	3807,07a	3331,77a	3088,20a	11861,42a	3082,33b	2627,45a	2426,26b
1,5	MP	3022,60b	2947,17b	3178,92b	2733,80b	12765,58b	3431,28b	3866,85a	3069,50a
1,5	MG	4231,04a	4388,29a	3817,77a	3514,19a	14378,14a	3535,09a	2822,24b	2843,98b

*Médias representadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade. (Comparações entre as populações para cada tratamento).

Tabela 3. Efeitos da interação de As e P nos fatores de translocação (FT) e bioacumulação (FBA) de As e no FT de P em plantas de *Borreria verticillata* provenientes de sítios contaminado (MG) e não contaminado com As (MP) cultivadas em solução nutritiva com diferentes doses de As e P.

P	Gen/As	FT (As)			FBA (As)			FT (P)		
		33	66	132	33	66	132	33	66	132
0,5	MP	0,049a*	0,039a	0,072a	166,24a	132,39a	56,35a	0,933a	0,957b	0,943b
0,5	MG	0,051a	0,042a	0,055a	116,08b	75,73b	53,40a	1,120a	1,400a	1,223a
1,0	MP	0,064a	0,057a	0,052a	103,85a	101,02a	71,10a	0,719b	0,928b	0,873b
1,0	MG	0,065a	0,058a	0,048a	114,02a	89,39a	66,68a	1,260a	1,272a	1,309a
1,5	MP	0,064b	0,062a	0,056a	77,67a	75,48a	63,00a	0,866b	0,881b	0,899b
1,5	MG	0,087a	0,067a	0,073a	78,34a	72,25a	60,40a	1,261a	1,378a	1,346a

*Médias representadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade. (Comparações entre as populações para cada tratamento).

Tabela 4. Efeitos da interação de As e P nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de *Borreria verticillata* provenientes de sítio contaminado (MG) e sítio não contaminado com As (MP), cultivadas em solução nutritiva com diferentes doses de As (0, e 132 μ M) e P (0,5, 1,0 e 1,5mM).

		Mata do Paraíso (MP)					Morro do Galo (MG)				
As(μ M)	P(mM)	Fv/Fm	Y(II)	qP	NPQ	ETR	Fv/Fm	Y(II)	qP	NPQ	ETR
0	0,5	0,819a*	0,434a	0,687a	1,658a	273,41a	0,802b	0,329a	0,580a	2,086a	207,45a
	1,0	0,811a	0,304a	0,493a	1,665a	191,79a	0,807a	0,287a	0,475a	1,749a	180,66a
	1,5	0,818a	0,320a	0,512a	1,813a	201,36a	0,809a	0,300a	0,514a	2,056a	188,99a
132	0,5	0,815a	0,233b	0,399b	2,127a	152,18b	0,817a	0,254a	0,437b	2,242a	159,82a
	1,0	0,819a	0,286a	0,486a	2,131a	179,91a	0,801a	0,299a	0,519a	1,938a	188,49a
	1,5	0,819a	0,317a	0,547a	2,298a	199,59a	0,805a	0,334a	0,547a	1,757a	210,65a
CV(%)		0,88	24,97	21,79	21,43	24,66	1,17	20,89	18,59	16,61	20,89

*Médias representadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade. (Comparações entre as diferentes doses As, dentro de cada nível de P).

Tabela 5. Efeitos da interação de As e P no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes em plantas de *Borreria verticillata* provenientes de sítio contaminado (MG) e sítio não contaminado com As (MP), cultivadas em solução nutritiva com diferentes doses de As (0, 33, 66 e 132 μ M) e com 0,5mM de P.

		Mata do Paraíso (MP)				Morro do Galo (MG)			
As (μ M)		Ca	C b	Ct	Caro	Ca	C b	Ct	Caro
0		1,67a*	0,42a	2,09a	0,37a	1,78a	0,45a	2,23a	0,38a
33		1,56a	0,42a	1,98a	0,34ab	1,82a	0,43a	2,25a	0,38a
66		1,49a	0,37a	1,86a	0,32b	1,89a	0,46a	2,35a	0,40a
132		1,68a	0,40a	2,08a	0,37a	1,76a	0,44a	2,20a	0,38a
CV(%)		6,47	6,83	5,33	3,93	12,75	13,55	12,77	12,54

*Médias representadas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. (Comparações entre as diferentes doses de As, dentro de cada nível de P).