

KELLY JULIANE TELLES NASCIMENTO

**FOTOSSÍNTESE, TROCAS GASOSAS E RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS EM
Canavalia ensiformis e *Stizolobium aterrimum* SUBMETIDAS A NÍVEIS
TÓXICOS DE ARSÊNIO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL**

2007

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

T

N244f
2007

Nascimento, Kelly Juliane Telles, 1983-

Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio / Kelly Juliane Telles Nascimento. – Viçosa, MG, 2007.

ix, 36f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 29-36.

1. Fisiologia vegetal. 2. Arsênio. 3. Fotossíntese.
4. Estresse oxidativo. 5. *Canavalia ensiformis*.
6. *Stizolobium aterrimum*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2

KELLY JULIANE TELLES NASCIMENTO

**FOTOSSÍNTESE, TROCAS GASOSAS E RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS EM
Canavalia ensiformis e *Stizolobium aterrimum* SUBMETIDAS A NÍVEIS
TÓXICOS DE ARSÊNIO**

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

APROVADA: 10 de dezembro de 2007

Profª. Rosane M. de Aguiar
Euclides

Prof. Wagner Campos Otoni

Profª. Flávia M. Silva do Carmo

Prof. José Cambraia
(Co-Orientador)

Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

Aos meus amados pais, Augustinha Telles e Márcio Santos, aos meus irmãos Cristiane, Gustavo e Wmarley; aos meus sobrinhos e ao meu namorado Ricardo Rates:

OFEREÇO E DEDICO.

“Há duas formas para viver a sua vida:

Uma é acreditar que não existe milagre.

A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu grandioso Deus por mais essa conquista, pois sem ele não seria possível tal realização.

À Universidade Federal de Viçosa - UFV e ao Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade e condições para o desenvolvimento deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Aos professores Juraci Alves de Oliveira (orientação), Marco Antonio Oliva Cano e José Cambraia (co-orientação) com admiração, pelo apoio, sugestões e colaborações nas etapas do trabalho.

Aos professores Marco Aurélio Pedron e Silva, Rolf Puchmann, Raimundo Santos Barros e Fábio Murilo da Matta pelos ensinamentos.

Aos amigos de curso, Aninha, Carol (colombiana), Carol Müller, Cleberson, Elaine, Eduardo, Ana Maria Mapelli, Marcelo Guimarães, Otávia, Rony, Rithyely e Valdir pela amizade.

Aos queridos e eternos amigos Alan, Alice Pita, Beringh, Cristina, Carlos, Elaina, Élcio, Rogerinho, Paulo (PC) e Werner pela força e ajuda incondicional.

Em especial, à minha amiga Katryne pelos momentos agradáveis proporcionados, pela contribuição nas atividades de laboratório e especialmente pela amizade e companheirismo.

As minhas tias Lourdes, Leila, Nildete, Ione e Luzia e às primas Karina e Gabi pela torcida e carinho.

Finalmente, a todos que contribuíram de forma direta e indireta por essa conquista, meu eterno agradecimento.

BIOGRAFIA

KELLY JULIANE TELLES NASCIMENTO, filha de Rafael Arcaño do Nascimento Neto e Augustinha Telles Ferreira Santos, nasceu na cidade de Rio Verde-GO, no dia 09 de novembro de 1983.

Graduou-se em Biologia-Licenciatura Plena pela Universidade de Rio Verde (FESURV), em Agosto de 2005.

Teve início na pós-graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), agosto de 2005.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1. Obtenção e cultivo das plantas	5
2.2. Acúmulo de arsênio (As) e efeitos sobre o crescimento nas espécies	5
2.3. Efeitos do arsênio em processos fotossintéticos e parâmetros oxidativos das plantas	6
2.3.1. Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos.....	6
2.3.2. Determinação da área foliar.....	7
2.3.3. Avaliação das trocas gasosas e fluorescência da clorofila	7
2.3.4. Determinação da atividade das enzimas dismutases do superóxido (SODs), peroxidases (POXs) e redutase da glutathione (GRs)	7
2.3.5. Determinação da peroxidação de lipídios.....	9
2.4. Delineamento Estatístico	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
3.1. Teores de As e seus efeitos sobre o crescimento das espécies	10
3.2. Efeitos do arsênio sobre parâmetros fotossintéticos nas plantas	17
3.3. Efeitos do As na peroxidação lipídios e nas atividades das enzimas dismutases do superóxido (SODs; EC 1.15.1.1), peroxidases (POXs; EC 1.11.7) e redutases da glutathione (GRs; EC 1.6.4.2).....	22
4. CONCLUSÕES GERAIS	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

RESUMO

NASCIMENTO, Kelly Juliane Telles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2007. **Fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas em *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum* submetidas a níveis tóxicos de arsênio.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Co-Orientadores: José Cambraia e Marco Antônio Oliva Cano.

As espécies *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum*, cultivadas em solução nutritiva, pH 5,5, foram tratadas com arsênio (As) nas concentrações de 0,0; 1,5; 2,5 e 3,5 mg L⁻¹, durante cinco dias. Após este período, determinou-se o teor de As e seus efeitos sobre a produção de massa seca. Além disso, determinou-se o efeito do As sobre processos fisiológicos e parâmetros antioxidativos nas espécies submetidas às doses 0 e 1,5 mg L⁻¹ de As. A concentração de As nas raízes e parte aérea das plantas aumentou com o aumento da concentração de As na solução nutritiva, sempre em maior intensidade em *C. ensiformis*. Observou-se murcha foliar apenas em *C. ensiformis* nas doses 2,5 e 3,5 mg L⁻¹ de As, mas o mesmo não foi observado em *S. aterrimum*. Nas raízes, ambas as espécies apresentaram sintomas de toxidez. *S. aterrimum* apresentou escurecimento e aumento do diâmetro das raízes laterais. *C. ensiformis* apresentou amarelecimento das raízes somente quando submetida à dose 1,5 mg L⁻¹, com evolução dos sintomas de toxidez e desintegração das raízes com o aumento na concentração de As. A redução de pêlos radiculares ocorreu nas duas espécies, sendo mais intensa em *C. ensiformis*. As espécies apresentaram reduções da massa seca nas duas partes das plantas, especialmente na parte aérea. O tratamento com As resultou em aumento nos teores de clorofilas *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenóides para *C. ensiformis*, enquanto *S. aterrimum* não apresentou alteração nas variáveis. Nas duas espécies o As reduziu a taxa de assimilação de CO₂, a transpiração (E), a condutância estomática (*g_s*), a relação concentração de CO₂ interna e externa (Ci/Ca) e a concentração interna de CO₂ (Ci), especialmente em *C. ensiformis*. A fluorescência inicial (*F₀*) e a relação fluorescência variável e fluorescência máxima (*F_v/F_m*), não sofreram alterações nas duas espécies. A exposição das plantas ao

As resultou em aumento na atividade das dismutases do superóxido (SODs), tanto nas raízes quanto nas folhas nas duas espécies. A atividade das peroxidases (POXs) reduziu em *S. aterrimum*, mas aumentou em *C. ensiformis* com o tratamento com As. A atividade das redutases da glutathiona (GRs) aumentou nas raízes das duas espécies, especialmente em *S. aterrimum*. Nas folhas, entretanto, a atividade das GRs aumentou em *C. ensiformis*, mas decresceu em *S. aterrimum*. A peroxidação de lipídios nas raízes e nas folhas sofreram acréscimos, quando submetidas ao tratamento com As, especialmente em *S. aterrimum*. Sob as condições experimentais da presente pesquisa, *S. aterrimum* foi considerada mais tolerante aos efeitos tóxicos do As do que *C. ensiformis*.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Kelly Juliane Telles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december of 2007. **Photosynthesis, gas exchange and antioxidative response in *Canavalia ensiformis* and *Stizolobium aterrimum* exposed to toxic levels of arsenic.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisers: José Cambraia and Marco Antônio Oliva Cano.

Canavalia ensiformis and *Stizolobium aterrimum* species grown in nutrient solution, pH 5.5, were treated with arsenic (As) at 0.0; 1.5; 2.5 and 3.5 mg L⁻¹ concentrations during five days. After plant treatment As content and dry mass yield were determined. Arsenic effect on physiological and antioxidative parameters were also studied in the two species exposed to 0 and 1.5 mg L⁻¹ As concentrations. Arsenic contents in plant roots and shoots increased with the increase in As in the nutrient solution, always at higher rates in *C. ensiformis*. Wilting of leaves was observed in *C. ensiformis* at 2.5 and 3.5 mg L⁻¹ As concentrations, but not in *S. aterrimum*. Both species showed As toxicity symptoms in the roots. *S. aterrimum* showed darkening and diameter increase of lateral roots. *C. ensiformis* showed root yellowing only when exposed to 1.5 mg L⁻¹ As concentration, followed by an increase in toxicity symptoms intensity and root system disintegration as As concentration was increased. Reduction of root hair number occurred in both species, with higher intensity in *C. ensiformis*. The species showed dry mass reduction in both plant parts, especially in the shoots. Chlorophyll *a*, *b* and total and carotenoids contents increased in *C. ensiformis*, but did not change in *S. aterrimum* with As treatment. Arsenic reduced CO₂ assimilation rate, transpiration rate (E), stomatal conductance (*g_s*), internal to external CO₂ concentration ratio (C_i/C_a) and internal CO₂ concentration (C_i) in both species, especially in *C. ensiformis*. Initial fluorescence (*F*₀) and variable fluorescence to maximum fluorescence ratio (*F_v/F_m*) did not change in both species exposed to As. Plants exposure to As resulted in superoxide dismutases (SODs) activity increase in roots and leaves in both species. Peroxidases (POXs) activity decreased in both plant parts of *S. aterrimum*, but increased in *C. ensiformis* with As treatment. Glutathione reductases (GRs) activity increased in the roots of both species, especially in *S. aterrimum*. In the leaves, however, GRs activity increased only in *C.*

ensifomis, while in *S. aterrimum* enzyme activity reduced. Lipid peroxidation in roots and leaves increased in both species after As treatment, especially in *S. aterrimum*. Under the experimental condition used in this research *S. aterrimum* was considered more tolerant to the toxic effects of As than *C. ensiformis*.

1. INTRODUÇÃO

A atividade de mineração promove a remoção da camada superficial do solo e da vegetação, contribuindo para a ocorrência de processos erosivos, provocando o excesso de elementos químicos em solos agrícolas, nos aquíferos superficiais e/ou subterrâneos (Silva *et al*, 2004). Em decorrência dessa prática, as concentrações de metais pesados e de arsênio (As) têm aumento em várias regiões do mundo, incluindo o Brasil.

Dentre os poluentes químicos presentes em áreas de mineração destaca-se o As, um metalóide extremamente tóxico que pode ocorrer em vários estados de oxidação (+3, 0, -3 e +5), embora, sob condições aeróbicas, a forma mais encontrada e fitodisponível seja a pentavalente (Matschullat, 2000; Raquel e Tena, 2005). Vale ressaltar que este elemento apresenta naturalmente ampla distribuição, desde ambientes marinhos até ambientes terrestres, em uma variedade de formas químicas orgânicas e inorgânicas (Barra *et al*, 1999).

O As é associado, principalmente, a minérios sulfetados, como o minério de ouro, os quais são instáveis quando expostos ao ar atmosférico (Matschullat, 2000). No processo de extração do ouro, o minério arsenopirita (FeSAs) é oxidado, facilmente dissolvido e mobilizado nas águas de drenagem (Silva *et al*, 2004), proporcionando a liberação do As nos ecossistemas. Além do ouro, a liberação do As pode estar associada também à extração do cobre, do níquel, do chumbo, do cobalto, dentre outros (Mandal e Suzuki, 2002).

Concomitante à atividade de mineração, os elevados níveis de As são decorrentes de outras fontes, tais como pesticidas (herbicidas e fungicidas) e fertilizantes utilizados na agricultura, da combustão de carvão, de preservativos de madeira, de dessecantes (Mandal e Suzuki, 2002), da atividade industrial (Mirlean *et al*, 2003; Liao *et al*, 2005), e acréscimos naturais pelo intemperismo de rochas (Sha e Ali, 2007).

O As inorgânico, ingerido a partir de águas contaminadas, está relacionado com o aumento de câncer e diversas outras patologias em humanos, o que resultou na alteração do limite de As em águas potáveis, que passou de 50 para 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Smith *et al*, 2002).

A degradação decorrente da liberação em excesso de metais no ambiente tem ocorrido de forma sistemática e crescente, o que torna importante a busca de alternativas para reduzir essas ações danosas, assim como para a recuperação daqueles locais já degradados.

No Brasil, a legislação ambiental exige que tais áreas degradadas sejam recuperadas, e uma das alternativas para a recuperação desses ambientes consiste na implantação do processo de revegetação, no qual as plantas atuam como fitorremediadoras dos poluentes presentes no solo. Dessa forma, a obtenção de espécies vegetais que melhor se adaptem a essas condições ambientais torna-se etapa indispensável ao processo de revegetação.

A utilização das espécies herbáceas na revegetação proporciona melhorias na qualidade do solo, aumentando o teor de matéria orgânica, a proteção contra os processos erosivos e a redução na biodisponibilidade de elementos tóxicos. Portanto, o plantio prévio de espécies herbáceas é fator determinante no sucesso da etapa posterior da revegetação, que é o estabelecimento de espécies arbóreas e arbustivas, pois os solos contaminados são pobres em nutrientes e matéria orgânica, além de apresentarem elevada toxidez (Li e Daniels, 2004).

O processo de absorção e os efeitos tóxicos do As nos vegetais são influenciados por muitos fatores, dentre eles o balanço da concentração de fosfato e As, a forma química do elemento (Abedin e Meharg, 2002; Raquel e Tena, 2005; Milivojevic *et al*, 2006) e o pH do meio (Tu e Ma, 2003).

Um importante mecanismo de defesa ao As é a supressão do transportador de alta afinidade fosfato/As, o que reduz a absorção de arsenato pelo sistema radicular (Bleeker *et al*, 2003; Meharg e Macnair, 1990). O arsenato absorvido, por ser análogo ao fosfato, interfere na absorção desse elemento e nas reações de fosforilação, pois se liga ao ADP formando o ADP-As, provocando alterações no fluxo energético celular (Hugles, 2002), podendo inibir a H^+ -ATPase mitocondrial e assim prejudicando a biossíntese de ATP (Joshi e Hugles, 1981; Mylona *et al*, 1998; Meharg e Harttley-Whitaker, 2002). Além disso, pode promover a formação de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) (Mylona *et al*, 1998; Meharg e Harttley-Whitaker, 2002). Os ROIs também podem ser formados durante a redução do arsenato (Mascher *et al*, 2002) a partir de excitação de oxigênio molecular para formar oxigênio singlete (O_2^1), ou pela transferência de um, dois ou três elétrons formando, respectivamente, radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou ainda o radical hidroxil (HO^\bullet) (Mittler, 2002), que causam estresse oxidativo.

O arsenato pode ser reduzido a arsenito pela ação da enzima redutase do arsenato (RA), recentemente identificada em diversas espécies vegetais (Duan *et al*, 2005; Ellis *et al*, 2006) ou por via não-enzimática, pela glutatona reduzida. Estes processos de redução do As ocorrem nas raízes e/ou na parte aérea, sendo que o grau de intensidade dependerá da espécie estudada (Duan *et al*, 2005).

O arsenito, considerado a forma mais tóxica, liga-se a grupos sulfidrílicos de enzimas e proteínas, resultando em disfunção celular (Hugles, 2002; Raquel e Tena, 2005). Mas é também essa ligação que o torna facilmente complexado por compostos tiolados, podendo ser depositado em vacúolos (Pilon-Smits, 2005), evitando assim seus efeitos tóxicos.

Diversos trabalhos relatados indicam que a indução de estresse oxidativo pelo As pode ser um dos principais efeitos da toxicidade do arsênio em plantas (Sunkar *et al*, 2003; Raquel e Tena, 2005; Bhattacharya e Bhattacharya, 2007). Dentre os vários aspectos do estresse oxidativo, a peroxidação de lipídios tem sido considerada um dos principais mecanismos de injúria celular (Bhattacharya e Bhattacharya, 2007), o qual se inicia na peroxidação de ácidos graxos insaturados das membranas celulares (Montillet *et al*, 2005; Singh *et al*, 2007), acarretando alteração de permeabilidade e flexibilidade e, ainda, a ruptura das estruturas celulares, conforme observado no sistema de membranas do cloroplasto (Li *et al*, 2006) e nas demais membranas celulares (Meharg, 1993).

O As causa danos às membranas dos tilacóides e outros efeitos tóxicos podem ocorrer como a diminuição do conteúdo de carotenóides e de clorofilas, a diminuição na fixação de CO₂ (Päivöke e Simola, 2001; Stoeva e Bineva, 2003; Stoeva *et al*, 2003); a inibição e/ou redução na atividade das enzimas desidratase do ácido d-aminolevulínico (Sanz-Muñoz *et al*, 1982; Jain e Grade, 2004), rubisco (RuBPC) e carboxilase do fosfoenol piruvato (PEPCase) (Parys *et al*, 1998; Hugles, 2002); a redução da atividade fotoquímica, alterando os parâmetros de fluorescência mínima (F_0), máxima (F_m) e variável (F_v) (Björkman e Demming, 1987; Stoeva *et al.*, 2003), dentre outros fatores considerados indicadores de eficiência fotossintética.

Os efeitos indiretos causados pelo As, como a indução da produção de ROIs, resultam em alterações de diversos mecanismos bioquímicos, como o aumento na atividade de várias enzimas antioxidativas, destacando-se as dismutases do superóxido (SODs), as catalases (CATs), as peroxidases do ascorbato (APXs), as peroxidases totais (POXs) e as redutases da glutatona (GRs).

As SODs removem os radicais superóxido (O_2^-), tendo como produto de reação a formação do H_2O_2 (Gratão *et al*, 2005), reação considerada a primeira na linha de defesa contra o estresse oxidativo. A remoção do H_2O_2 , formado espontaneamente ou pela dismutação do radical superóxido pelas SODs, depende da atividade das enzimas APX, POX e CAT, consideradas fundamentais na manutenção da homeostase celular. A ação dessas enzimas evita a produção de radical hidroxil (HO^\bullet), gerado pelas reações de “Haber-Weiss” e “Fenton” (Asada, 1992).

Além da ação das enzimas antioxidativas, a síntese de tióis tem envolvimento direto no metabolismo de desintoxicação por As (Caia *et al*, 2003). Dentre os tióis, a glutathiona e as fitoquelatinas são os principais componentes relacionados com o aumento da tolerância das plantas ao As (Li *et al*, 2004). A glutathiona (γ -glutamil-cisteinil-glicina) na forma reduzida corresponde a cerca de 95% da glutathiona total (Anderson, 1985) e atua na remoção de ROIs, através do ciclo ascorbato-glutathiona, e na síntese de fitoquelatinas, as quais são atuantes no processo de complexação e compartimentação de metais (Mishra *et al*, 2006). A relação glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) é alterada em condições de intoxicação por As, uma vez que a síntese de fitoquelatinas requer a utilização da glutathiona na forma reduzida. A manutenção da proporção GSH/GSSG se dá pela ação da redutase da glutathiona (GR), que utiliza NAD(P)H como doador de elétrons e regenera duas moléculas de GSH, com a redução da GSSG (Carlberg e Mannervik, 1985).

Verifica-se, assim, que em face da complexidade dos efeitos tóxicos e das respostas das plantas ao As, a realização de estudos que envolvam os mecanismos antioxidativos e os fotossintéticos são ferramentas fundamentais para o conhecimento da resposta das plantas submetidas à contaminação com As.

As plantas *Stizolobium aterrimum* e *Canavalia ensiformis* têm sido utilizadas com sucesso em fitoremediação de ambientes contaminados (Procópio *et al*, 2005; Pires *et al*, 2006; Santos *et al*, 2007), mas são escassas as informações sobre os mecanismos enzimáticos antioxidativos e fisiológicos dessas plantas, afetadas pelo As.

Este trabalho teve, portanto, como objetivo, avaliar alguns aspectos da fotossíntese, trocas gasosas e respostas antioxidativas das espécies *Stilozobium aterrimum* (L.) e *Canavalia ensiformis* (DC.) submetidas a níveis tóxicos de As.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e cultivo das plantas

Sementes de *Stizolobium aterrimum* (mucuna-preta) e *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) fornecidas pela empresa Pirai Sementes, Piracicaba/SP, foram selecionadas quanto ao tamanho e forma, esterilizadas por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2,5%, seguido de lavagem em água corrente e desmineralizada. As sementes foram germinadas em cartuchos de papel “germiteste”, parcialmente imersos em recipientes contendo água desmineralizada (1,6 L), na ausência de luz, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. No caso de *S. aterrimum* foi feita primeiramente a quebra de dormência das sementes por tratamento com ácido sulfúrico por 15 minutos, seguido de lavagem em água corrente e desmineralizada.

Após a germinação, quando as radículas atingiram comprimento de aproximadamente 3 cm, 40 plântulas de cada espécie foram transferidas para recipientes de polietileno contendo 20 L de solução nutritiva de Clark (1975), pH 5,5, em sala de crescimento com temperatura e intensidade luminosa controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $230 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$), sob fotoperíodo de 16 horas. Selecionou-se a solução de Clark (1975) para utilização nos experimentos, por apresentar menor concentração de fósforo em relação a outras soluções nutritivas.

2.2. Acúmulo de arsênio (As) e efeitos sobre o crescimento das espécies

Quando as plântulas de *S. aterrimum* e *C. ensiformis* apresentaram o primeiro par de folhas cotiledonares expandido, foram transferidas para vasos opacos de polietileno (três plântulas/vaso) contendo 1,7 L de solução nutritiva de Clark (1975), pH 5,5, ajustado diariamente, e submetidas ao tratamento com As na forma de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, nas concentrações de 0,0; 1,5; 2,5 e 3,5 mg L^{-1} . Após 5 dias de tratamento, procedeu-se a avaliação dos sintomas visuais de toxidez e a coleta do material vegetal para as devidas análises. As plântulas, após lavagem das raízes com HCl 0,1 N por 3 minutos, foram lavadas subsequentemente em água corrente e desmineralizada, separadas em raízes e

parte aérea e secadas em estufa a 80°C até peso constante. Após a determinação dos pesos de matéria seca, o material vegetal foi moído em almofariz elétrico utilizando peneira de 20 mesh. Amostras de matéria seca (aproximadamente 100 mg) foram mineralizadas em 3 mL de solução nítrico-perclórica (3:1), sob temperatura controlada (máximo de 120°C, para evitar a evaporação do As) (Marin, 1993), seguido de filtração e diluição com água desmineralizada para volume final de 25 mL. A determinação da concentração de As nas amostras foi realizada em espectrofotômetro de emissão em plasma indutivamente acoplado.

2.3. Efeito do arsênio sobre processos fotossintéticos e parâmetros oxidativos das plantas

As plântulas de *S. aterrimum* e *C. ensiformis* obtidas conforme o item 2.1 foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho, e transferidas para vasos opacos (quatro plântulas/vaso) contendo 1,7 L de solução nutritiva de Clark, pH 5,5, com As na forma de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 0,0 e 1,5 mg L^{-1} , onde permaneceram por 5 dias, com ajuste diário do pH. Transcorrido este período, foram avaliados os teores de pigmentos fotossintéticos, as trocas gasosas, os parâmetros de fluorescência, as atividades das enzimas antioxidativas e a peroxidação de lipídios.

2.3.1. Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos

Amostras de 100 mg de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido após adição de uma pitada de CaCO_3 e, em seguida, homogeneizadas em 3 mL de acetona 80% (v/v) por 1 min. A suspensão resultante foi filtrada através de papel de filtro Whatman # 1, sendo o resíduo lavado por três vezes com 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* e *b* e carotenóides) estimados conforme sugerido por Lichtenthaler (1987).

2.3.2. Determinação da área foliar

Os primeiros pares de folhas completamente expandidos de plantas de *S. aterrimum* e *C. ensiformis* foram coletados após o período de experimentação, e suas áreas foliares determinadas com a utilização de um medidor de área foliar, marca Meter Licor, modelo L1 – 300.

2.3.3. Avaliação das trocas gasosas e fluorescência da clorofila

A condutância estomática (g_s), a taxa de transpiração (E), a concentração interna de CO_2 (C_i), a taxa de assimilação líquida de carbono (A) e a relação C_i/C_a (concentração interna e externa de CO_2) foram determinadas em folhas inteiras das plantas, usando analisador de gás no infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA). Para a estimativa destes parâmetros cada repetição foi constituída da folha mais jovem completamente expandida, utilizando uma radiação fotossinteticamente ativa de 700 e 1000 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *S. aterrimum* e *C. ensiformis*, respectivamente, na temperatura e concentração de CO_2 ambiente.

A cinética de indução de fluorescência da clorofila *a* foi acompanhada nas mesmas folhas, paralelamente às medições de trocas gasosas, utilizando-se um fluorômetro modulado portátil MINI-PAM (Heinz WALZ, Effeltrich, Alemanha). Após o período de adaptação ao escuro por 30 min, os tecidos foliares foram inicialmente expostos a um pulso fraco de luz vermelho-distante [$0,15 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$] para, então, determinar-se a fluorescência inicial (F_0). Seguiu-se a aplicação de um pulso de luz saturante, superior a 3000 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 0,8 s para a medição da fluorescência máxima emitida (F_m). Com estes dados, foi estimada a eficiência quântica máxima do PSII $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$.

2.3.4. Determinação das atividades das enzimas dismutases do superóxido (SODs; EC 1.15.1.1), peroxidases (POXs; EC 1.11.7) e redutases da glutatona (GRs; EC 1.6.4.2)

Amostras homogêneas de 0,3 g de matéria fresca de raízes e folhas de cada repetição foram maceradas em nitrogênio líquido. Seguiu-se a adição de 2 mL de meio de homogeneização, filtração das amostras através de quatro camadas de gaze e de

centrifugação a 12.000 xg por 15 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes constituíram os extratos enzimáticos brutos utilizados na determinação das atividades das enzimas. O meio de homogeneização foi constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) para as enzimas SODs e POXs (Peixoto *et al*, 1999). Para as GRs, o meio de homogeneização foi constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, dithiothreitol 2 mM (DTT), PMSF 1 mM e PVPP 1% (Carlberg e Mannervik, 1985).

A atividade das SODs foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo *et al*, 1993). A reação foi conduzida a 25°C sob iluminação de lâmpada de 15 W. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, medida a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). A absorvância a 560 nm de meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual tempo, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Peixoto *et al*, 1999).

A atividade das POXs foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. O acréscimo na absorvância a 420 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, pela produção de purpurogalina. A atividade das POXs foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955).

A atividade das GRs foi determinada pela adição de 100 µL de extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, glutathiona oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM (em tampão TRIS-HCl 0,5 mM, pH 7,5), segundo Carlberg e Mannervik (1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30°C, foi medido no primeiro minuto após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Foyer e Halliwell, 1976).

2.3.5. Determinação da peroxidação de lipídios

Amostras de 0,2 g de tecidos vegetais foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v), seguido de filtração através de quatro camadas de gaze, e centrifugação a 12.000 xg por 15 min. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C. Aliquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v) e incubadas em banho-maria a 95° C. Após 2 h, a reação foi paralisada com a transferência dos tubos de ensaio para banho de gelo. Posteriormente, foram centrifugadas a 9.000 xg por 10 min e a absorvância dos sobrenadantes determinadas a 532 nm. A absorvância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída dos resultados obtidos das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 155 $mM^{-1} cm^{-1}$ (Heath e Packer, 1968).

2.4. Delineamento Estatístico

Os experimentos foram realizados em blocos ao acaso, sendo o primeiro um fatorial 4 x 2, quatro doses (0,0; 1,5; 2,5 e 3,5 $mg L^{-1}$) de arsenato (As^{+5}), duas espécies vegetais e três repetições; e o segundo experimento um fatorial 2 x 2, duas doses (0,0 e 1,5 $mg L^{-1}$) de arsenato (As^{+5}), duas espécies vegetais e três repetições.

Os dados foram submetidos à ANOVA, com ajustes de modelos de regressão. As análises foram efetuadas utilizando o programa estatístico “SAEG”, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teores de As e seus efeitos sobre o crescimento das espécies

Os teores de As aumentaram linearmente nas duas espécies, com o incremento dos níveis do elemento na solução nutritiva (Figura 1). As doses utilizadas neste experimento não foram suficientes para atingir estabilização no teor de As nem nas raízes e nem na parte aérea, tendo as plantas mantido a tendência de incremento nos teores, mesmo acima de 3,5 mg L⁻¹ de As, para o intervalo de tempo analisado.

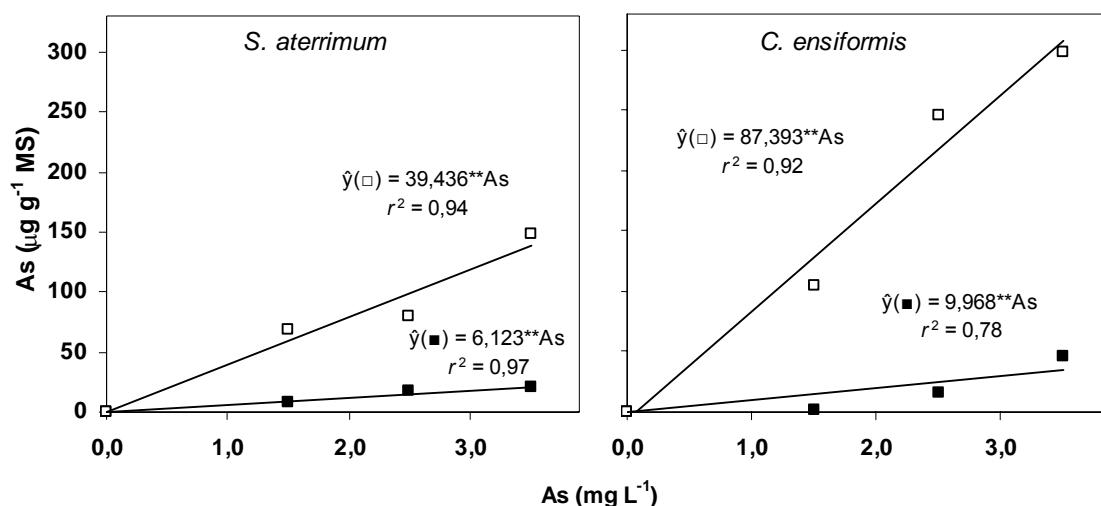


Figura 1. Teores de arsênio na parte aérea (■) e nas raízes (□) nas espécies *S. aterrimum* e *C. ensiformis* expostas durante cinco dias a concentrações crescentes de As em solução nutritiva.

A espécie *S. aterrimum* apresentou menor incremento no teor de As nas raízes (2,2 vezes menor) quando comparada com *C. ensiformis*. Este fato parece ter contribuído para a maior tolerância apresentada pela espécie *S. aterrimum*, pois a prevenção de acúmulo pode ser um dos mecanismos de tolerância ao As (Carbonel-Barrachina *et al*, 1997).

A retenção de As pelas raízes pode estar relacionada à sua capacidade de ligação a compostos da parede celular (Salt *et al*, 1998), redução na sua condução via fluxo de água pelo xilema (Stoeva *et al*, 2005) ou, ainda, sua complexação por fitoquelatinas (PCs),

cujas concentrações aumentam nas raízes em algumas espécies expostas a elevados níveis de As (Reina *et al*, 2005).

Na parte aérea das plantas estudadas o teor de As apresentou incremento linear com o aumento na concentração de As na solução nutritiva (Figura 1). Em *C. ensiformis* ocorreu, proporcionalmente, maior translocação de As das raízes para a parte aérea. A menor translocação de As observada em *S. aterrimum* foi, também, observada em clones tolerantes e sensíveis de *Holeus lanatus* (Quaghebeur e Rengel, 2003) e pode estar associada a mecanismos de defesa do vegetal aos efeitos tóxicos provocados pelo As. Além disso, a tolerância das plantas está relacionada com a manutenção das funções fotossintéticas e, portanto, quanto menor o transporte do As para a parte aérea, menor o comprometimento da taxa fotossintética e maior a tolerância do vegetal.

Os teores de As na parte aérea foram sempre inferiores aos das raízes nas duas espécies. A mesma resposta foi relatada para *Phaseolus vulgaris* (Van den Broeck *et al*, 1998), *Pisum sativum* (Päivöke e Simola, 2001) e *Spartina alterniflora* (Carbonell-Barrachina *et al*, 1998b). Em alguns casos, no entanto, tem sido verificado que espécies tolerantes acumulam maiores concentrações de As na parte aérea (Päivöke e Simola, 2001; Tu e Ma, 2002), indicando a existência de mecanismo de compartimentação de As, diferente do encontrado neste estudo.

Corroborando com os dados obtidos neste trabalho, o aumento na absorção e acúmulo de As nas raízes e parte aérea, à medida que a concentração disponível na solução nutritiva aumentou, também foi demonstrado para *Lycopersicum esculentum*, *Phaseolus vulgaris* (Carbonell-Barrachina *et al*, 1997), *Pisum sativum* (Päivöke e Simola, 2001), *Pteris vittata* (Tu e Ma, 2003), *Thelypteris palustris* (Anderson e Walsh, 2007) e *Solanum nigrum* (Sun *et al*, 2007).

A menor absorção e acúmulo de As parecem estar relacionados à tolerância das espécies ao As (Meharg e Macnair, 1991), de modo que as espécies tolerantes devem apresentar menor absorção e acúmulo deste elemento, como resultado da operação dos mecanismos de defesa. Esses mecanismos parecem ser desencadeados pela supressão do sistema de transporte de fosfato de alta afinidade (Meharg e Macnair, 1990). Evidentemente, a redução do influxo de arsenato em plantas tolerantes reduz o teor do elemento na planta e, portanto, o efeito tóxico apresentado por ele (Hartley-Whitaker e Meharg, 2002). No entanto, o mecanismo de tolerância das plantas ao As envolve vários componentes, como a atuação de agentes complexantes (Hartley-Whitaker *et al*, 2002), a

atuação de mecanismos enzimáticos antioxidativos, dentre outros. Logo, a redução de influxo por si só não é o único mecanismo responsável pela tolerância de plantas ao As.

A figura 2 mostra a sintomatologia das plantas submetidas a diferentes concentrações de As, após cinco dias de exposição. Não foram observadas necroses nas plantas em nenhum dos tratamentos, o que pode ser devido ao curto período de exposição, ou ainda à reduzida translocação de As para a parte aérea. Entretanto, outros pesquisadores observaram necroses foliares em *Pteris vitatta*, exposta ao As por 168 dias (Li *et al*, 2006), por 89 e 198 dias (Caille *et al*, 2004); e em *Oryza sativa*, submetida ao As durante 14 dias (Shaibur *et al*, 2006).



Figura 2. Aspecto visual das espécies *S. aterrimum* (A) e *C. ensiformis* (B) submetidas às doses de As (0,0; 1,5; 2,5 e 3,5 mg L⁻¹ da esquerda para direita), após cinco dias de exposição (Barras = 10 cm). Notar a emissão de novos ramos (setas).

Em *S. aterrimum* foi possível observar a emissão de novos ramos, mesmo nas maiores doses de As analisadas (Figura 2A), enquanto que em *C. ensiformis* isto não foi observado, mesmo na menor dose. Dados como estes reforçam a existência de tolerância diferencial entre as espécies, na qual a espécie *S. aterrimum* quando submetida a doses crescentes de As foi menos afetada do que *C. ensiformis*.

Nas plantas de *C. ensiformis*, quando expostas as doses 2,5 e 3,5 mg L⁻¹, foi possível observar murcha foliar (Figura 3D), o que não foi observado para a espécie *S. aterrimum* (Figura 3 B). Sugere-se, portanto, que a murcha foliar observada em *C. ensiformis* foi causada por alterações das relações hídricas devido, provavelmente, em função da ação inibitória do As sobre a H⁺-ATPase mitocondrial comprometendo a produção de energia e, conseqüentemente, a absorção de íons (Joshi e Hugles, 1981; Mylona *et al*, 1998; Meharg e Harttley-Whitaker, 2002) e/ou pelo comprometimento das células do sistema radicular, levando à alteração na absorção de água.

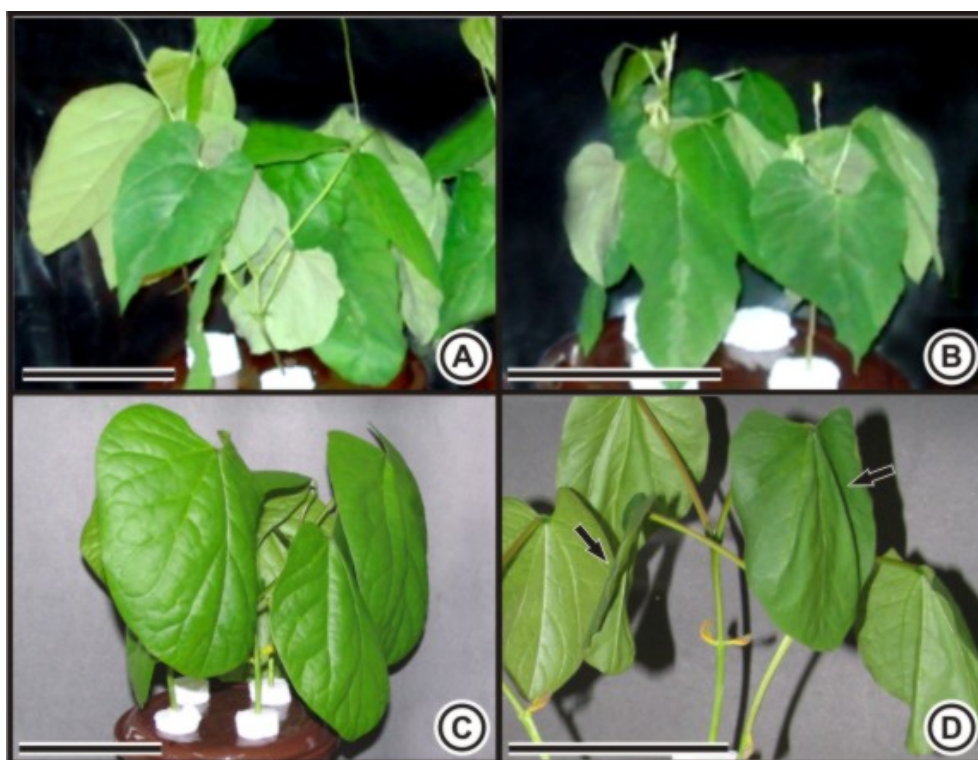


Figura 3. Aspecto visual das plantas de *S. aterrimum* e *C. ensiformis* submetidas às doses de As [0,0 (A e C) e 2,5 mg L⁻¹ (B e D)], após cinco dias de exposição em solução nutritiva. As setas indicam murcha foliar (Barras = 10 cm).

As figuras 4 e 5 apresentam os sistemas radiculares de ambas as plantas após cinco dias de exposição, nos quais foram observados sintomas de toxidez de As.



Figura 4. Raízes de *S. aterrimum* submetidas às doses crescentes de As (0,0; 1,5; 2,5 e 3,5 mg L⁻¹ da esquerda para direita) após cinco dias de exposição. As setas indicam as raízes laterais em diferentes doses de As (Barra = 2 cm).



Figura 5. Raízes de *C. ensiformis* submetidas às doses crescentes de As (0,0; 1,5; 2,5 e 3,5 mg L⁻¹ da esquerda para direita) após cinco dias de exposição (Barra = 1 cm).

A figura 4 mostra que em *S. aterrimum* exposta ao As houve aumento do diâmetro dos pêlos radiculares, especialmente na dose de 1,5 mg L⁻¹. O número de raízes laterais diminuiu e o escurecimento do sistema radicular se intensificou à medida que a concentração deste elemento aumentou na solução nutritiva, semelhante ao observado por Machlis (1941).

Em *C. ensiformis* observou-se amarelecimento do sistema radicular somente na dose 1,5 mg L⁻¹ (Figura 5). Nas doses de 2,5 e 3,5 mg L⁻¹ o sintoma de toxidez intensificou-se nas raízes, assumindo aspecto encharcado e gelatinoso (Figura 6B). Esse dado indica que, provavelmente, as raízes das plantas morreram antes mesmo da ocorrência de reações que resultariam na intensificação da coloração do sistema radicular. Como as raízes se tornaram afuncionais, pode-se dizer que o As participou diretamente da alteração da absorção de água e nutrientes minerais, levando à murcha foliar nas plantas submetidas às doses 2,5 e 3,5 mg L⁻¹. Resultados semelhantes foram observados por Machlis (1941), o qual admitiu a ocorrência de desorganização celular do sistema radicular em função do tratamento com As.

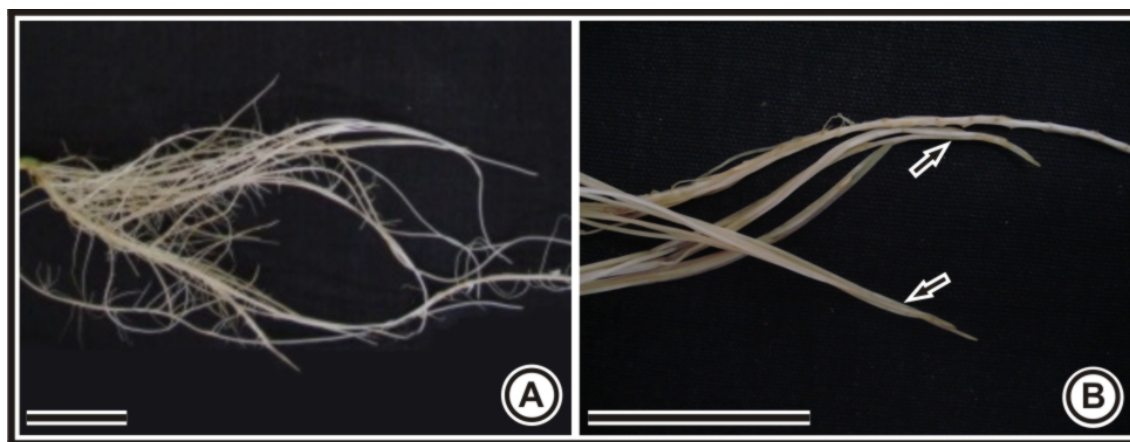


Figura 6. Raízes de *C. ensiformis* submetida às doses de As [0,0 (A) e 2,5 mg L⁻¹ (B)] após cinco dias de exposição em solução nutritiva. As setas indicam o aspecto encharcado e gelatinoso (Barras = 1 cm).

A redução de pêlos radiculares ocorreu nas duas espécies, sendo mais intensa em *C. ensiformis*, com ausência total de pêlos nas doses 2,5 e 3,5 mg L⁻¹. Estudos recentes com plantas de *Phaseolus vulgaris* expostas ao As evidenciaram redução nas ramificações do sistema radicular (Stoeva *et al*, 2005) e danos às células do córtex e epidérmicas, causando perda da forma, sinais de murcha e posterior desintegração (Singh *et al*, 2007).

Na espécie *S. aterrimum* observou-se declínio linear no ganho de massa seca da parte aérea com o incremento das doses de As (Figura 7). Em *C. ensiformis* houve rápido decréscimo do ganho de massa (parte aérea) até a dose 1,5 mg L⁻¹, tendendo à estabilidade a partir desta dose. Essa paralisação na produção de massa seca é decorrente, possivelmente, da morte acelerada do sistema radicular causada pela toxicidade do As nas concentrações de 2,5 e 3,5 mg L⁻¹.

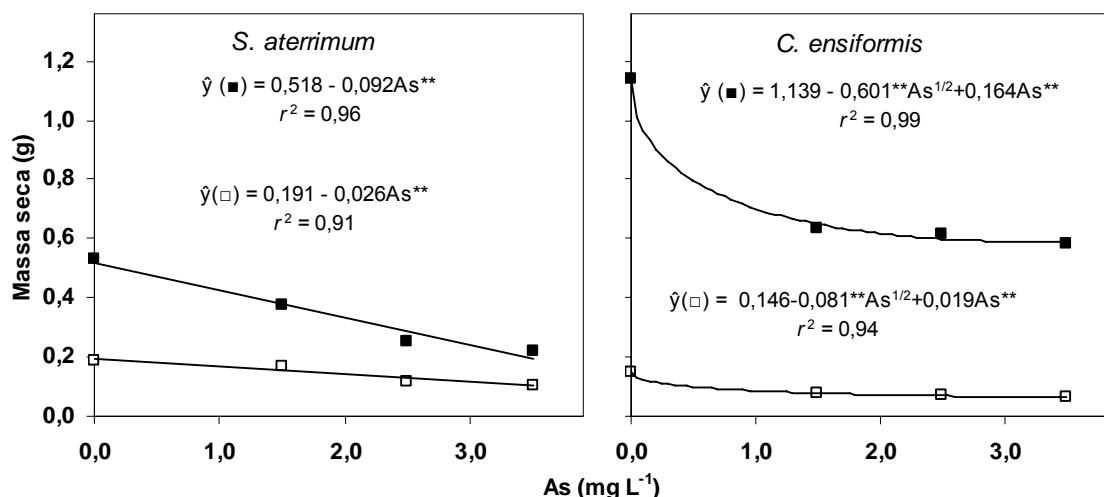


Figura 7. Massa seca da parte aérea (■) e raízes (□) nas espécies *S. aterrimum* e *C. ensiformis* após cinco dias de exposição ao As em solução nutritiva.

A produção de massa seca das raízes de *S. aterrimum* diminuiu linearmente com o incremento da concentração de As (Figura 7). Também foi observado redução do acúmulo de massa seca em *C. ensiformis*, porém, até dose de 1,5 mg L⁻¹, com tendência de estabilização nas demais doses de As testadas, como o observado para a parte aérea.

Os resultados indicam que as raízes das plantas foram menos comprometidas pelas doses de As testadas quando comparado com a parte aérea. Contudo, o escurecimento e o aspecto gelatinoso das raízes das espécies evidenciam danos consideráveis nesta parte das plantas. A massa seca final do sistema radicular, portanto, não se mostrou bom parâmetro para a avaliação dos efeitos tóxicos do As, para o tempo experimental estudado. Aparentemente, o tempo de crescimento das plantas antes do tratamento com As deve ser aumentado para que haja maior massa seca radicular inicial das plantas.

Resultados demonstrando redução na produção de massa seca na parte aérea e nas raízes também foram encontrados para várias espécies, quando submetidas a doses

crecentes de As (Marin (1993); Kapustka *et al*, 1995; Carbonel-Barrachina *et al*, 1998a; Hartley-Whitaker *et al*, 2001).

Em função dos resultados obtidos, a concentração de As de 1,5 mg L⁻¹ foi escolhida para ser utilizada nos experimentos visando a análise dos efeitos tóxicos do As sobre os parâmetros fotossintéticos e oxidativos. O As utilizado nesta concentração impôs efeitos significativos sem, contudo, danificar severamente as plantas, especialmente para a espécie *C. ensiformis*. Concentrações maiores acarretaram murcha foliar, em função da desintegração do sistema radicular na espécie *C. ensiformis*, inviabilizando a avaliação de outros parâmetros mais sensíveis.

3.2. Efeitos do arsênio sobre parâmetros fotossintéticos

Na ausência de As, a espécie *S. aterrimum* apresentou maiores teores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides do que a espécie *C. ensiformis* (Figura 8). O tratamento das plantas com As resultou em aumento nos teores de clorofilas *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenóides na espécie *C. ensiformis*, enquanto a espécie *S. aterrimum* não apresentou alterações significativas nas variáveis.

Em concordância com os resultados observados em *C. ensiformis*, Päivöke e Simola (2001) encontraram maiores teores de clorofila *a*, *b* e totais em *Pisum sativum* submetida ao As, acompanhados pela diminuição da massa seca. Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, contudo, Stoeva e Bineva (2003) e Rahman *et al* (2007) constataram reduções nos teores de clorofilas totais e carotenóides, desencadeado pelo estresse oxidativo promovido pelo As.

Reduções dos teores de pigmentos fotossintéticos têm sido relatadas em diversos trabalhos relacionados a vários tipos de estresse, tais como o salino (Muthukumarasamy e Panneerselvam, 1997) e contaminação por metais e metalóides (Sheoran *et al*, 1990; Ciscato *et al*, 1997; Burzynski e Klobus, 2004; Stoeva *et al*, 2003; Stoeva *et al*, 2005; Chun-xi *et al*, 2007).

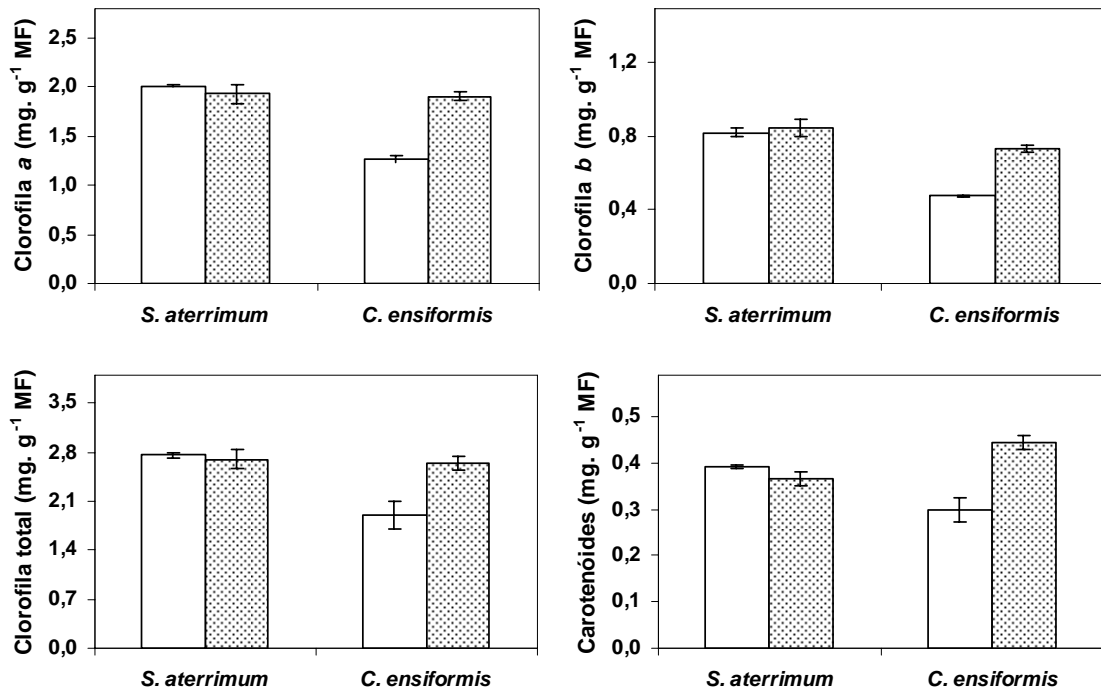


Figura 8: Teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenóides nas espécies, após cinco dias de tratamento com As (0,0 □ e 1,5 mg L⁻¹ ▣) em solução nutritiva. As barras representam o erro padrão da média.

Os maiores teores dos pigmentos fotossintéticos em *C. ensiformis* submetida ao As não foram suficientes para reverter a expressiva diminuição da massa seca observada. Isto, possivelmente, é resultante do efeito indireto do As na absorção de minerais e água, em função do comprometimento do sistema radicular.

As espécies *S. aterrimum* e *C. ensiformis* apresentaram diferenças, tanto na ausência quanto na presença de As, para todos os parâmetros de trocas gasosas medidos: taxa de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), transpiração (*E*), *C_i* (concentração interna de CO₂) e razão *C_i/C_a* (razão CO₂ interno e ambiente), conforme mostrado na figura 9.

Na ausência de As, a espécie *C. ensiformis*, de modo geral, apresentou maiores valores de *A*, *g_s*, *E* e *C_i/C_a*, mas na presença de As os efeitos desse semi-metal sobre esta espécie foram bem mais intensos, tornando os valores dessas variáveis menores que na espécie *S. aterrimum*.

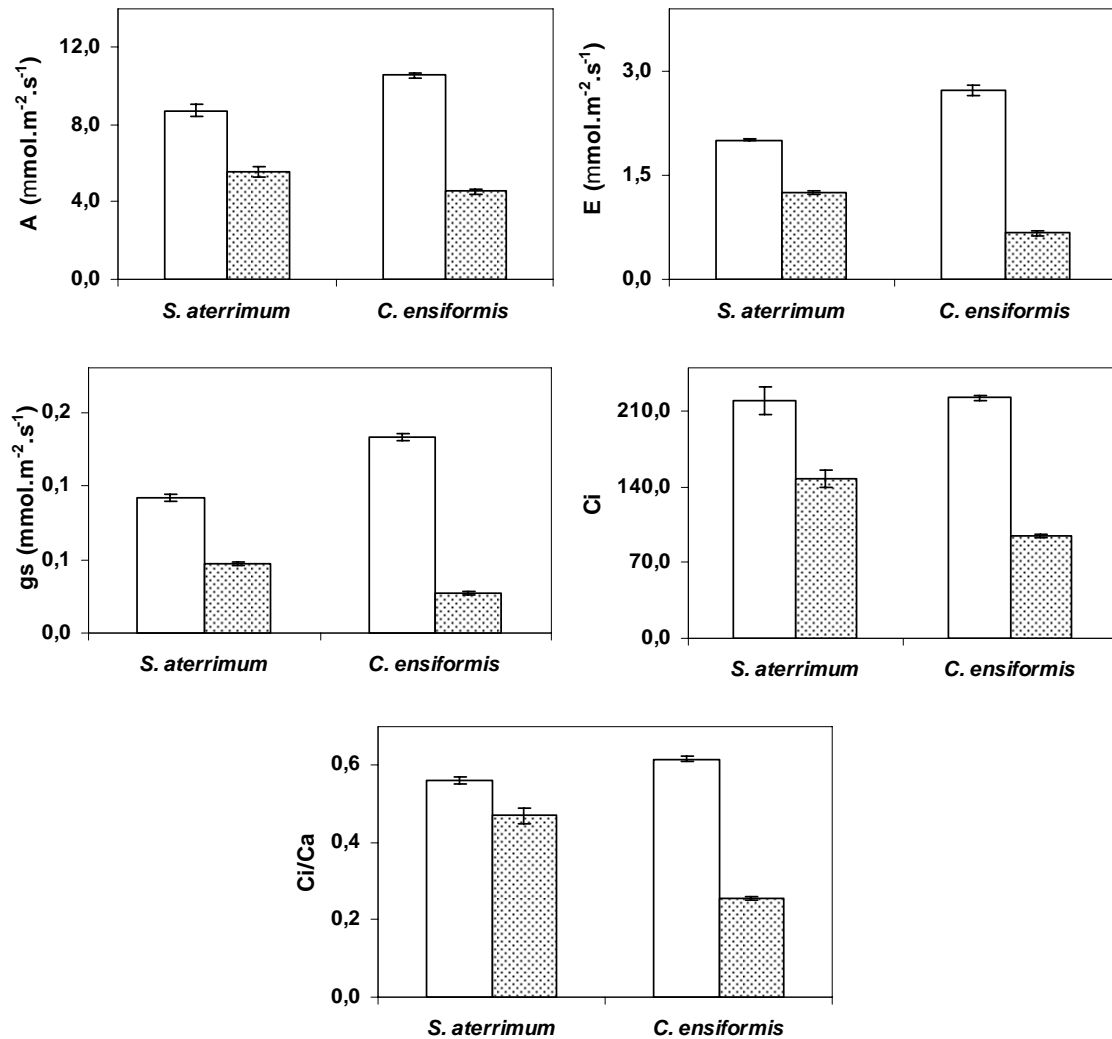


Figura 9: Taxa de assimilação de CO₂ (A), transpiração (E), condutância estomática (*g_s*), razão Ci/Ca e concentração interna de CO₂ (Ci) nas espécies em solução nutritiva, após cinco dias tratadas com As (0,0 □ e 1,5 mg L⁻¹ ▨). As barras representam o erro padrão da média.

O As teve, nas espécies *S. aterrimum* e *C. ensiformis*, respectivamente, efeito negativo sobre a taxa de assimilação de CO₂ (36 e 58%), na transpiração (38 e 75 %), na condutância estomática (49 e 79%), na relação Ci/Ca (16 e 58%) e na concentração interna de carbono (33 e 57%).

O As absorvido pelo sistema radicular reduziu a abertura estomática. Essa redução da *g_s* nas duas espécies, com maior intensidade para *C. ensiformis*, pode ser um dos primeiros efeitos tóxicos do As na taxa fotossintética e taxa transpiratória, conforme sugere Parys *et al* (1998). Provavelmente, a menor tolerância ao As demonstrada pela espécie *C. ensiformis* seja função da sua maior resistência estomática, resultando em significativas alterações nas trocas gasosas.

Em concordância com os dados obtidos neste trabalho, o As exerceu efeito negativo sobre a taxa fotossintética em *Zea mays* (Stoeva *et al*, 2003), *Oryza sativa* (Marin, 1993), *Pisum sativum* (Stoeva e Bineva, 2003) e *Phaseolus vulgaris* (Stoeva *et al*, 2005).

Os valores de F_0 e F_v/F_m nas duas espécies submetidas ao As não sofreram alterações (Figura 10).

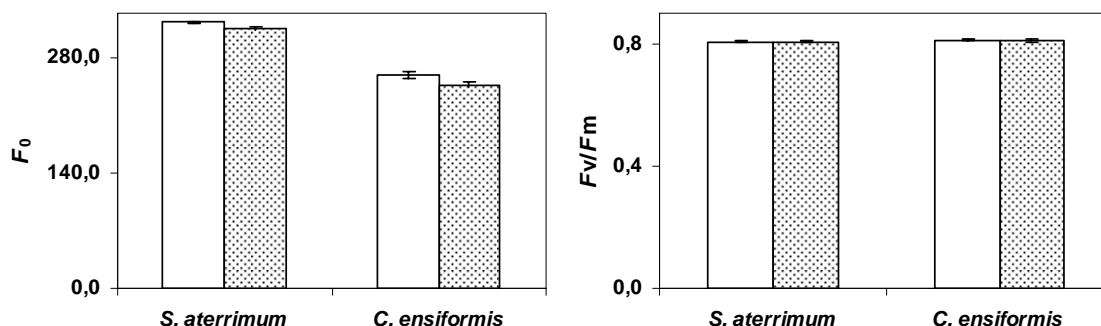


Figura 10: Relação fluorescência variável/fluorescência máxima (F_v/F_m) e fluorescência inicial (F_0) nas espécies tratadas com As ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$), em solução nutritiva após cinco dias. As barras representam o erro padrão da média.

Milivojevic *et al* (2006) observaram que o As não acarretou variações significativas nos parâmetros de fluorescência em *Glycine max* submetida ao As, conforme observado também neste trabalho.

A não alteração na relação F_v/F_m e F_0 sugere não ter havido comprometimento das membranas dos tilacóides nas espécies estudadas. Supõe-se, com base neste resultado, que o efeito tóxico do As nas membranas dos tilacóides não foi fator diretamente responsável pela redução na taxa fotossintética observada neste trabalho. Stoeva e Bineva (2003) e Stoeva *et al* (2003) relataram que a redução na taxa fotossintética, na transpiração e limitações estomáticas são decorrentes, possivelmente, do efeito do As sobre mudanças no sistema radicular. Supõe-se, portanto, que a redução da taxa fotossintética ocorra, principalmente, em função de limitações estomáticas promovidas por alterações das células do sistema radicular. O As pode ter afetado a absorção de íons e, conseqüentemente, a de água, provavelmente em função de sua ação inibitória sobre a H^+ -ATPase mitocondrial (Joshi e Hugles, 1981; Mylona *et al*, 1998; Meharg e Harttley-Whitaker, 2002), acarretando, assim, em limitações estomáticas.

O As pode ter influenciado a distribuição celular do Ca^{+2} (Li *et al*, 2006) e ABA (Parys *et al*, 1998), promovendo a redução na condutância estomática e, em

conseqüência, comprometendo as trocas gasosas. Com a redução da fixação de carbono, decorrente do aumento da resistência estomática, pode ocorrer excesso de energia (ATP) e poder redutor (NADPH), desviando o transporte de elétrons e, conseqüentemente, promovendo a produção de ROIs em excesso (Sunkar *et al*, 2003), os quais, se não removidos, podem comprometer as funções celulares.

Houve redução da área foliar para as duas espécies estudadas quando submetidas ao As (Figura 11). A redução de área foliar em função do tratamento com As foi observada, também, por outros autores, como Marin (1993), Bussotti *et al* (1996) e Stoeva *et al* (2005).

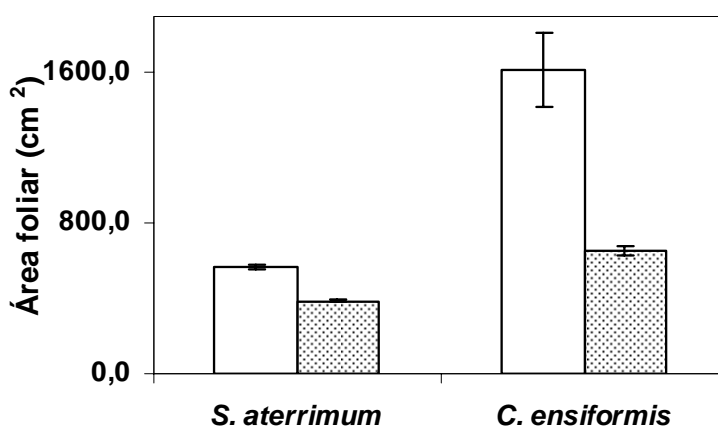


Figura 11: Área foliar nas espécies após cinco dias de tratamento com As (0,0 \square e 1,5 mg L⁻¹ \boxtimes), em solução nutritiva. As barras representam o erro padrão da média.

A espécie *S. aterrimum* apresentou redução da área foliar de 34%, enquanto *C. ensiformis* teve redução de 59%, indicando ser essa última espécie, menos tolerante ao As.

3.3. Efeitos do As na peroxidação de lipídios e nas atividades de enzimas antioxidativas

Na ausência de As, observou-se nas raízes de *S. aterrimum* atividade de SODs muito mais elevada que em *C. ensiformis*, mas nas folhas elas não diferiram entre si (Figura 12).

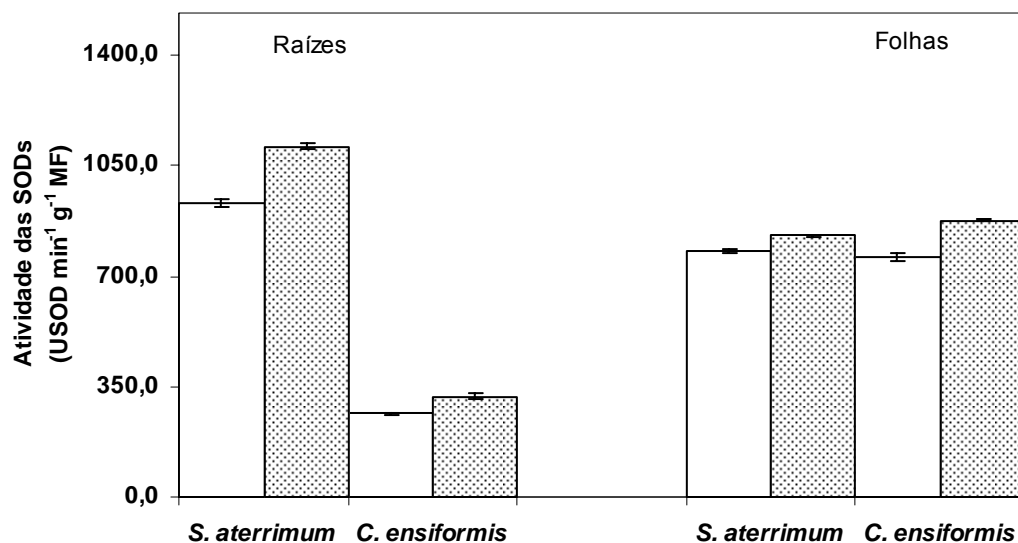


Figura 12: Atividade das dismutases do superóxido (SODs) nas raízes e nas folhas das espécies após cinco dias tratadas com As (0,0 □ e 1,5 mg L⁻¹ ▣) em solução nutritiva. As barras representam o erro padrão da média.

A exposição das plantas ao As resultou em aumentos significativos na atividade de SODs, tanto nas raízes quanto nas folhas de ambas as espécies. Em *C. ensiformis*, o aumento na atividade de SODs nas raízes foi de 21% e em *S. aterrimum* de 19%. Nas folhas, o aumento foi de 15 e 6% em *C. ensiformis* e *S. aterrimum*, respectivamente.

Semelhante ao observado neste trabalho, o aumento na atividade de SODs tem sido relatado para diversas espécies vegetais expostas ao As, como *Zea mays* (Mylona *et al*, 1998), *Holcus lanatus* (Hartley-Whitaker *et al*, 2001), *Trifolium pratense* (Mascher *et al*, 2002), *Pteris vittata* (Cao e Ma, 2004) e *Phaseolus aureus* (Singh *et al*, 2007).

As SODs constituem a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo nas células, catalisando a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir do radical superóxido (O₂⁻) (Gratão *et al*, 2005). O aumento da atividade das SODs indica ter ocorrido aumento na produção de O₂⁻ após tratamento das plantas com As. O maior aumento na atividade desta enzima em *C. ensiformis* indica que o estresse oxidativo induzido pelo As foi maior nesta espécie, especialmente nas folhas.

Apenas a atuação das SODs parece não ser suficiente para manutenção da homeostase celular frente à produção de ROIs, uma vez que o subproduto de sua ação é H₂O₂, também tóxico. É, portanto, necessária a participação conjunta de outras enzimas capazes de degradar o H₂O₂ (Apel e Hirt, 2004).

Na ausência de As, *S. aterrimum* apresentou maior atividade das POXs do que *C. ensiformis*, especialmente nas raízes (Figura 12).

Em *S. aterrimum* houve decréscimo de 27 e 24% na atividade de POXs nas raízes e folhas, respectivamente, quando tratada com As. Em *C. ensiformis*, por sua vez, observou-se incrementos da atividade de POX de 11% nas raízes e 137% nas folhas.

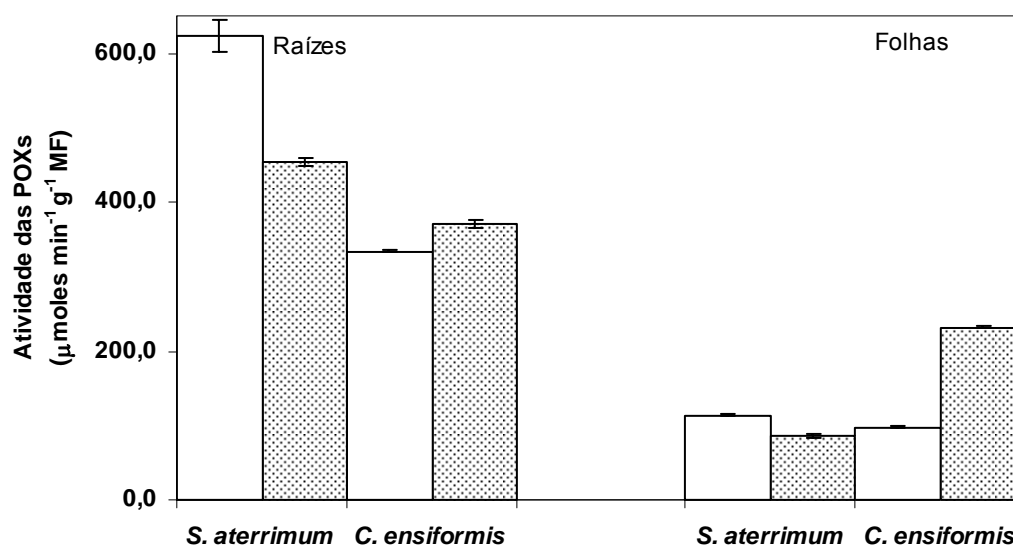


Figura 13: Atividade das peroxidases (POXs) nas raízes e nas folhas das espécies, após cinco dias tratadas com As (0,0 \square e 1,5 mg L⁻¹ \boxtimes) em solução nutritiva. As barras representam o erro padrão da média.

O aumento na atividade de POXs observado em plantas de *C. ensiformis* submetidas a elevada concentração de As tem sido observado em outras espécies, como *Trifolium pratense* (Mascher *et al*, 2002), *Pteris vittata* (Cao e Ma, 2004), *Solanum lycopersicum* (Miteva *et al*, 2005) e *Phaseolus vulgaris* (Stoeva *et al*, 2005) e indica ser esta enzima importante componente do mecanismo de proteção contra o excesso de H₂O₂ nesta espécie.

A redução na atividade de POXs observada na espécie *S. aterrimum* indica que o estresse oxidativo ultrapassou a capacidade de tolerância das plantas, resultando em inibição enzimática. A inativação desta enzima pode se dar pela ligação do As aos seus grupos tióis (-SH) (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002), ou via oxidação (Dietz, 2003). Em função dessa redução na atividade das POXs em *S. aterrimum* admite-se que outras enzimas e, ou processos precisam ser ativados para remoção do excesso de H₂O₂ nesta espécie (Cao e Ma 2004).

Na ausência de As observou-se maior atividade de GRs em *C. ensiformis* do que em *S. aterrimum*, tanto nas raízes quanto nas folhas (Figura 12). Na presença de As, a atividade das GRs nas raízes aumentou 257% e 54% nas espécies *S. aterrimum* e *C.*

ensifformis, respectivamente. Nas folhas, a atividade das GRs aumentou 23% em *C. ensiformis*, mas reduziu 39% em *S. aterrimum*.

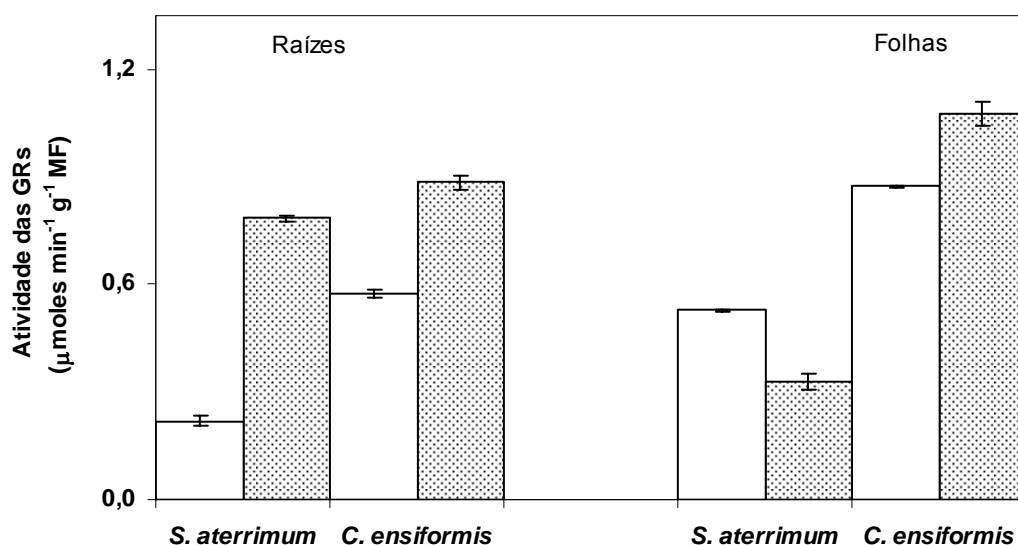


Figura 14: Atividade das redutases da glutationa (GRs) nas raízes e nas folhas das espécies após cinco dias tratadas com As (0,0 \square e 1,5 mg L⁻¹ \boxtimes) em solução nutritiva. As barras representam o erro padrão da média.

Em folhas de *Brassica juncea* foi observado aumento da atividade de GRs com o tempo de exposição a duas concentrações de As (Khan *et al*, 2008). Para as duas concentrações de As estudadas a atividade da enzima foi sempre maior do que nas plantas controle. A exposição de *Ceratophyllum demersum* ao As mostrou que a resposta das plantas depende de uma combinação da concentração do metal e do tempo de exposição. Em plantas tratadas com As até 50 μ M durante até 7 dias foram observados aumentos na atividade das GRs conforme se observou em *C. ensiformis*. Sob concentrações mais elevadas ou tempos de exposição mais extensos foram observadas reduções na atividade das GRs, conforme observado em *S. aterrimum* (Mishra *et al*, 2008).

As GRs apresentam a função de manter os teores tissulares de glutathiona reduzida (GSH), fundamental para o funcionamento do ciclo ascorbato-glutathiona associado ao mecanismo de tolerância das plantas ao estresse oxidativo (Mittler, 2002). O incremento da atividade de GRs observado neste trabalho indica ter havido aumento na produção de ROIs promovido pelo As e sugere ser esta enzima importante componente do sistema de defesa antioxidativo das duas espécies, especialmente em *C. ensiformis*.

A diferença apresentada entre as espécies, para a atividade desta enzima nas folhas, pode ter sido função dos maiores teores de As translocados em *S. aterrimum*

conforme se observa na Figura 1. A maior concentração de As nesta parte da planta pode ter contribuído para a formação de elevados níveis de conjugados GS-As, os quais possuem forte ação inibitória sobre as GRs (Foyer *et al*, 1997). Outra hipótese para explicar a redução na atividade em *S. aterrimum* seria a inativação desta enzima via oxidação ou pela ligação do As aos seus grupos SH (Dietz, 2003; Meharg e Hartley-Whitaker, 2002).

As plantas submetidas ao tratamento com As sofreram acréscimos significativos nos níveis de malondialdeído (MDA) (Figura 15). Em *S. aterrimum* houve incremento de 81 e 59% no sistema radicular e nas folhas, respectivamente, e em *C. ensiformis* observou-se incremento de 30% para raízes e 47% para folhas. A peroxidação de lipídios na espécie *S. aterrimum* foi sempre maior do que em *C. ensiformis*.

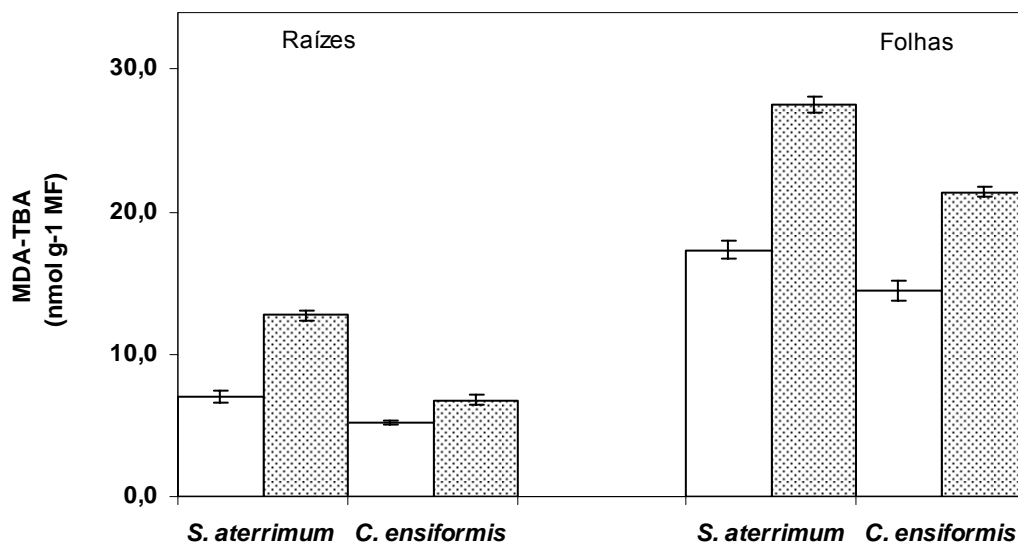


Figura 15: Produção de MDA-TBA nas raízes e nas folhas das espécies após cinco dias de exposição ao As (0,0 \square e 1,5 mg L⁻¹ \square) em solução nutritiva. As barras representam o erro padrão da média.

O estresse promovido pelo As aumentou a peroxidação de lipídios nas duas espécies estudadas. Trabalhos recentes demonstraram que o As desencadeou aumento na peroxidação de lipídios em *Pteris* sp (Singh *et al*, 2006), *Phaseolus vulgaris* (Stoeva *et al*, 2005), *Phaseolus aureus* (Singh *et al*, 2007) e *Avena sativa* (Stoeva e Bineva, 2003). Este incremento na peroxidação de lipídios indica que a toxicidade promovida pelo As resulta no aumento da produção de ROIs (Cakmak e Horst, 1991). Adicionalmente, admite-se que o As potencializa ou facilita a peroxidação de lipídios pela desorganização da estrutura das membranas (Stoeva e Bineva, 2003), uma vez que as membranas celulares

representam um dos principais locais de ação dos elementos tóxicos, incluindo o As (Meharg, 1993).

O aumento nos teores de MDA indica a ocorrência de danos às membranas devido à peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Montillet *et al*, 2005). No presente estudo o aumento nos teores de MDA em resposta ao As parece não ter sido suficiente para comprometer as membranas dos tilacóides (Figura 10) e, tampouco, os teores de pigmentos fotossintéticos (Figura 8). Ao contrário do observado neste trabalho, Li *et al* (2005) verificaram danos nas estruturas das membranas dos cloroplastos, ocasionando desintegração celular, em concentrações elevadas de As no solo.

As mudanças nas atividades das enzimas analisadas e os resultados de peroxidação de lipídios indicam que os mecanismos antioxidativos avaliados podem ter sido ligeiramente mais eficientes em *C. ensiformis* do que em *S. aterrimum*. Contudo, a espécie *S. aterrimum*, mesmo apresentando maior incremento de MDA na parte aérea e nas raízes, parece ter contornado os danos decorrentes do estresse oxidativo de forma mais eficiente do que *C. ensiformis*, de acordo com os dados do teor de massa seca e dos parâmetros fotossintéticos. Vale ressaltar que nas folhas, apesar do aumento expressivo no teor de MDA, não se observou reduções no conteúdo de pigmentos fotossintéticos em função de estresse oxidativo, provavelmente pelo curto período de exposição ao As nas duas espécies.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, avaliou-se a absorção e a distribuição do As, bem como seus efeitos sobre a produção de massa seca, processos fisiológicos e parâmetros oxidativos nas espécies *Canavalia ensiformis* e *Stizolobium aterrimum*. O teor de As na parte aérea e no sistema radicular das espécies aumentou significativamente com o incremento da concentração de As na solução nutritiva, especialmente em *C. ensiformis*. O menor acúmulo de As em *S. aterrimum* pode estar relacionado à maior tolerância desta espécie. Houve murcha foliar na espécie *C. ensiformis*, nas doses 2,5 e 3,5 mg L⁻¹ de As, mas o mesmo não foi verificado para a espécie *S. aterrimum*. No sistema radicular, ambas as espécies apresentaram sintomas de toxidez, sendo que a espécie *S. aterrimum* sofreu escurecimento e aumento do diâmetro das raízes laterais, enquanto *C. ensiformis* apresentou amarelecimento das raízes na dose 1,5 mg L⁻¹; nas demais doses, o comprometimento foi acentuado, havendo desintegração do sistema radicular. Houve redução de pêlos radiculares e no teor de massa nas duas partes das plantas das duas espécies. O tratamento com As resultou em aumento significativo nos teores de clorofilas e carotenóides em *C. ensiformis*, enquanto em *S. aterrimum* não houve alteração nessas variáveis. Por outro lado, foram observadas reduções na taxa de assimilação de CO₂, na transpiração (E), na condutância estomática (g_s), na relação Ci/Ca e na concentração interna de carbono (Ci) nas duas espécies, mas com maior intensidade em *C. ensiformis*. Os valores de F_0 e F_v/F_m em ambas as espécies não sofreram alterações. A exposição das plantas ao As resultou em aumento na atividade de SODs, tanto nas raízes quanto nas folhas, nas duas espécies. A atividade das peroxidases (POXs) reduziu nas raízes e folhas da espécie *S. aterrimum* em tratamento com As, enquanto para *C. ensiformis* a atividade aumentou, tanto nas raízes quanto nas folhas. Na presença de As, a atividade das GRs aumentou nas raízes nas duas espécies analisadas, mas com maior intensidade na espécie *S. aterrimum*. Nas folhas, entretanto, a atividade das GRs aumentou na espécie *C. ensiformis*, mas reduziu em *S. aterrimum*. A peroxidação de lipídios aumentou nas raízes e nas folhas das espécies quando submetidas ao tratamento com As. A espécie *S. aterrimum* apresentou maior peroxidação de lipídios, tanto em raízes quanto em folhas com a exposição ao As. De modo geral, com base na peroxidação de lipídios e nas

atividades das enzimas antioxidativas, tanto nas raízes como nas folhas, conclui-se que a espécie *C. ensiformis* apresenta mecanismo de defesa enzimático sobre os ROIs ligeiramente mais eficiente do que *S. aterrinum*. Apesar disto, *S. aterrinum* parece ter contornado os danos decorrentes do estresse oxidativo de forma mais eficiente do que *C. ensiformis*, uma vez que apresentou menor resistência estomática, maior taxa fotossintética. O grau de comprometimento promovido pelo As em relação à indução de ROIs é característica espécie-específica. Assim, a espécie *S. aterrinum* foi considerada mais tolerante aos efeitos tóxicos promovidos pelo As neste estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDIN MDJ, MEHARG AA (2002) Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil** 243:57-66.
- ANDERSON LS, WALSH MM (2007) Arsenic uptake by common marsh fern *Thelypteris palustris* and its potential for phytoremediation. **Science of the Total Environment** 379:263-265.
- ANDERSON ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology** 113:548-555.
- APEL K, HIRT H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Plant Biology** 55:373-399.
- ASADA, K. (1992) Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum** 85:235-241.
- BAHATTACHARYA A, BAHATTACHARYA S (2007) Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: Involvement of peroxisomes. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 66:178-187.
- BARRA CM, SANTELLI RE, ABRÃO JJ, GUARDIA ML (1999) Especificação de Arsênio - Uma Revisão. **Química nova** 23: 58-70.
- BLEEKER PM, SCHAT H, VOOIJS R, VERKLEIJ JAC, ERNST WHO (2003) Mechanisms of arsenate tolerance in *Cytisus striatus*. **New Phytologist** 157:33-38.
- BJÖRKMAN O, DEMMIG B (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta** 170:489-504.
- BURZYNSKI M, KLOBUS G (2004) Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. **Photosynthetica** 42:505-510.
- CAIA Y, SU J, MA L (2003) Low molecular weight thiols in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* upon exposure to arsenic and other trace elements. **Environmental Pollution** 129: 69-78.
- CAILLE N, SWAMWICH S, ZHAO FJ, McGRATHMcGrath SP (2004) Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* from arsenic contaminated soils and the effect of liming and phosphate fertilization. **Environmental Pollution** 132:113-120.

- CAKMAK W, HORST J (1991) Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum** 83:463-772.
- CAO X, MA LQ (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator *Chinese brake fern* (*Pteris vittata* L.). **Environmental Pollution** 128:317-325.
- CARBONELL-BARRACHINA AA, AARABI MA, DELAUNE RD, GAMBRELL RP, PATRICK Jr WH (1998a) Arsenic in wetland vegetation: Availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. **The Science of the Total Environment** 217:189-199.
- CARBONELL-BARRACHINA AA, AARABI MA, DELAUNE RD, GAMBRELL RP, PATRICK WH Jr (1998b) The influence of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration. **Plant Soil** 198:33-43.
- CARBONELL-BARRACHINA AA, BURLÓ F, HERNÁNDEZ AB, LÓPEZ E, MATAIX J (1997) The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. **Scientia Horticulturae** 71:167-176.
- CARLBERG I, MANNERVIK B (1985) Glutathione reductase. **Methods in Enzymology** 113: 484-495.
- CHANCE B, MAEHLEY AC (1955) Assay of catalase and peroxidases. **Methods in Enzymology** 11: 764-775.
- CHUN-XI L, SHU-LI F, YUN S, LI-NA J, XU-YANG L, XIAO-LI H (2007) Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. **Journal of Environmental Sciences** 19: 725-732.
- CISCATO M, VALCKE R, LOVEN KV, CLIJSTERS H, NAVARI-IZZO F (1997) Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. **Physiologia Plantarum** 100:901-908.
- CLARK RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 23:458-460.
- DEL LONGO OT, GONZÁLEZ A, PASTORI GM, TRIPPI VS (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology** 34:1023-1028.
- DEMIRAL T, TÜRKAN Í (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany** 53:247-257.
- DIETZ RLM (2003) Plant peroxiredoxins. **Plant Biology** 54:93-107.

- DUAN G-L, ZHU Y-G, TONG Y-P, CAI C, KNEER R (2005) Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of *Chinese Brake* fern, an arsenic hyperaccumulator. **Plant Physiology** 138:461-469.
- ELLIS DR, GUMAELIUS L, INDRIOLO E, PICKERING IJ, BANKS JA, SALT DE (2006) A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. **Plant Physiology** 141:1544-1554.
- FANG WC, WANG J, LIN CC, KAO CH (2001) Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation** 35:75-80.
- FOYER CH, HALLIWELL B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta** 133:21-25.
- FOYER CH, LOPEZ-DELGADO H, DATE JF, SCOTT IM (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum** 100:241-254.
- GIANNOPOLITIS CN, RIES SK (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59:309-314.
- GRATÃO PL, POLLE A, LEA PJ, AZEVEDO AR (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology** 32:481-494.
- HARTLEY-WHITAKER J, AINSWORTH G, MEHARG AA (2001) Copper and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. **Plant Cell Environmental** 24:713-722.
- HARTLEY-WHITAKER J, MEHARG AA (2002) Arsenic uptake and metabolism arsenic resistant and nonresistant species. **New Phytologist** 154:29-43.
- HARTLEY-WHITAKER J, WOODS C, MEHARG AA (2002) Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*. **New Phytologist** 155:219-225.
- HEATH RL, PACKER L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 125:189-198.
- HUGHES MF (2002) Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. **Toxicology Letters** 33:1-16.
- ISRAR M, SAHI AV, JAIN J (2006) Cadmium accumulation and antioxidative responses in the *Sesbania drummondii* callus. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 50:121-127.
- JAIN M, GRADE RP (2004) Inhibition of 5-amino levulinic acid dehydratase activity by arsenic in excised etiolated maize leaf segments during greening. **Journal of Plant Physiology** 161:251-255.

- JOSHI S, HUGHES JB (1981) Inhibition of coupling factor B activity by cadmium ion, arsenite-2,3-dimercaptopropanol, and phenylarsine oxide. **Journal of Biological Chemistry** 256:11112-11116.
- KAPUSTKA LA, LIPTON J, GALBRAITH H, CAELA D, LEJEUNE K (1995) Metallic and arsenic impacts to soils, vegetation communities and wildlife habitat in southwest Montana uplands contained by smelter emissions: II. Laboratory phytotoxicity studies. **Environmental Toxicology Chemistry** 14:1905-1912.
- KHAN I, AHMAD A, IQBAL M (2008) Modulation of antioxidant defense system of arsenic detoxification in Indian mustards. **Ecotoxicology and Environmental Safety** *in press*.
- LI RS, DANIELS WL (1994) Nitrogen accumulation and mine soils. **Journal of Environmental Quality** 23:166-172.
- LI Y, DHANKHER OP, CARREIRA L, LEE D, CHEN A, SCHROEDER JI, BALISH RS, MEAGHER RB (2004) Overexpression of phytochelatase in *Arabidopsis* leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity. **Plant Cell Physiology** 45:1787-1797.
- LIAO X-Y, CHEN T-C, XIE H, LIU Y-R (2005) Soil As contamination and its assessment in areas near the industrial districts of Chenzhou City, Southern China. **Environment International** 31:791-798.
- 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 HK (1987) Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L. Douce, R. (Eds.) **Methods in Enzymology** 148:350-381.
- MACHLIS LM (1941) Accumulation of arsenic in the shoots of Sudan grass and Bush bean. *Plant Physiology* 16:521-544.
- MANDAL BK, SUZUKI KT (2002) Arsenic round the world: a review. **Talanta** 58:201-235.
- MARIN AR (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. **Journal of Plant Nutrition** 16:865-880.
- MASCHER R, LIPPMANN B, HOLZINGER S, BERGMANN H (2002) Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. **Plant Science** 163:961-969.
- MATSCHULLAT J (2000) Arsenic in the geosphere - a review. **The Science of the Total Environment** 249:297-312.

- MEHARG AA, MACNAIR MR (1990) An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. **New Phytologist** 116:29-35.
- MEHARG AA, MACNAIR MR (1991) The mechanisms of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L) Beauv. and *Agrostis capillaries* L. Adaptation of the arsenate uptake system. **New Phytologist** 119:291-297.
- MEHARG AA (1993) The role of plasmalemma in metal tolerance in angiosperms: Minireview. **Physiologia Plantarum** 88:191-198.
- MEHARG AA, HARTLEY-WHITAKER J (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist** 154:29-43.
- MELONI DA, OLIVA MA, MARTINEZ CA, Cambraia J (2002) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany** 49:69-76.
- MILIVOJEVIC DB, NIKOLIC BR, DRINIC G (2006) Effect of arsenic on phosphorus content in different organs and chlorophyll fluorescence in primary leaves of soybean. **Biologia Plantarum** 50:149-151.
- MIRLEAN N, ANDRUS VE, BAISCH P, GRIEP G, CASARTELLI MR (2003) Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. **Marine Pollution Bulletin** 46:1480-1484.
- MISHRA S, SRIVASTAVA S, TRIPATHI RD, GOVINDARAJAN R, KURIAKOSE SV, PRASAD MNV (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, TRIPATHI RD, TRIVEDI PK (2008) Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. **Aquatic Toxicology** 86:205-215.
- MITTLER R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Plant Science** 7: 405-410.
- MITEVA E, HRISTOVA D, NENOVA V, MANEVA S (2005) Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. **Scientia Horticulturae** 105:343-358.
- MONTILLET J-L, CHAMNOGPOL S, RUSTÉRUCCI C, DAT J, VAN DE COTTE B, AGNEL J-P, BATTISTI C, INZÉ D, VAN BF, TRIANTAPHYLIDES C (2005) Fatty acid hypersensitive and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. **Plant Physiology** 138:1516-1526.
- MUTHUKUMARASAMY M, PANNEERSELVAM R (1997) Amelioration of NaCl stress by triadimefon in peanut seedlings. **Plant Growth Regulation** 22:157-162.
- MYLONA PV, POLIDOROS AN, SCANDALIOS JG (1998) Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. **Free Radical Biology e Medicine** 25: 576-585.

- PÄIVÖKE AEA, SIMOLA LK (2001) Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 49:111-121.
- PARYS E, ROMANOWSKA E, SIEDLECKA M, POSKUTA JW (1998) The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. **Acta Physiologiae Plantarum** 20:313-322.
- PILON-SMITS E (2005) Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology** 56:15-39.
- PEIXOTO PHP, CAMBRAIA J, SANT'ANA R, MOSQUIM PR, MOREIRA MA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 11:137 – 143.
- PIRES FR, PROCÓPIO SO, SOUZA CM, SANTOS JB, SILVA GP (2006) Adubos verdes na fitorremediação de solos contaminados com herbicida tebuthiuron. **Caatinga** 19:92-97.
- PROCÓPIO SO, SANTOS JB, SILVA AA, PIRES FR, RIBEIRO JJI, SANTOS EA (2005) Potential of Plant Species for Remediation of Trifloxysulfuron-Sodium. **Planta Daninha** 23: 9-16.
- QUAGHEBEUR M, RENGEL Z (2003) The distribution of arsenate and arsenite in shoots and roots of *Holcus lanatus* is influenced by arsenic tolerance and arsenate and phosphate supply. **Plant Physiology** 132:1601-1609.
- RAHMAN MA, HASEGAWA H, RAHMAN MM, ISLAM MN, MIAH MAM, TASMEN A (2007) Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. **Chemosphere** 67:1072-1079.
- 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.
- REINA SV, ESTEBAN E, GOLDSBROUGH P (2005) Arsenate-induced phytochelatins in white lupin: influence of phosphate status. **Physiologia Plantarum** 124:41-49.
- SALT DE, SMITH RD, RASKIN I (1998) Phytoremediation. **Plant Physiology** 49:643-668.
- SANZ-MUÑOZ M, MÉNDEZ-MARCO M, MARCO-MÉNDEZ MT (1982) Acid d-aminolevulínico dehidrasa em semilla de *Pinus pinea* germinada. **Revista Española de Fisiologia** 38:91-96.
- SANTOS EA, SANTOS JB, FERREIRA LR, COSTA MD, SILVA AA (2007) Phyto-Stimulation by *Stizolobium aterrimum* as Remediation of Soil Contaminated with Trifloxysulfuron-Sodium. **Planta Daninha** 25:259-265.

- SHA GA, ALI MA (2007) Dynamics of arsenic in agricultural soils irrigated with arsenic contaminated groundwater in Bangladesh. **The Science of the Total Environmental** 379:180-190.
- SHAIBUR MR, KITAJIMA N, SUGAWARA R, KONDO T, HUQ SMI, KAWAI S (2006) Physiological and mineralogical properties of arsenic-induced chlorosis in rice seedlings grown hydroponically. **Soil Science and Plant Nutrition** 52:691-700.
- SHALATA A, TAL M (1998) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. **Physiologia Plantarum** 104:169-174.
- SHEORAN IS, SINGAL HR, SINGH R (1990) Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Photosynthesis Research** 23:345-351.
- SILVA SR, PROCÓPIO SO, QUEIROZ TFN, DIAS LE (2004) Caracterização de rejeito de mineração de ouro para avaliação de solubilização de metais pesados e arsênio e revegetação local. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 28:189-196.
- SINGH HP, BATISH DR, KOHLI RK, 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 Regulation** 53:65-73.
- SINGH N, MA LQ, SRIVASTAVA M, RATHINASABAPATHI B (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. **Plant Science** 170:274-282.
- SMITH AH, LOPIPERO PA, BATES MN, STEINMAUS CM (2002) Public Health. Arsenic epidemiology and drinking water standards. **Science** 296: 2145-2146.
- STOEVA N, BEROVA M, ZLATEV Z (2003) Physiological response of maize to arsenic contamination. **Biologia Plantarum** 47:449-452.
- STOEVA N, BEROVA M, ZLATEV Z (2005) Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. **Biologia Plantarum** 49:293-296.
- STOEVA N, BINEVA T (2003) Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. **Bulgarian Journal of Plant Physiology** 29:87-95.
- SUN Y, ZHOU Q, DIAO C (2008) Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. **Technology Bioresource** 99:1103-1110.
- SUNKAR R, BARTELS D, KIRCH H-H (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. **The Plant Journal** 35:452-464.

- TU C, MA LQ (2002) Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. **Journal of Environmental Quality** 31:641-647.
- TU S, MA LQ (2003) Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. **Environmental and Experimental Botany** 00:1-9.
- VAN DEN BROECK K, VENDECASTEELE C, GEUNS JMC (1998) Speciation by liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry of arsenic in mung bean seedlings used as a bio-indicator for arsenic contamination. **Analytical Chemistry Acta** 361:101-111.