

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

Jefferson Luiz Antunes Santos

**ESTUDOS PRELIMINARES DA UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NA
ATENUAÇÃO DA FITOTOXIDEZ POR ARSÊNIO**

UNAÍ-MG

2020

Jefferson Luiz Antunes Santos

**ESTUDOS PRELIMINARES DA UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NA
ATENUAÇÃO DA FITOTOXIDEZ POR ARSÊNIO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss

Coorientador: Prof. Dr. Jader Galba Busato

UNAÍ-MG

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237e

Santos, Jefferson Luiz Antunes.

Estudos preliminares da utilização de substâncias húmicas na atenuação da fitotoxidez por arsênio / Jefferson Luiz Antunes Santos, 2020.

90 p.

Orientador: Leonardo Barros Dobbss

Tese (Doutorado – Pós-Graduação em Produção Vegetal - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Fitorremediação. 2. Elementos-traço. 3. Bioestimulantes. 4. Húmus. 5. Enzimas. I. Dobbss, Leonardo Barros. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 631.4

JEFFERSON LUIZ ANTUNES SANTOS

**Estudos preliminares da utilização de substâncias húmicas na
atenuação da fitotoxidez por arsênio**

Tese apresentada ao DOUTORADO
EM PRODUÇÃO VEGETAL, nível de
DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM PRODUÇÃO VEGETAL

Orientador (a): Prof. Dr. Leonardo
Barros Dobbss

Data da aprovação : 28/02/2020



Prof. Dr. LEONARDO BARROS DOBBS - UFVJM



Prof. Dr. FABRÍCIO DA SILVA TERRA - UFVJM



Prof. RODRIGO DE ALMEIDA HERINGER - UFG



Prof. UIDEMAR MORAIS BARRAL - UNB

DIAMANTINA

DEDICO

Aos meus pais João Luiz dos Santos e Lourdes Antunes Santos, e ao meu irmão Filipe Antunes Santos, que sempre me apoiaram e incentivaram.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) pela oportunidade de realização do curso, contribuição à minha formação acadêmica e especialmente ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) pela oportunidade de afastamento das atividades docentes.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao Laboratório de Química do Solo, os quais me acolheram durante a realização dos experimentos.

Ao prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss, pela orientação, confiança e amizade.

Ao prof. Dr. Jader Galba Busato, pelos ensinamentos, condições de realização do trabalho e amizade.

Aos amigos e colegas do ICA e do Departamento de Agronomia (DAG) da UFVJM, da UnB, UVV e Embrapa Hortaliças pelo apoio na realização dos trabalhos.

O presente trabalho foi realizado com recursos financeiros oriundos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Processo: CBB - PPM-00286-17) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processos: 303803/2015-0 e 405552/2018-1).

RESUMO

O arsênio (As) representa grande risco ambiental e sua fitorremediação tem sido apontada como uma boa técnica para recuperação de ambientes contaminados. Dentro desse ponto de vista, as substâncias húmicas (SH) podem ser utilizadas para amenizar a toxidez por As, contribuindo em sistemas de fitorremediação. O objetivo geral deste trabalho de tese foi avaliar se SH isoladas de vermicomposto apresentam capacidade de amenizar a fitotoxidez de As e aumentar sua fitoextração, utilizando-se eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora* Hill & Johnson) e milho (*Zea mays* L.) como plantas indicadoras. Neste sentido foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos: (1) Avaliar se SH podem modificar a arquitetura do sistema radicular, estimular o crescimento, aumentar a robustez e aliviar o estresse promovido pelo As em *C. citriodora*; (2) Verificar se há atenuação de estresses nutricionais e fisiológicos promovidos pelo As em plantas de milho, aumentando seu potencial de fitoextração; (3) Estudar os efeitos das SH na amenização dos efeitos tóxicos do As sobre a bioenergética de plântulas de milho, no âmbito da extrusão radicular de H⁺ e da atividade de enzimas do estresse oxidativo. Foram realizados três experimentos, sendo o primeiro com plantas *C. citriodora* e os demais com *Z. mays*. Os experimentos foram precedidos de ensaios para determinação da melhor concentração-resposta de SH e da concentração tóxica por As e então foram aplicados os tratamentos: Controle, SH, As e As+SH acompanhados de solução nutritiva. No primeiro trabalho foi observado que SH apresentaram capacidade de modificar a arquitetura do sistema radicular, a biomassa, a robustez e aliviar os efeitos danosos do As ao crescimento. No segundo, SH aumentaram a fitoextração de As e atenuaram seu estresse. A taxa de fotossíntese sofreu redução pelo estresse por As e foi atenuado pela ação das SH. A condutância estomática e eficiência do uso da água também sofreram reduções pelo estresse por As, mas não foram atenuadas pelo tratamento com SH. A concentração interna de CO₂ aumentou com o estresse por As e foi amenizada pela ação das SH. As elevações das concentrações de P, Fe, Cu, Mn e Ni promovidas em resposta ao estresse por As, foram atenuadas pela ação das SH. As plantas tratadas com SH apresentaram menores concentrações de As, mas, como em contrapartida aumentaram a biomassa, pode-se afirmar que a fitoextração aumentou. No terceiro, foi observado que SH alteraram a bioenergética. Os efeitos do As (extrusão radicular de H⁺ e da atividade das enzimas do estresse oxidativo) foram aliviados pelas SH. As evidências experimentais obtidas com os resultados deste trabalho de tese evidenciaram que SH apresentaram capacidade de amenizar a fitotoxidez de As e também aumentar sua fitoextração.

Palavras-chave: Fitorremediação • elementos-traço • bioestimulantes • húmus • enzimas.

ABSTRACT

Arsenic (As) has a high environmental risk and its phytoremediation has been identified as a good technique for recovering contaminated environments. Within this point of view, humic substances (HS) can be used to mitigate toxicity by As, contributing to phytoremediation systems. The general objective of this thesis work was to evaluate whether HS isolated from vermicompost have the capacity to reduce As phytotoxicity and increase its phytoextraction, using citriodora eucalyptus (*Corymbia citriodora* Hill & Johnson) and corn (*Zea mays* L.) as indicator plants. In this sense, the following specific objectives were developed: (1) Evaluate if SH can modify the architecture of the root system, stimulate growth, increase robustness and relieve stress caused by As in *C. citriodora*; (2) Check for attenuation of nutritional and physiological stresses promoted by As in corn plants, increasing their potential for phytoextraction; (3) To study the effects of HS in mitigating the toxic effects of As on the bioenergetics of corn seedlings, in the context of root H⁺ extrusion and the activity of oxidative stress enzymes. Three experiments were carried out, the first with *C. citriodora* and the others with *Z. mays*. The experiments were preceded by tests to determine the best concentration-response of HS and the toxic concentration by As and then the treatments were applied: Control, HS, As and As+HS accompanied by nutrient solution. In the first study it was observed that HS showed the ability to modify the architecture of the root system, biomass, robustness and alleviate the harmful effects of As on growth. In the second, HS increased the phytoextraction of As and alleviated their stress. The rate of photosynthesis was reduced by As stress and was attenuated by the action of HS. Stomatal conductance and water use efficiency were also reduced by As stress but were not relieved by HS treatment. The internal concentration of CO₂ increased with As stress and was alleviated by the action of the HS. The elevations in P, Fe, Cu, Mn e Ni concentrations promoted in response to As stress, were attenuated by the action of the HS. Plants treated with HS showed lower concentrations of As, but, on the other hand, increased biomass, it can be said that phytoextraction increased. In the third, it was observed that HS altered bioenergetics. The effects of As (root H⁺ extrusion and oxidative stress enzyme activity) were alleviated by the HS. The experimental evidence obtained with the results of this thesis work showed that HS were able to soften As phytotoxicity and also increase its phytoextraction.

Keywords: Phytoremediation • trace elements • biostimulants • humus • enzymes.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 - Porcentagem do número nacional de creditações de laboratórios de testes, testes ambientais, testes de arsênio e PIB (produto interno bruto), por Estado, no Brasil.23**
- Figura 2 - LOQ (Limites de quantificação) por técnica analítica, em amostras líquidas (a), sólidas (b) e de bioindicadores (c), e comparação com os limites legais ambientais de potabilidade e valor de prevenção (VP) para o solo.24**
- Figura 3 - Processos de fitorremediação de arsênio em solos e águas contaminadas.31**

ARTIGO 1- SUBSTÂNCIAS HÚMICAS ESTIMULAM O CRESCIMENTO INICIAL E AMENIZAM O ESTRESSE POR ARSÊNIO EM MUDAS DE *CORYMBIA CITRIODORA*

- Figura 4 - Número de raízes laterais (NRL) em plântulas de *C. citriodora* sob diferentes concentrações de substâncias húmicas (SH) (a). Modelo de dose-resposta de SH, coeficiente de correlação (R^2), nível de significância da regressão (valor de p) e ponto de inflexão (concentração ideal) para a massa seca da raiz (b).53**
- Figura 5 - Massa seca de parte aérea (a), altura da parte aérea (b), massa seca de raízes (c), diâmetro do coleto (d), massa seca total (e) e índice de qualidade de Dickson (IQD) (f) em plantas de *C. citriodora* tratadas com SH, arsênio (As) e sua combinação (As+SH)..55**

ARTIGO 2 - BIOATIVIDADE DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM PLANTAS DE MILHO (*ZEA MAYS L.*): FITOEXTRAÇÃO DE ARSÊNIO E ESTRESSES NUTRICIONAIS E FISIOLÓGICOS

- Figura 6 - Massa da raiz seca (MSR) em plantas de milho sob diferentes concentrações de substâncias húmicas (SH) (a). Modelo de dose-resposta de SH, coeficiente de correlação (R^2), nível de significância da regressão (valor de p) e ponto de inflexão (concentração ideal) para a massa seca da raiz (b).67**
- Figura 7 - Massa seca de raízes (MSR) e de parte aérea (MSPA) (a), concentração de arsênio (As) (b) e fitoextração de As (c) em plantas de milho sob adição de substâncias húmicas (SH), As e sua combinação (As +SH).68**
- Figura 8 - Concentrações de fósforo (a), cálcio (b), magnésio (c), enxofre (d), ferro (e), cobre (f), manganês (g) e níquel (h) nas raízes e na parte aérea das plantas de milho**

tratadas com soluções contendo substâncias húmicas (SH), As e sua combinação (As +SH).
..... 69

Figura 9 - Taxa de fotossíntese (a), condutância estomática (b), concentração interna de CO₂ (c) e eficiência no uso da água (d) em plantas de milho tratadas com substâncias húmicas (SH), As e sua combinação (As + SH). 71

ARTIGO 3 - SUBSTÂNCIAS HÚMICAS MODIFICAM A EXTRUSÃO RADICULAR DE H⁺ E A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLÂNTULAS DE MILHO (*ZEA MAYS* L.) ESTRESSADAS POR ARSÊNIO 80

Figura 10 - Extrusão de H⁺ pela massa seca de raízes de plântulas de milho após tratamento com SH, As e sua combinação (As+SH). 84

Figura 11 - Atividade das enzimas catalase (CAT) (a); peroxidase do ascorbato (APX) (b); e superóxido dismutase (SOD) (c) nas raízes e na parte aérea de plântulas de milho após tratamento com SH, As e sua combinação (As+SH). 86

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Técnicas analíticas para quantificação de As utilizadas em laboratórios acreditados em diferentes estados do Brasil | 24 |
| Tabela 2 - LOQ (Limites de quantificação) de As por técnica analítica observadas no presente levantamento de dados e comparação com outros trabalhos..... | 26 |
| Tabela 3 - LOQ (Limites de quantificação) de espécies As por técnica analítica, em amostras líquidas, sólidas e bioindicadores observadas no presente levantamento de dados e comparação com outros trabalhos | 29 |
| Tabela 4 - Trabalhos envolvendo a ação de frações húmicas na fitodisponibilidade de metais e metaloides em solos e meio hidropônico | 34 |

ARTIGO 1- SUBSTÂNCIAS HÚMICAS ESTIMULAM O CRESCIMENTO INICIAL E AMENIZAM O ESTRESSE POR ARSÊNIO EM MUDAS DE *CORYMBIA CITRIODORA*

| | |
|--|----|
| Tabela 5 - Massa seca total, altura total e diâmetro do coleto de plântulas de <i>C. citriodora</i> tratadas com diferentes concentrações (0, 67, 133, 267, 534, 1058 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de As. | 54 |
|--|----|

ARTIGO 2 - BIOATIVIDADE DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM PLANTAS DE MILHO (*ZEA MAYS L.*): FITOEXTRAÇÃO DE ARSÊNIO E ESTRESSES NUTRICIONAIS E FISIOLÓGICOS

| | |
|---|----|
| Tabela 6 - Massa seca das raízes (MSR) em plantas de milho tratadas com diferentes concentrações de As (0, 67, 133, 267, 534, 1058 $\mu\text{mol L}^{-1}$) | 68 |
|---|----|

LISTA DE SIGLAS

A - Taxas de Assimilação de CO₂

AF - Ácidos Fúlvicos

AH - Ácidos Húmicos

ANOVA - Análise Paramétrica de Variância Unidirecional

APX - Ascorbato Peroxidase

CAT - Catalase

CE UV - Espectroscopia Ultravioleta e Eletroforese Capilar

C_i - Concentração Interna de CO₂

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DAG - Departamento de Agronomia

E - Transpiração

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ET AAS - Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica

EUA - Eficiência no Uso da Água

FAAS - Espectrometria de absorção atômica por chama

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

G_s - Condutância Estomática

HG AAS - Geração de Hidreto Combinada com Espectrometria de Absorção Atômica

HG AFS - Espectrometria de Fluorescência Atômica

HG ICP OES - Geração de Hidreto Combinado com Espectrometria de Emissão Óptica de Plasma Acoplada Indutivamente

HU - Humina

ICA - Instituto de Ciências Agrárias

ICP MS - Espectrometria de Massa de Plasma Indutivamente Acoplado

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IQD - Índice de Qualidade de Dickson

LOQ - Limite de Quantificação

MSPA - Massa Seca de Parte Aérea

MSR - Massa Seca de Raízes

NRL - Número de Raízes Laterais

PIB - Produto Interno Bruto

PXRF - Dispositivos Portáteis de Fluorescência de Raios-X

SH - Substâncias Húmicas

SOD - Superóxido Dismutase

TXRF - Fluorescência Total de Raios X de Reflexão

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

UnB - Universidade de Brasília

UV VIS - Espectroscopia Ultravioleta Visível

VP - Valor de Prevenção

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 15 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| | 2.1 Objetivos gerais | 16 |
| | 2.2 Objetivos específicos..... | 16 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA: | 17 |
| | 3.1 Contaminações por arsênio no Brasil..... | 17 |
| | 3.2 Fitorremediação de arsênio | 31 |
| | 3.3 Efeito das substâncias húmicas na fitodisponibilidade de metais..... | 33 |
| | Referências | 36 |
| 4 | ARTIGOS CIENTÍFICOS | 48 |
| | ARTIGO 1- SUBSTÂNCIAS HÚMICAS ESTIMULAM O CRESCIMENTO INICIAL E AMENIZAM O ESTRESSE POR ARSÊNIO EM MUDAS DE <i>CORYMBIA CITRIODORA</i> | 48 |
| | 1 Introdução | 48 |
| | 2 Material e métodos | 51 |
| | 2.1 Vermicompostagem e extração de substâncias húmicas..... | 51 |
| | 2.2 Experimento de crescimento de plantas | 51 |
| | 2.3 Análise estatística | 52 |
| | 3 Resultados | 53 |
| | 3.1 Concentração-resposta ótima de SH..... | 53 |
| | 3.2 Concentração tóxica de As..... | 54 |
| | 3.3 Concentração ótima de SH associada à concentração tóxica de As..... | 54 |
| | 4 Discussão | 56 |
| | 5 Conclusão | 57 |
| | Referências | 57 |
| | ARTIGO 2 - BIOATIVIDADE DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM PLANTAS DE MILHO (<i>ZEA MAYS</i> L.): FITOEXTRAÇÃO DE ARSÊNIO E ESTRESSES NUTRICIONAIS E FISIOLÓGICOS | 62 |
| | 1 Introdução..... | 62 |
| | 2 Material e métodos | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1 Processo de vermicompostagem e extração de substâncias húmicas | 64 |
| 2.2 Experimentos de crescimento de plantas | 64 |
| 2.3 Análise estatística | 66 |
| 3 Resultados..... | 67 |
| 3.1 Concentração-resposta ótima do SH e concentração tóxica de As | 67 |
| 3.2 Concentração ótima de SH associada à concentração tóxica de As: biomassa vegetal, concentração e fitoextração de As, concentração nutrientes e trocas gasosas | 68 |
| 4 Discussão..... | 71 |
| 5 Conclusão..... | 74 |
| Referências | 74 |
| ARTIGO 3 - SUBSTÂNCIAS HÚMICAS MODIFICAM A EXTRUSÃO RADICULAR DE H⁺ E A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLÂNTULAS DE MILHO (<i>ZEA MAYS</i> L.) ESTRESSADAS POR ARSÊNIO | 80 |
| 1 Introdução | 80 |
| 2 Materiais e métodos | 81 |
| 2.1 Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade das SH sobre a bomba de H ⁺ | 82 |
| 2.2 Análises Bioquímicas (atividade das enzimas antioxidantes)..... | 82 |
| 2.3 Análise estatística | 83 |
| 3 Resultados e discussão | 84 |
| 4 Conclusão..... | 87 |
| Referências | 87 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 90 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

As contaminações ambientais por arsênio (As) ocorrem em todos continentes e existem alguns relatos no Brasil (BUNDSCHUH et al., 2012) e por ser um elemento-traço com elevado risco ambiental (ABDUL et al., 2015; BERTIN et al., 2011; MARTINS et al., 2019; SAMUEL et al., 2005) é importante o entendimento de sua dinâmica e de estratégias de remediação (KUMAR et al., 2015; MALLICK et al., 2013; SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019). A utilização da fitorremediação de As vem mostrando potencial e consiste nos processos de remoção (fitoextração/fitoacumulação), imobilização (fitoestabilização) ou volatilização (fitovolatilização) (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019).

Apenas algumas espécies apresentam capacidade de hiperacumular As (HASANUZZAMAN et al., 2015), ou seja acumular uma concentração acima de $1.000 \mu\text{g g}^{-1}$ nas folhas (REEVES, 2006), estas apresentam porte pequeno, sendo importante utilizar mecanismos para aumentar a tolerância de outras espécies com sistemas radiculares mais vigorosos (VAMERALI et al., 2009) que podem ser obtidos com a utilização de bioestimulantes vegetais. Neste sentido, um dos bioestimulantes que pode ser utilizado são as substâncias húmicas (SH), indicadas para aumentar a tolerância, como apresentado em trabalhos recentes (CAPORALE et al., 2018; DOBBSS et al., 2018; PITTARELLO et al., 2018, 2019).

O presente trabalho é constituído de uma revisão de literatura e de três artigos científicos formatados segundo o manual de normalização da instituição para apresentação de trabalhos científicos (UFVJM, 2019). Na revisão de literatura, foram abordadas no primeiro tópico (2.1) as contaminações por As no Brasil, sendo parte deste, um trabalho (SANTOS et al., 2019) publicado na Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade (ISSN 2359-1412). No segundo tópico (2.2) foram abordados os mecanismos de fitorremediação de As e no terceiro (2.3) o efeito de substâncias húmicas na fitodisponibilidade e fitotoxidez de metais.

O segundo capítulo foi composto dos três artigos científicos apresentando uma sequência de trabalho, que inicia abordando o efeito de SH no crescimento vegetal em meio contaminado por As, evolui para abordagem de aspectos nutricionais, fotossintéticos, de fitoextração e finaliza na bioenergética. Foram utilizadas duas espécies vegetais (*Corymbia citriodora* e *Zea mays L.*) com sistemas radiculares, porte e perenidade distintas, organizadas em artigos diferentes pela metodologia experimental e foco da discussão dos resultados.

O primeiro artigo, foi denominado “Substâncias húmicas estimulam o crescimento inicial e amenizam o estresse por arsênio em mudas de *Corymbia citriodora*”. Nele foi avaliado se SH extraídas de vermicomposto tem a capacidade de modificar a arquitetura do sistema

radicular, estimular o crescimento, aumentar a robustez e aliviar o estresse promovido pelo As em plântulas de *C. citriodora*. O segundo artigo foi intitulado “Efeito de substâncias húmicas na fitoextração de arsênio e nos seus estresses nutricionais e fisiológicos de plantas de milho (*Zea mays* L.)”. Nele foi observada a capacidade de aumentar a fitoextração e atenuar estresses nutricionais e fisiológicos em plantas de milho cultivadas em meio contaminado por As. O terceiro, denominado “Substâncias húmicas modificam a extrusão radicular de H⁺ e a atividade de enzimas do estresse oxidativo em plântulas de milho (*Zea mays* L.) estressadas por arsênio” avaliou-se o efeito das SHs na bioenergética vegetal sob estresse por As.

Neste sentido, a sequência dos trabalhos desta tese foi realizada para verificar se SH podem atenuar os efeitos tóxicos do As no âmbito da arquitetura do sistema radicular, biomassa, robustez, alterações nutricionais, fotossíntese e bioenergética, contribuindo para sua fitoextração (Hipótese H₁).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo geral do trabalho de tese foi avaliar se substâncias húmicas (SH) isoladas de vermicomposto apresentam capacidade de amenizar a fitotoxidez de As e aumentar sua fitoextração, utilizando como plantas indicadoras *Corymbia citriodora* e *Zea mays* L.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se SH podem modificar a arquitetura do sistema radicular, estimular o crescimento, aumentar a robustez e aliviar o estresse promovido pelo As em *C. citriodora*.
- Avaliar se SH podem atenuar estresses nutricionais e fisiológicos promovidos pelo As em plantas de milho, aumentando seu potencial de fitoextração.
- Avaliar se SH atenuam efeitos na bioenergética de plântulas de milho sob estresse por As, no âmbito da extrusão radicular de H⁺ e da atividade de enzimas do estresse oxidativo.

3 REVISÃO DE LITERATURA:

3.1 Contaminações por arsênio no Brasil

Áreas contaminadas por arsênio (As) ocorrem em vários ambientes, em todos continentes e existem alguns relatos no Brasil (BUNDSCHUH et al., 2012). A Legislação ambiental brasileira possui padrões para As em águas (BRASIL, 2005, 2009, 2017), efluentes (BRASIL, 2011) e solos (BRASIL, 2009) e prevê que cada estado deve dar publicidade às informações sobre as áreas contaminadas identificadas (BRASIL, 2009). Apesar da exigência, apenas três estados publicaram nos seus websites (MINAS GERAIS, 2018; RIO DE JANEIRO, 2018; SÃO PAULO, 2018) e somente Minas Gerais informa o número de áreas contaminadas por As. Neste estado, 28% das áreas cadastradas como contaminadas apresentam metais/metaloídeos e destes o mais frequente é o Pb, com 16 %, seguido do As, com 9% (MINAS GERAIS, 2019).

Vários estudos quantificaram As em águas e foi encontrado em alguns casos, concentrações acima dos limites ambientais. Em estudo da água subterrânea em área antropizada na região do quadrilátero ferrífero de Minas Gerais foram encontrados entre 2 e 2.980 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As total (BORBA; FIGUEIREDO; CAVALCANTI, 2004), onde o limite ambiental é 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2009). Em 2016, na mesma região, ocorreu o rompimento da barragem do Fundão com derramamento de rejeitos de minério de ferro no Rio Doce, que posteriormente foi analisado, encontrando até 0,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As total à montante do desastre e de até 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ à jusante, indicando contribuição no aporte de As (DOS REIS et al., 2019). Ressalva-se que os valores apresentam-se abaixo do limite ambiental, que para o local é 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005).

No município de Paracatu (MG) ocorre mineração há mais de 300 anos e atualmente opera-se a maior mina de ouro do Brasil (NG et al., 2019). Neste município foram encontrados entre 0,55 e 110 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As total em 2010 (REZENDE; COSTA; WINDMÖLLER, 2015), onde o limite ambiental é 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005). Após revitalização do Córrego Rico, em 2011, os valores reduziram para entre 0,50 e 31,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (REZENDE; COSTA; WINDMÖLLER, 2015) e apresentaram abaixo do limite ambiental (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) em estudos posteriores (BIDONE et al., 2016; VELOSO et al., 2019). Em trabalho mais recente, o As total nas águas para o consumo humano variou de 0,21 a 3,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (NG et al., 2019).

Os valores de investigação para solos são derivados de avaliações do risco à saúde humana e foram fixados em 35 mg kg^{-1} para agricultura, 55 mg kg^{-1} para uso residencial e 150 mg kg^{-1} para uso industrial (BRASIL, 2009), mas em alguns trabalhos foram encontrados

valores superiores. Em áreas antropizadas por processo de mineração no estado de Minas Gerais, foram encontrados até 389 mg kg⁻¹ em Riacho dos Machados, 1.106 mg kg⁻¹ em Santa Barbara e 1.664 mg kg⁻¹ em Paracatu (SANTANA, 2005).

Solos naturais também podem apresentar concentrações elevadas de As, como em estudos para determinação do valor de referência de qualidade do estado de Minas Gerais, onde foram encontrados até 389 mg kg⁻¹ (SOUZA et al., 2015) e na região Amazônica, que obtiveram até 117 mg kg⁻¹ (DA SILVA JÚNIOR et al., 2019). Nestes trabalhos as concentrações foram muito maiores que os 35 mg kg⁻¹ do valor de investigação para solos agrícolas, sugerindo uma baixa biodisponibilidade, pois as amostras foram coletadas em áreas com vegetação natural (DA SILVA JÚNIOR et al., 2019).

Em estudo sobre a concentração e o seu risco para saúde humana por ingestão no solo do entorno da mina de ouro do município de Paracatu, foram encontrados até 2.666 mg kg⁻¹ onde o limite ambiental é 150 mg kg⁻¹, entretanto com baixa porcentagem bioacessível (<4,2%), indicando baixo risco de exposição para crianças (ONO et al., 2012). Recentemente foi avaliado o risco do As para a saúde da população do mesmo município utilizando vias múltiplas de exposição, considerando as concentrações e a bioacessibilidade em águas potáveis, poeiras e alimentos, com os resultados apontando risco baixo (NG et al., 2019).

Existem lacunas na literatura sobre técnicas de quantificação de arsênio utilizadas pelos laboratórios brasileiros e apesar da exigência de certificação ISO / IEC 17025 dada na Resolução Conama N° 420 (BRASIL, 2009) não ocorreram estudos sobre distribuição geográfica dos laboratórios ambientais. Neste sentido, considerando a importância de aprofundar nos temas supracitados antes de explorar a fitorremediação, optou-se por produzir um primeiro artigo de revisão (2.1.1), já publicado na Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade (ISSN 2359-1412) (SANTOS et al., 2019).

3.1.1 Técnicas de quantificação de arsênio e certificação ISO / IEC 17025 no Brasil

Jefferson Luiz Antunes Santos¹ · Jader Galba Busato² · Rodrigo de Almeida Heringer³ · Juscimar da Silva⁴ · Leonardo Barros Dobbss¹

¹ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Instituto de Ciências Agrícolas (ICA) Unaí, MG, Brasil, jefferson.antunes@ufvjm.edu.br, <https://orcid.org/0000-0001-9308-6373>

² Universidade de Brasília (UnB), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto Central de Ciências, Brasília, DF, Brasil, jaderbusato@unb.br, <https://orcid.org/0000-0003-2810-7769>

³ Universidade Federal de Goiás (UFG), Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT), Aparecida de Goiânia, GO, Brasil, heringer@ufg.br, <https://orcid.org/0000-0001-7035-606X>

⁴ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Embrapa Hortaliças, Fazenda Tamanduá, Brasília, DF, Brasil, juscimar.silva@embrapa.br, <https://orcid.org/0000-0002-8757-6170>

⁵ Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Unaí, MG, Brasil, leonardo.dobbss@ufvjm.edu.br, <https://orcid.org/0000-0003-0465-4186>

Resumo. A importância da quantificação do arsênico (As) nos compartimentos ambientais deve-se aos riscos para os ecossistemas e para a saúde pública. Existem relatos de altas concentrações desse metalóide no Brasil e diferenças tecnológicas entre estados são observadas. O objetivo deste trabalho foi apresentar e discutir os cenários atuais de acreditação e comparar o limite de quantificação (LOQ) de As pelas técnicas analíticas no Brasil. Os dados dos laboratórios acreditados foram coletados no site do Inmetro e nas redes metrológicas estaduais e, em seguida, agrupados e analisados por estado, matriz e técnica analítica. Existem grandes discrepâncias entre o número de laboratórios por estado e uma boa correlação com o produto interno bruto (PIB). Quase todos os laboratórios têm um LOQ menor que os limites ambientais. A lista observada de técnicas classificadas dos menores aos mais altos valores de LOQ é: para amostras líquidas ICP MS (espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado), ET AAS (espectrometria de absorção atômica eletrotérmica), HG AAS (geração de hidreto combinada com espectrometria de absorção atômica) ou HG ICP OES (geração de hidreto combinado com espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente) e UV VIS (espectroscopia ultravioleta visível); para amostras de sólidos HG ICP OES, ICP MS, HG AAS, ET AAS e FAAS (espectrometria de absorção atômica por chama); e para bioindicadores

ICP MS, HG ICP OES. A análise das espécies As é creditada em apenas um laboratório, mas não inclui todas as espécies.

Palavras-chave: Geração de hidreto · Laboratórios ambientais · Limite de detecção · Espectrometria · Especificação · Cromatografia

Introdução

O risco ambiental do arsênico (As) para os ecossistemas e a saúde pública é um fato em um grande número de países ao redor do mundo (BUNDSCHUH et al., 2012). O metalóide pode ser responsável por várias complicações dermatológicas, cardiovasculares, pulmonares, reprodutivas, neurológicas e tumorigênicas em muitas partes do corpo (ABDUL et al., 2015).

As técnicas analíticas para quantificação de As em amostras ambientais geralmente incluem absorção atômica, emissão atômica e espectrometria de massa e técnicas de fluorescência de raios X e espectroscopia de ultravioleta visível (MA et al., 2014; SANKARARAMAKRISHNAN; MISHRA, 2018). Estas técnicas podem incluir atomizadores de chama, geradores de hidreto e dispositivos eletrotérmicos, como o forno de grafite (SANKARARAMAKRISHNAN; MISHRA, 2018). As técnicas analíticas aprovadas pela USEPA incluem espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente (ICP OES), espectrometria de massa de plasma acoplada indutivamente (ICP MS), geração de hidretos combinada com espectrometria de absorção atômica (HG AAS) e espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ET AAS), com limites de quantificação variando de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MA et al., 2014).

Estudos recentes usaram ICP MS (BOLEA-FERNANDEZ et al., 2015; DE LA CRUZ et al., 2018; KAYA; TURKOGLU, 2017; MACHADO et al., 2017; OROIAN et al., 2016), HG AAS (WATERLOT; DOUAY, 2015), ET AAS (HASSANPOOR; KHAYATIAN; AZAR, 2015; OLIVEIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2016), geração de hidreto combinada com espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente HG ICP OES (KIM et al., 2019), geração de hidreto combinada com espectrometria de fluorescência atômica (HG AFS) (WANG; CUI; XU, 2016), espectrometria de emissão óptica de plasma induzida por micro-ondas (MIP OES) (GALLEGO RÍOS et al., 2018), espectroscopia ultravioleta visível (UV VIS) (GÜRKAN; KIR; ALTUNAY, 2015), fluorescência total de raios X de reflexão (TXRF) (PIERANGELI et al., 2015) e fluorescência portátil de raios-X (PXRF) (GARCÍA-RICO et al., 2019; KIM et al., 2019).

Além da quantificação total de As, as técnicas de especificação são importantes para detectar e quantificar muitas espécies de As, que podem ocorrer em formas orgânicas ou

inorgânicas e em diferentes estados de valência, com implicações em sua biodisponibilidade e toxicidade (ABDUL et al., 2015; LIU et al., 2018; MOE et al., 2016). Algumas técnicas hifenizadas consideram cromatografia e eletroforese capilar (CHENG et al., 2018; GARCÍA-RICO et al., 2019; KHAN et al., 2015; MA et al., 2016); cromatografia iônica (ZHU et al., 2017), espectroscopia ultravioleta e eletroforese capilar (CE UV) (LEE; KWON; CHUNG, 2018) para a separação de espécies.

O limite máximo estabelecido para água potável, água subterrânea e água doce classe 1 é $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005, 2009, 2017). Para efluentes, o limite é de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2011). Nos solos, o valor da prevenção (VP) é 15mg kg^{-1} , o valor da investigação agrícola é 35mg kg^{-1} , investigação residencial é 55mg kg^{-1} e o valor industrial é 150mg kg^{-1} (BRASIL, 2009). As resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, que impõem os limites aceitos, também exigem que as análises para caracterização e monitoramento sejam realizadas por laboratórios acreditados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO (BRASIL, 2009, 2011). No entanto, não existem padrões para bioindicadores, qualidade do ar e espécies de As.

O Brasil possui diferenças regionais históricas que se refletem no acesso a tecnologias (SANTOS; PALES; RODRIGUES, 2014). De acordo com Grochau et al. (2017) existe uma forte correlação entre o produto interno bruto (PIB) dos municípios das Américas e o número de laboratórios acreditados na ISO 17025.

No Brasil, as principais concentrações elevadas de As ocorrem em Minas Gerais (BUNDSCHUH et al., 2012), especialmente correlacionado a depósitos de ouro no Quadrilátero Ferrífero (BORBA; FIGUEIREDO; MATSCHULLAT, 2003; COSTA et al., 2015; SILVA et al., 2018; VAREJÃO et al., 2011) e nos arredores da cidade de Paracatu (BIDONE et al., 2018; ONO et al., 2012; REZENDE; COSTA; WINDMÖLLER, 2015). Nessas regiões, a presença de As está associada a depósitos naturais de ouro, onde está predominantemente contida em minerais de sulfeto, como arsenopirita e pirita (DESCHAMPS et al., 2002)

Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho foi apresentar e discutir os cenários atuais de acreditação e comparar o limite de quantificação (LOQ) de As por técnicas analíticas no Brasil.

Metodologia

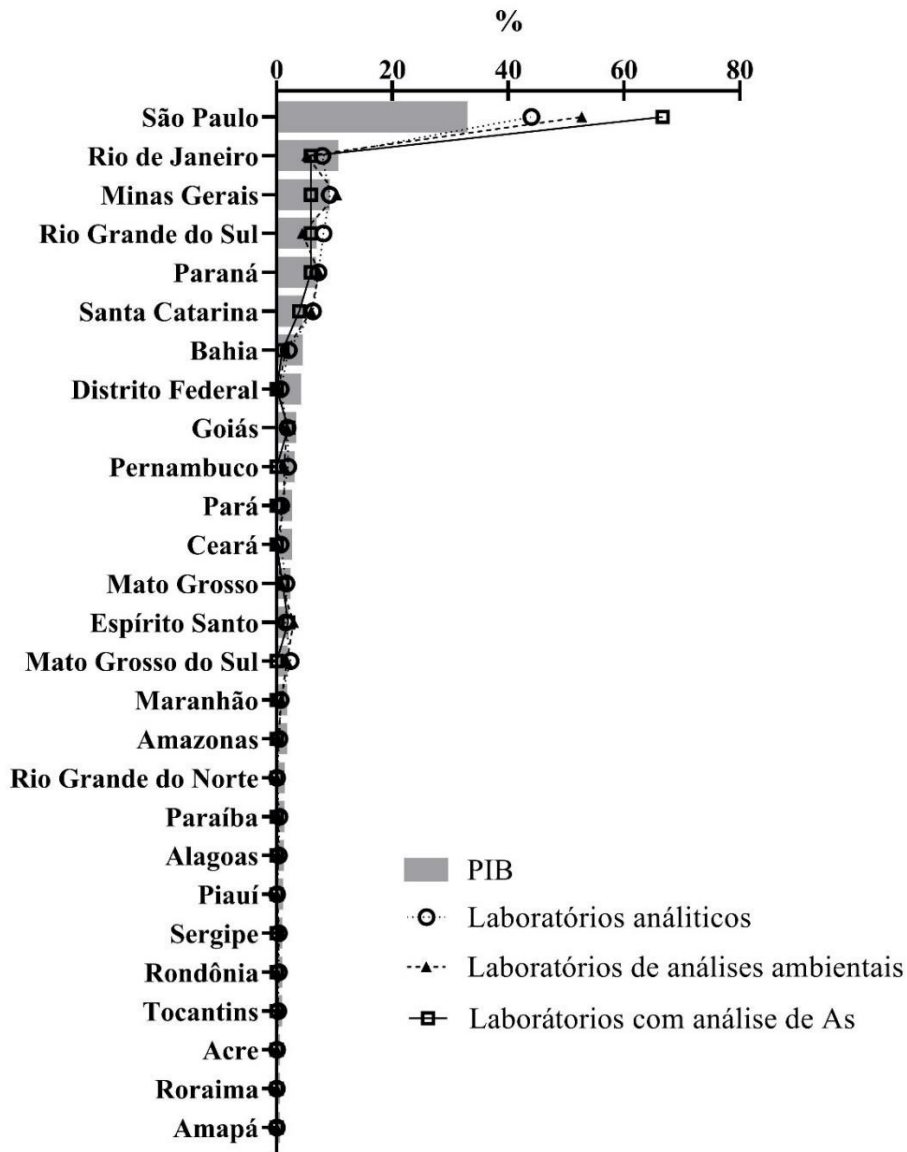
Dados sobre laboratórios acreditados, LOQ e técnicas analíticas foram coletados em julho de 2018 no site do Inmetro (INMETRO, 2018) e redes metrológicas estaduais (REDE METROLÓGICA DE MINAS GERAIS, 2018; REDE METROLÓGICA DO RIO GRANDE

DO SUL, 2018). Os laboratórios foram agrupados por estado, matriz e técnica analítica. As matrizes foram agrupadas por tipo de amostra como líquido (água potável, água bruta, água subterrânea, para consumo humano, tratado, solução salina, salobra, residual, efluente, extrato solubilizado e lixiviado e resíduos líquidos), sólido (solo, sedimentos, resíduos sólidos) , industrial, rocha, lodo) e bioindicadores (tecidos vegetais, mexilhão, organismos aquáticos, terrestres e vegetais). A correlação entre o PIB do estado e o número de laboratórios acreditados foi baseada no coeficiente de correlação de Pearson usando o software Excel (versão Office 365, 1903). Análise descritiva das técnicas analíticas por estado e matriz.

Resultados e discussão

No Brasil, existem 1081 laboratórios acreditados, dos quais 385 oferecem testes ambientais e apenas 102 analisam. O maior número de laboratórios ambientais está concentrado nas regiões Sudeste e Sul, responsável por 89% do total. Por exemplo, o estado de São Paulo (SP) responde por quase 53%. O número é ainda maior quando se considera a análise de As, com 96% dos laboratórios localizados nas regiões Sul e Sudeste, 67% em SP. A região Nordeste possui apenas um laboratório na Bahia (BA) enquanto a região Norte não possui. A Figura 1 mostra a distribuição dos laboratórios e o PIB por estado. Foi encontrada uma forte correlação positiva (correlação de Pearson) entre o número de laboratórios acreditados e o PIB, como também observado por (GROCHAU; CATEN; DE CAMARGO FORTE, 2017). A maior correlação ocorreu com os laboratórios de teste ($r = 0,97$), seguidos pelos laboratórios ambientais de teste ($r = 0,94$) e, finalmente, com aqueles que realizam análises de As ($r = 0,92$).

Figura 1 - Porcentagem do número nacional de creditações de laboratórios de testes, testes ambientais, testes de arsênio e PIB (produto interno bruto), por Estado, no Brasil.



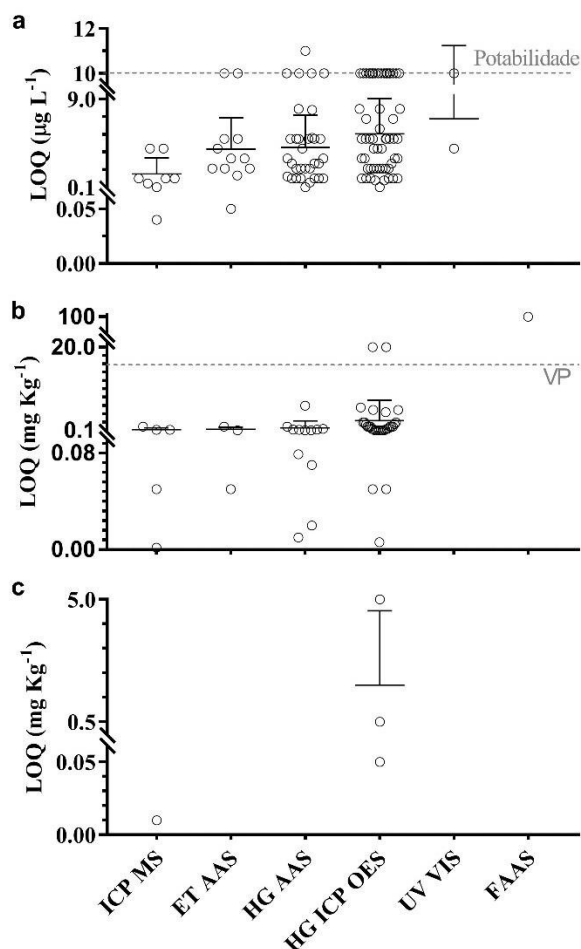
HG ICP OES ou HG AAS são as técnicas mais comuns utilizadas para quantificar o As em conteúdo pequeno (Tab. 1), correspondendo a 80,3% das creditações. Aqueles com maiores investimentos e com maior sensibilidade analítica, como ICP MS e ET AAS, responderam por 17,2% e os com menor sensibilidade, como espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e UV VIS, apenas 2,5%. Técnicas mais sensíveis estão presentes em apenas 5 estados (SP, MG, RJ, RS e PR).

Tabela 1 - Técnicas analíticas para quantificação de As utilizadas em laboratórios acreditados em diferentes estados do Brasil

| Técnicas | Estados | | | | | | | | | |
|------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | SP | MG | RJ | RS | PR | SC | ES | BA | GO | MT |
| ICP MS | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ET AAS | 8 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HG AAS | 20 | 7 | 3 | 5 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| HG ICP OES | 41 | 4 | 3 | 0 | 3 | 3 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| UV VIS | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FAAS | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Considerando apenas os laboratórios acreditados para análise de As, 89% possuem acreditação em matrizes líquidas, 42% em sólidos, 10% em gases e 2% em bioindicadores. Essa distribuição provavelmente decorre de uma maior preocupação com a potabilidade da água. A Figura 2 mostra o LOQ (Limite de quantificação) para As por técnica analítica, nas três matrizes diferentes: amostras líquidas, sólidas e bioindicadores.

Figura 2 - LOQ (Limites de quantificação) por técnica analítica, em amostras líquidas (a), sólidas (b) e de bioindicadores (c), e comparação com os limites legais ambientais de potabilidade e valor de prevenção (VP) para o solo.



Quase todos os laboratórios apresentaram um LOQ de acordo com o limiar ambiental para água, efluente e solo. Muitos laboratórios (31) têm um valor igual ao padrão de potabilidade (BRASIL, 2017b) (Fig. 2a), indicando potencialmente que é usado como alvo. Apenas um laboratório apresentou um LOQ maior que o padrão de potabilidade e, portanto, não é aplicável a esse propósito (Fig. 2a). Este laboratório utiliza o HG AAS, mas a ocorrência não se mostra uma limitação, pois os demais laboratórios e outros estudos (AKTER et al., 2005; BORBA; FIGUEIREDO; CAVALCANTI, 2004; WATERLOT; DOUAY, 2015) apresentaram valores consideravelmente mais baixos. Três laboratórios apresentaram valores de LOQ superiores ao VP (15 mg kg^{-1}) (BRASIL, 2009) (Fig. 2b), dos quais dois usavam HG ICP OES e um FAAS. Assim como em outros laboratórios, que obtiveram valores de LOQ abaixo do VP usando HG ICP OES, a ocorrência não é uma limitação da técnica. Apenas um laboratório usa FAAS e apresenta valores de LOQ acima do VP. Outros autores também obtiveram valores de LOQ próximos ou mesmo acima da VP, como $12,8 \text{ mg kg}^{-1}$ com ICP OES (PAYE et al., 2010) e $33,3 \text{ mg kg}^{-1}$ com PXRf (GARCÍA-RICO et al., 2019).

As técnicas classificadas da menor para maior LOQ, considerando a menor LOQ, foram semelhantes entre as matrizes. No caso de matrizes líquidas, foram: ICP MS (40 ng L^{-1}), ET AAS (50 ng L^{-1}), HG AAS ou HG ICP OES (100 ng L^{-1}) e UV VIS ($4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) (Fig. 2a). Em matrizes sólidas: HG ICP OES ($1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), ICP MS ($1,5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), HG AAS ($10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), ET AAS ($50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) e FAAS (100 mg kg^{-1}) (Fig. 2b). Em bioindicadores: ICP MS ($10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) e HG ICP OES ($50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) (Fig. 2c). Em um estudo comparando praticamente as mesmas técnicas analíticas, HUNG; NEKRASSOVA; COMPTON (2004) observaram sequência semelhante (ICP MS, ET AAS, HG AFS, HG AAS e HG ICP OES) em comparação com o presente estudo, exceto para UV VIS que não foi observado. YOGARAJAH; TSAI (2015) também obtiveram um LOQ menor para ICP MS (ICP MS = AFS < AAS) e AKTER et al. (2005) observaram um LOQ menor para cromatografia líquida (LC) combinada com ICP MS do que para HG AAS (LC ICP MS < HG AAS < CE UV).

A Tabela 2 apresenta o LOQ para As obtido por diferentes técnicas analíticas e comparado com o apresentado em estudos envolvendo a quantificação de As nas três matrizes consideradas no presente levantamento de dados.

Tabela 2 - LOQ (Limites de quantificação) de As por técnica analítica observadas no presente levantamento de dados e comparação com outros trabalhos

| Técnica | LOQ | Referência |
|---|---------------|-------------------------------------|
| <u>Amostras líquidas ($\mu\text{g L}^{-1}$)</u> | | |
| ICP MS | 0,0007 | (BOLEA-FERNANDEZ et al., 2015) |
| ET AAS | 0,006 | (HASSANPOOR; KHAYATIAN; AZAR, 2015) |
| ICP MS | 0,04 a 4,00 | Levantamento de dados |
| ET AAS | 0,05 a 10,00 | Levantamento de dados |
| HG ICP OES | 0,10 a 10,00 | Levantamento de dados |
| HG AAS | 0,10 a 11,00 | Levantamento de dados |
| ICP MS | 0,21 | (KOMOROWICZ; BARAŁKIEWICZ, 2016) |
| ICP MS | 0,33 | (GARCÍA-RICO et al., 2019) |
| HG AAS | 0,33 | (AKTER et al., 2005) |
| HG AAS | 0,41 | (WATERLOT; DOUAY, 2015) |
| ICP MS | 0,46 | (MAKOWSKA et al., 2018) |
| ICP MS | 0,70 | (MACHADO et al., 2017) |
| UV VIS | 4,00 a 10,00 | Levantamento de dados |
| ET AAS | 4,60 | (MAKOWSKA et al., 2018) |
| <u>Amostras sólidas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)</u> | | |
| HG AAS | 0,67 | (GÜRLEYÜK; F. TYSON; UDEN, 2000) |
| HG ICP OES | 1,00 a 20.000 | Levantamento de dados |
| ICP MS | 1,50 a 1.000 | Levantamento de dados |
| ET AAS | 7,40 | (NIELSEN et al., 2011) |
| HG AAS | 10,0 a 6.000 | Levantamento de dados |
| TXRF | 33,3 | (PIERANGELI et al., 2015) |
| HG ICP OES | 50,0 | (SOUZA et al., 2016) |
| HG ICP OES | 50,0 | (ALCÂNTARA et al., 2011) |
| ET AAS | 50,0 a 1.000 | Levantamena de dados |
| HG ICP OES | 210 | (PAYE et al., 2010) |
| HG AAS | 300 | (REZENDE et al., 2011) |
| GC ECD | 480 | (ZHONG et al., 2019) |
| HG ICP OES | 830 | (KIM et al., 2019) |
| PXRF | 1.670 | (KIM et al., 2019) |
| ICP OES | 12.800 | (PAYE et al., 2010) |
| PXRF | 33.300 | (GARCÍA-RICO et al., 2019) |
| FAAS | 100.000 | Levantamento de dados |
| <u>Amostras de bioindicadores ($\mu\text{g kg}^{-1}$)</u> | | |
| ET AAS | 0,08 | (BAIG et al., 2010) |
| ICP MS | 0,09 | (KHAN et al., 2015) |
| ICP MS | 0,12 | (Kaya e Turkoglu 2017) |
| ICP MS | 2,27 | (OROIAN et al., 2016) |
| ICP MS | 10,0 | Levantamento de dados |
| ICP MS | 13,3 | (DE LA CRUZ et al., 2018) |
| HG ICP OES | 50,0 a 5.000 | Levantamento de dados |
| MIP OES | 76,7 | (GALLEGO RÍOS et al., 2018) |
| ET AAS | 100 | (PEREIRA et al., 2016) |
| HG AFS | 200 | (WANG; CUI; XU, 2016) |
| ET AAS | 257 | (OLIVEIRA et al., 2016) |

Em nossa pesquisa de dados, foi possível observar que o ICP MS apresentou um LOQ variando de 0,04 a 4,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ em líquidos, 1,50 a 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em sólidos e 10,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em bioindicadores (Tab. 2). No entanto, em amostras de água, alguns estudos têm LOQ consideravelmente menor, como 0,0007 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BOLEA-FERNANDEZ et al., 2015). Porém, a maioria dos valores observados está próxima da faixa (0,04 a 4,00 $\mu\text{g L}^{-1}$), como 0,21 $\mu\text{g L}^{-1}$ (KOMOROWICZ; BARAŁKIEWICZ, 2016), 0,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ (GARCÍA-RICO et al., 2019), 0,46 $\mu\text{g L}^{-1}$ (KILIC; CENGIZ; KILIC, 2018) e 0,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MACHADO et al., 2017). Nos bioindicadores, alguns estudos mostraram valores próximos aos observados no presente levantamento de dados, enquanto outros apresentaram valores mais baixos. Por exemplo, KHAN et al. (2015) obteve 0,09 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ao analisar algas e KAYA; TURKOGLU (2017) encontraram 0,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de peixes. OROIAN et al. (2016) observaram 2,27 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in de amostras de mel e DE LA CRUZ et al. (2018) encontraram 13,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em tecidos vegetais.

O ET AAS mostrou um LOQ entre 0,05 e 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostras líquidas e entre 50,0 e 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em sólidos (Tab. 2). Estudos utilizando a mesma técnica também apresentam resultados semelhantes em líquidos que variam de 0,006 $\mu\text{g L}^{-1}$ (HASSANPOOR; KHAYATIAN; AZAR, 2015) e 4,60 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MAKOWSKA et al., 2018). Em amostras sólidas (solos), NIELSEN et al. (2011) obteve um valor consideravelmente mais baixo (7,40 $\mu\text{g kg}^{-1}$) do que o presente levantamento de dados. Baig et al. (2010) obtiveram 0,08 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de bioindicadores (milho) e Oliveira et al. (2016) relataram 257 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ao analisar arroz. Já PEREIRA et al. (2016) encontraram 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ao analisar o óleo de peixe.

As duas técnicas que usam HG apresentaram valores LOQ semelhantes. O HG AAS apresentou um LOQ variando de 0,1 a 11 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostras líquidas e de 10 a 6.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras sólidas; enquanto o HG ICP OES variou de 0,1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostras líquidas, de 1,0 a 20.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras sólidas e de 50 a 5.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em bioindicadores (Tab 2). Outros estudos utilizando HG apresentaram valores dentro dos mesmos intervalos encontrados. Ao usar o HG AAS para analisar a água, AKTER et al. (2005) obteve 0,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ e WATERLOT; DOUAY (2015) 0,41 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em solos GÜRLEYÜK; F. TYSON; UDEN (2000) obteve 0,67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e em sedimentos REZENDE et al. (2011) encontraram 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Ao usar o HG ICP OES para analisar solos, SOUZA et al. (2016) e ALCÂNTARA et al. (2011) obtiveram 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, PAYE et al. (2010) 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e KIM et al. (2019) 830 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Algumas técnicas são utilizadas por poucos laboratórios, como UV VIS e FAAS. O UV VIS apresentou um LOQ variando de 4 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostras líquidas e o FAAS apresentou 100.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras sólidas (Tab. 2). Essas técnicas também são menos

utilizadas em trabalhos científicos que, além das técnicas discutidas anteriormente, utilizam técnicas que envolvem fluorescência, plasma induzido por micro-ondas, detector de captura de elétrons e raios-X em diversas matrizes. Em amostras de solo, PIERANGELI et al. (2015) utilizou TXRF e obteve $33,3 \mu\text{g L}^{-1}$, ZHONG et al. (2019) com cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons (GC ECD) encontrado $480 \mu\text{g kg}^{-1}$ e KIM et al. (2019) com PXRF relatou $1.670 \mu\text{g kg}^{-1}$. Analisando amostras em peixes, GALLEGO RÍOS et al. (2018) obtiveram $76,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ usando MIP OES e em amostras de *Eisenia fetida*, WANG; CUI; XU (2016) obtiveram $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ with HG AFS.

A Tabela 3 apresenta o LOQ para as espécies de As obtidas usando diferentes técnicas analíticas e compará-lo com o mostrado em estudos envolvendo a quantificação de As nas três matrizes consideradas no presente levantamento de dados. Apenas um laboratório é credenciado para a especiação. No entanto, não abrange todas as espécies analisadas em estudos científicos, quantificando apenas as espécies As III, As V, Arsênico Monometílico (MMA), Arsênico Dimetílico (DMA) e Betaína Arsênico (AsB). Espécies como óxido de trimetilarsina (TMAO) encontradas em plantas BERGQVIST; GREGER, (2012) ou Arsenocolino (AsC) encontrados em animais marinhos (RABER et al., 2012), não são acreditados por nenhum laboratório brasileiro.

O LOQ para as espécies de As em amostras líquidas foi de $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tab. 3) para As III, As V, MMA, DMA e AsB. Estes valores são semelhantes a outros relatórios que usaram técnicas semelhantes para determinar espécies de As. Um estudo apresentou menor LOQ ao usar extração em fase sólida (SPE) acoplada ao ET AAS, obtendo $0,006 \mu\text{g L}^{-1}$ na determinação de As (III) e As (V), mas deve-se notar que outras espécies não foram determinadas (HASSANPOOR; KHAYATIAN; AZAR, 2015). Utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) combinada com ICP MS, LIU; CAI (2013) obtiveram valores entre $0,13$ e $1,66 \mu\text{g L}^{-1}$, KOMOROWICZ; BARAŁKIEWICZ (2016) entre $0,22$ e $0,39 \mu\text{g L}^{-1}$ e CHENG et al. (2018) entre $3,00$ e $5,90 \mu\text{g L}^{-1}$ para a determinação de As III, As V, MMA e DMA. Onde além das espécies anteriores, KOMOROWICZ; BARAŁKIEWICZ (2016) também determinou AsB e LIU; CAI (2013) ROX e AsA quantificados. AKTER et al. (2005) utilizou HG AAS e obteve entre $0,33$ e $0,63 \mu\text{g L}^{-1}$ para determinação de As III e DMA. WATERLOT; DOUAY (2015) encontraram $0,41 \mu\text{g L}^{-1}$ ao determinar As III e V pela mesma técnica. Usando LC ICP MS, AKTER et al. (2005) obtidos entre $0,33$ e $0,67 \mu\text{g L}^{-1}$ para a determinação de As III, As V, DMA e MMA. Alguns estudos têm valores mais altos de LOQ porque usam técnicas menos sensíveis, como GÜRKAN; KIR; ALTUNAY (2015) que obteve $3,00 \mu\text{g L}^{-1}$ para As V ao usar o UV VIS. Com CE UV LEE; KWON; CHUNG (2018) obtiveram valores entre $7,90$ e $20,0 \mu\text{g}$

L⁻¹ para As III, As V, MMA e DMA e AKTER et al. (2005) relataram entre 300 e 1600 µg L⁻¹ para As III, Como V e DMA.

Tabela 3 - LOQ (Limites de quantificação) de espécies As por técnica analítica, em amostras líquidas, sólidas e bioindicadores observadas no presente levantamento de dados e comparação com outros trabalhos

| Técnica | LOQ | Referência |
|---|-------------|-------------------------------------|
| Amostras líquidas (µg L⁻¹) | | |
| SPE ET AAS | 0,006 | (HASSANPOOR; KHAYATIAN; AZAR, 2015) |
| HPLC ICP MS | 0,13 a 1,66 | (LIU; CAI, 2013) |
| HPLC ICP MS | 0,22 a 0,39 | (KOMOROWICZ; BARAŁKIEWICZ, 2016) |
| HPLC ICP MS | 0,25 | Levantamento de dados |
| HG AAS | 0,33 a 0,63 | (AKTER et al., 2005) |
| LC ICP MS | 0,33 a 0,67 | (AKTER et al., 2005) |
| HG AAS | 0,41 | (WATERLOT; DOUAY, 2015) |
| HPLC ICP MS | 3,00 a 5,90 | (CHENG et al., 2018) |
| UV VIS | 3,00 | (GÜRKAN; KIR; ALTUNAY, 2015) |
| CE UV | 7,90 a 20,0 | (LEE; KWON; CHUNG, 2018) |
| CE UV | 300 a 1.600 | (AKTER et al., 2005) |
| Amostras sólidas e bioindicadores (µg kg⁻¹) | | |
| HPLC HG ICP OES | 0,06 a 0,20 | (KHAN et al., 2015) |
| HPLC HG ICP OES | 0,40 a 0,70 | (GARCÍA-RICO et al., 2019) |
| HPLC HG ICP OES | 0,70 a 3,00 | (MA et al., 2016) |
| HPLC HG ICP OES | 1,30 a 3,30 | (AL-ASSAF; TYSON; UDEN, 2009) |
| HPLC ICP MS | 0,05 | (WOLF et al., 2011) |
| HG AFS | 0,70 a 3,00 | (WANG et al., 2018) |
| IC ICP MS | 0,10 a 0,20 | (ZHU et al., 2017) |
| HG AAS | 0,07 a 0,10 | (SANTOS et al., 2018) |
| HPLC ICP MS | 12,5 | Levantamento de dados |
| HG AFS | 400 a 1.000 | (WANG; CUI; XU, 2016) |

Para as espécies As em amostras sólidas e bioindicadores, o LOQ foi de 12,5 µg kg⁻¹ (Tab. 3) para As III, As V, MMA, DMA e AsB. O LOQ dos laboratórios foi consideravelmente menor do que o alcançado por WANG et al. (2018) que obteve valores entre 400 e 1000 µg kg⁻¹ para a determinação de As III, V, DMA e MMA em *Eisenia fetida* usando HG AFS. Outros estudos obtiveram menores valores de LOQ em várias matrizes e técnicas analíticas, principalmente usando HPLC HG ICP OES, como em KHAN et al. (2015) com LOQ entre 0,06 e 0,20 µg kg⁻¹ para MMA, AsB, As V, DMA, AsC e As III em algas. Para quantificação de As (III), As (V), MMA e DMA usando a mesma técnica, GARCÍA-RICO et al. (2019) encontraram valores variando de 0,40 a 0,70 µg L⁻¹ em urina. MA et al. (2016) encontraram valores entre 0,70 e 3,00 µg kg⁻¹ no arroz e AL-ASSAF; TYSON; UDEN (2009) relataram valores entre 1,30 e 3,30 µg L⁻¹ em solos. Usando o HPLC ICP MS, WOLF et al. (2011) obteve 0,05 µg L⁻¹ para As III e V em solos. Trabalhando com amostras de arroz, WANG et al. (2018) mostraram

valores de 0,70 a 3,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com HG AFS. ZHU et al. (2017) encontraram valores mais baixos entre 0,10 e 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ com cromatografia iônica (CI) combinada com ICP MS. Usando HG AAS, SANTOS et al. (2018) obtiveram valores entre 0,07 e 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para As III e V em peixes.

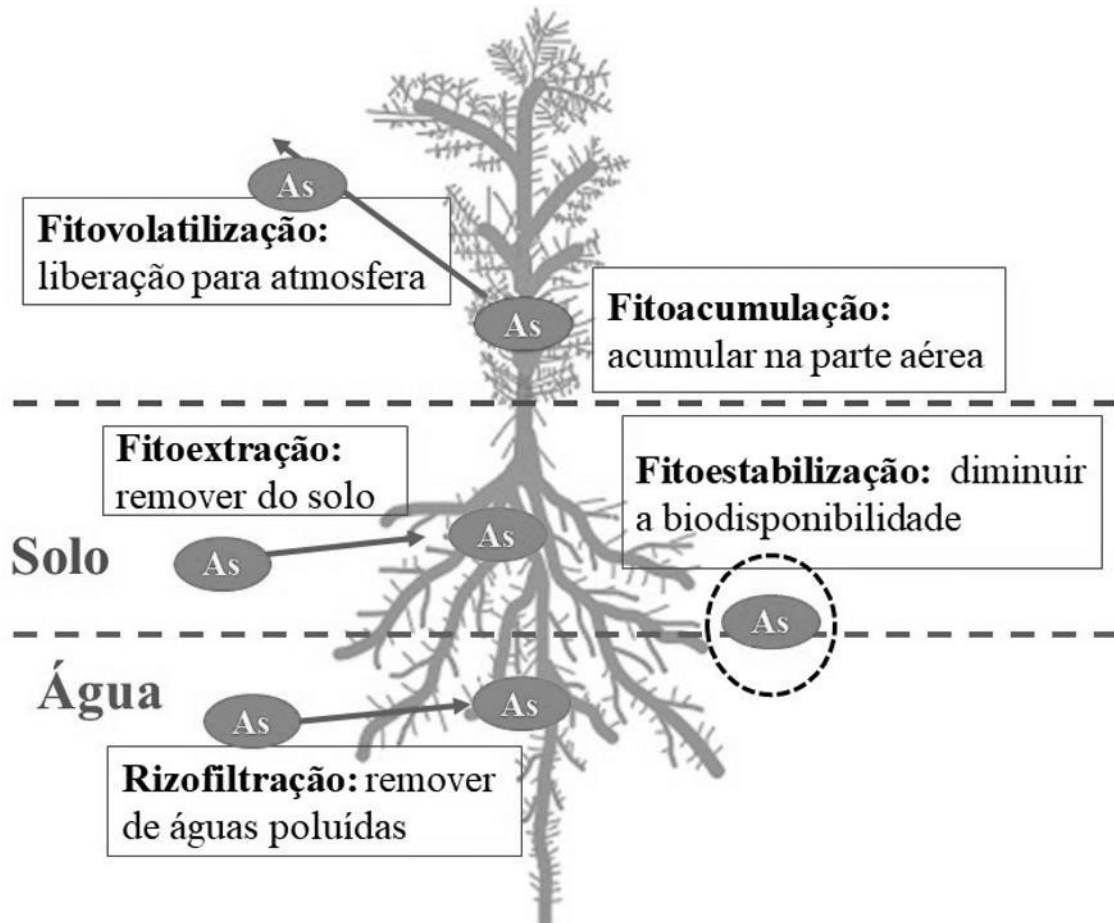
Conclusões

Existe uma grande discrepância entre o número de laboratórios acreditados e as técnicas analíticas por estado e região no Brasil. Foi observada uma forte correlação entre o PIB e o número de laboratórios acreditados. Quase todos os laboratórios foram capazes de confirmar a contaminação ambiental, pois apresentaram valores de LOQ inferiores ao limiar ambiental. As técnicas analíticas classificadas do menor para o maior valor LOQ são: ICP MS, ET AAS, HG AAS ou HG ICP OES e UV VIS para matrizes líquidas; HG ICP OES, ICP MS, HG AAS, ET AAS e FAAS para sólidos; e ICP MS, HG e ICP OES para bioindicadores. Apenas um laboratório é credenciado para a análise de espécies As, mas não abrange todas as espécies.

3.2 Fitorremediação de arsênio

A fitorremediação é um conjunto de tecnologias que utiliza plantas selecionadas para degradar, extrair, conter ou imobilizar contaminantes do solo e da água (PRASAD; DE OLIVEIRA FREITAS, 2003; TANGAHU et al., 2011). Para substâncias inorgânicas em solos, seus processos podem ser divididos em estratégias de remoção (fitoextração/fitoacumulação), imobilização (fitoestabilização) ou volatilização (fitovolatilização) (ALKA et al., 2020; PANDEY et al., 2018; SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019). Para águas contaminadas inclui-se a rizofiltração (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019) e para substâncias orgânicas ocorre também a fitodegradação (TANGAHU et al., 2011). Na figura 3 são ilustrados os processos de fitorremediação de As em solos e águas.

Figura 3 - Processos de fitorremediação de arsênio em solos e águas contaminadas.



Adaptado de (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019)

Os processos de remoção (fitoextração/rizofiltração/fitoacumulação) (Fig. 3) correspondem à captação do As pelas raízes das plantas, seguida da translocação e acumulação na parte aérea (ALKA et al., 2020; PANDEY et al., 2018; SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019). Plantas tolerantes tendem restringir a absorção e a translocação, enquanto plantas

hiperacumuladoras absorvem e translocam ativamente (FITZ; WENZEL, 2002) os contaminantes. São conhecidas cerca de 400 plantas hiperacumuladoras de metais, mas até o momento, poucas apresentaram evidências de hiperacumular de As (HASANUZZAMAN et al., 2015), ou seja, acumular uma concentração acima de 1.000 mg Kg^{-1} nas folhas (REEVES, 2006).

A fitoestabilização (Fig. 3) é a diminuição da mobilidade e biodisponibilidade, a fim de minimizar a erosão, lixiviação, transporte, fitoextração e possível biomagnificação (BOLAN et al., 2011; SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019; SINGH et al., 2015). Os exsudatos radiculares estimulam a atividade microbiana e liberação de enzimas redox com a capacidade de estabilização de metais, podendo também convertê-los em formas imobilizadoras complexas na rizosfera (WUANA; OKIEIMEN, 2011) e melhorar as características químicas e biológicas de solos e águas contaminadas (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019; SINGH et al., 2015). Alguns ácidos exsudados como acéticos, os ácidos butírico, cítrico, fumárico, láctico, málico, malônico, oxálico, propiônico, tartárico, succínico etc. alteram a dinâmica de metais na solução do solo por acidificação, quelação, complexação, precipitação, reações redox e atividade microbiana (BOLAN et al., 2011).

A fitovolatilização (Fig. 3) é a conversão em formas orgânicas e voláteis menos tóxicas, seguida da liberação para atmosfera. Para substâncias inorgânicas o processo só ocorre em metais e metaloides que apresentam espécies voláteis, como mercúrio (Hg), selênio (Se) e As, sendo sua aplicação questionável, por apresentar risco de intoxicação (PADMAVATHIAMMA; LI; KUMARI, 2008).

A fitotoxicidade do As provoca uma infinidade de danos inibindo a germinação, crescimento e desenvolvimento das plantas (YADAV et al., 2014). O As induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), pode perturbar o estado redox e afetar a homeostase energética das plantas (SRIVASTAVA et al., 2011). A produção de ERO resulta de dois tipos de vias (FOYER; NOCTOR, 2005): (1) formação de oxigênio singlete através da excitação de O_2 e (2) a formação de radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO^-) através da transferência de um, dois e três elétrons para O_2 , respectivamente. Um aumento na produção de ERO leva ao estresse oxidativo devido aos efeitos combinados da peroxidação lipídica da membrana, oxidação de proteínas e danos ao DNA (SRIVASTAVA et al., 2011).

Ao absorver o As a planta modula várias vias para lidar com o seu estresse (RAHMAN et al., 2014), controlando a concentração celular de íons livres do metaloide a um nível mínimo e reduzindo seus danos. As plantas respondem ao estresse oxidativo aumentando

a produção de antioxidantes de baixo peso molecular (glutathiona e ascorbato) (KHAN; AHMAD; IQBAL, 2009; SRIVASTAVA; D'SOUZA, 2010) ou a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT)) (KHAN; AHMAD; IQBAL, 2009; SRIVASTAVA; D'SOUZA, 2010).

3.3 Efeito das substâncias húmicas na fitodisponibilidade de metais

Substâncias húmicas são os principais componentes da matéria orgânica do solo e sua ação no crescimento das plantas é bem documentada (CANELLAS; OLIVARES, 2014). Atualmente a definição mais aceita para a sua estrutura química é que as SH são uma associação supramolecular de moléculas heterogêneas estabilizadas por ligações fracas, que podem ser rompidas por ácidos orgânicos (PICCOLO, 2002). De acordo com a solubilidade em meio aquoso, as substâncias húmicas são classicamente divididas em três frações: ácidos fúlvicos (AF), solúveis em pH ácido ou alcalino; ácidos húmicos (AH) solúveis em pH alcalino; e humina (HU), insolúvel em qualquer pH (HAYES, 1998). No arranjo supramolecular das SH existem pequenas moléculas bioativas, como a auxina que podem estar relacionadas com o sua à indução do surgimento da raiz lateral e à ativação da enzima H^+ -ATPase (CANELLAS; OLIVARES, 2014). As SH também promovem aumento dos pelos radiculares (CANELLAS et al., 2009) maior capacidade da planta em absorver nutrientes e promovem a formação de aminoácidos e proteínas que levam a uma maior taxa fotossintética (CANELLAS et al., 2005, 2013, 2019).

A utilização de materiais orgânicos para amenizar os efeitos tóxicos de metais em plantas já é explorada desde a década de 1970 (WALLACE et al., 1977; WERFF; OUT, 1981; WHITE; CHANEY, 1980) e inclusive com utilização de AH e AF para potencializar a fitoextração de Ag, na década de 1980 (JONES; PETERSON, 1986). Entretanto só recentemente intensificaram os trabalhos avaliando a ação de SH na fitodisponibilidade de metais. Estes estudos vêm abrangendo várias espécies vegetais, mas se concentram principalmente em Cd, Pb e Cu (Tab. 4).

Tabela 4 - Trabalhos envolvendo a ação de frações húmicas na fitodisponibilidade de metais e metaloides em solos e meio hidropônico

| Contaminante | Substrato | Especie vegetal | Fitodisponibilidade | Citação |
|--------------|------------|---------------------------------|---------------------|--|
| Ag | Solo | <i>Lolium perenne</i> | Aumentou | (JONES; PETERSON, 1986) |
| Cd | Solo | <i>Nicotiana tabacum</i> | Aumentou | (EVANGELOU; DAGHAN; SCHAEFFER, 2004) |
| Pb e Cd | Solo | <i>Triticum aestivum</i> | Aumentou | (CHEN; ZHU, 2006) |
| B e Pb | Solo | <i>Chrysopogon zizanioides</i> | Aumentou | (ANGIN et al., 2008) |
| Cu e Cd | Solo | <i>Elodea nuttallii</i> | Reduziu | (WANG et al., 2010) |
| Pb | Hidroponia | <i>Vicia faba</i> | Reduziu | (SHAHID et al., 2012) |
| Pb e Cd | Solo | <i>N. tabacum</i> | Reduziu | (ZHANG et al., 2013) |
| Cu e Zn | Solo | <i>C. zizanioides</i> | Aumentou | (VARGAS et al., 2016) |
| Pb | Solo | <i>Zea mays</i> | Aumentou | (SHAFIGH; GHASEMI-FASAEI; RONAGHI, 2016) |
| Cd | Solo | <i>Brassica rapa</i> | Reduziu | (KHAN et al., 2017) |
| Cd | Hidroponia | <i>Avicennia germinans</i> | Reduziu | (PITTARELLO et al., 2018) |
| Fe | Hidroponia | <i>Schinus terebinthifolius</i> | Reduziu | (DOBBSS et al., 2018) |
| Cd, Cu e Zn | Hidroponia | <i>Raphanus sativus</i> | Reduziu | (ONDRASEK; RENGEL; ROMIC, 2018) |
| As | Solo | <i>Daucus carota</i> | Reduziu | (CAPORALE et al., 2018) |
| Se e Cd | Solo | <i>Oryza sativa</i> | Reduziu | (ZHANG et al., 2019) |

Os primeiros trabalhos foram realizados em solos e de maneira geral observaram que SH aumentaram a fitobiodisponibilidade de metais e sua concentração no tecido vegetal (Tab. 4). JONES; PETERSON (1986) observaram que a aplicação de AH e AF aumentou a concentração de Ag em *Lolium perenne* (Azevém) cultivada em solo contaminado. EVANGELOU; DAGHAN; SCHAEFFER (2004) observaram que AH aumentaram a fitodisponibilidade de Cd, aumentando a concentração em *Nicotiana tabacum* (Tabaco). CHEN; ZHU (2006) aplicaram AH na água de irrigação e observaram aumento na concentração de Pb e Cd em *Triticum aestivum* (Trigo). ANGIN et al. (2008) observaram que adição de AH aumentou a concentração de B e Pb em *Chrysopogon zizanioides* (Capim-vetiver), mantendo o rendimento de biomassa mesmo em solo contaminado.

Apesar dos primeiros trabalhos concordarem quanto o aumento da fitodisponibilidade, o solo é um sistema complexo (WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2013) e num segundo momento os trabalhos apresentaram discordância (Tab. 4), uma vez que alguns continuaram apontando para o aumento (SHAFIGH; GHASEMI-FASAEI; RONAGHI, 2016; VARGAS et al., 2016) e outros para redução (CAPORALE et al., 2018; KHAN et al., 2017; WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2019, 2013). SHAFIGH; GHASEMI-FASAEI; RONAGHI (2016) observaram aumento da concentração de Pb em *Zea mays* (Milho) e VARGAS et al. (2016) de Cu e Zn em *C. zizanioides*, ambos tratados com AH. WANG et al. (2010) observaram redução da concentração de Cu e Cd em *Elodea nuttallii* tratada com AH. ZHANG et al. (2013) tratou *N. tabacum* com AH e AF e também observaram redução da concentração de Pb e Cd. Mais recentemente com aplicação de AH, CAPORALE et al. (2018) observaram redução da concentração de As em *Daucus carota* (Cenoura) e ZHANG et al. (2019) nas concentrações de Se e Cd em *Oryza sativa* (Arroz). Para ZHANG et al. (2013), a discordância ocorre pela complexidade dos mecanismos de SH, que aumentam a fitodisponibilidade em solos alcalinos e reduzindo em solos ácidos. Posteriormente isso foi reforçado por KHAN et al. (2017) que observou redução na concentração de Cd em *Brassica rapa* (Nabo) cultivada em solo ácido e não observou alteração em solo alcalino.

Em meio a complexidade dos mecanismos envolvendo frações húmicas e a biodisponibilidade de metais em solos (KHAN et al., 2017; ZHANG et al., 2013), alguns trabalhos recentes tem utilizado o meio hidropônico (Tab. 4) e observado que, quando em concentrações tóxicas na solução, ocorre redução na concentração do metal no tecido vegetal (DOBBSS et al., 2018; ONDRASEK; RENGEL; ROMIC, 2018; PITTARELLO et al., 2018; SHAHID et al., 2012). Com a aplicação de SH, PITTARELLO et al. (2018) observaram redução da concentração de Cd em *Avicennia germinans* (Mangue preto) e DOBBSS et al. (2018)

observaram a redução da concentração de Fe em *Schinus terebinthifolius* (Aroeira). ONDRASEK; RENGEL; ROMIC (2018) aplicaram AH em *Raphanus sativus* (Rabanete) e reduziram as concentrações de metais (Cd, Cu e Zn) no tecido vegetal. SHAHID et al. (2012) também observaram redução na concentração de Pb em *Vicia faba* (Fava) tratada com AF, entretanto, quando investigaram a ação em concentração mais baixa de Pb (não tóxica) na solução houve aumento da concentração no vegetal.

Referências

- ABDUL, K. S. M. et al. Arsenic and human health effects: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 828–846, nov. 2015.
- AKTER, K. F. et al. Speciation of arsenic in ground water samples: A comparative study of CE-UV, HG-AAS and LC-ICP-MS. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 406–415, 15 dez. 2005.
- AL-ASSAF, K. H.; TYSON, J. F.; UDEN, P. C. Determination of four arsenic species in soil by sequential extraction and high performance liquid chromatography with post-column hydride generation and inductively coupled plasma optical emission spectrometry detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 4, p. 376, 2009.
- ALCÂNTARA, A. J. DE O. et al. Teores de As, Cd, Pb, Cr e Ni e atributos de fertilidade de Argissolo Amarelo distrófico usado como lixão no município de Cáceres, estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 41, n. 3, p. 539–548, 1 set. 2011.
- ALKA, S. et al. The role of plant growth promoting bacteria on arsenic removal: A review of existing perspectives. **Environmental Technology & Innovation**, v. 17, p. 100602, fev. 2020.
- ANGIN, I. et al. Humic Acid Addition Enhances B and Pb Phytoextraction by Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 188, n. 1–4, p. 335–343, 1 fev. 2008.
- BAIG, J. A. et al. Evaluating the accumulation of arsenic in maize (*Zea mays* L.) plants from its growing media by cloud point extraction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3051–3057, nov. 2010.
- BERGQVIST, C.; GREGER, M. Arsenic accumulation and speciation in plants from different habitats. **Applied Geochemistry**, v. 27, n. 3, p. 615–622, mar. 2012.
- BERTIN, P. N. et al. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. **The ISME Journal**, v. 5, n. 11, p. 1735–1747, 12 nov. 2011.
- BIDONE, E. et al. Hydrogeochemistry of arsenic pollution in watersheds influenced by gold

mining activities in Paracatu (Minas Gerais State, Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8546–8555, 2016.

BIDONE, E. et al. Mass balance of arsenic fluxes in rivers impacted by gold mining activities in Paracatu (Minas Gerais State, Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 9, p. 9085–9100, 16 mar. 2018.

BOLAN, N. S. et al. **Phytostabilization. A green approach to contaminant containment**. v. 112

BOLEA-FERNANDEZ, E. et al. Interference-free determination of ultra-trace concentrations of arsenic and selenium using methyl fluoride as a reaction gas in ICP–MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 3, p. 919–929, 27 jan. 2015.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTI, J. A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 57, n. 1, p. 45–51, mar. 2004.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; MATSCHULLAT, J. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. **Environmental Geology**, v. 1, n. 1, p. 1–1, 2003.

BRASIL. **Resolução Conama (Conselho Nacional de Meio Ambiente) nº 357, de 17 de março de 2005**. Brasil, 2005. Disponível em:

<<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>

BRASIL. **Resolução Conama (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Brasil, 2009. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>

BRASIL. **Resolução Conama (Conselho Nacional de Meio Ambiente) nº 430, de 13 de maio de 2011**. Brasil, 2011. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 193, de 12 de dezembro de 2017**. Brasília-DF, 2017. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3285555/RDC_44_2012_.pdf/a2489836-8233-40bc-b880-c7719ae356fc>

BUNDSCHUH, J. et al. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. **Science of The Total Environment**, v. 429, p. 2–35, jul. 2012.

CANELLAS, L. P. et al. Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas. In: CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. D. A.

(Eds.). **Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. v. 1 ed. Campos dos Goytacazes. p. 224–243.

CANELLAS, L. P. et al. Relationships Between Chemical Characteristics and Root Growth Promotion of Humic Acids Isolated From Brazilian Oxisols. **Soil Science**, v. 174, n. 11, p. 611–620, nov. 2009.

CANELLAS, L. P. et al. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1–2, p. 119–132, 23 maio 2013.

CANELLAS, L. P. et al. Humic acids increase the maize seedlings exudation yield. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2019.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 3, 2014.

CAPORALE, A. G. et al. May humic acids or mineral fertilisation mitigate arsenic mobility and availability to carrot plants (*Daucus carota* L.) in a volcanic soil polluted by As from irrigation water? **Chemosphere**, v. 193, p. 464–471, 2018.

CHEN, B.; ZHU, Y.-G. Humic Acids Increase the Phytoavailability of Cd and Pb to Wheat Plants Cultivated in Freshly Spiked, Contaminated Soil (7 pp). **Journal of Soils and Sediments**, v. 6, n. 4, p. 236–242, 1 out. 2006.

CHENG, H. et al. Coupling nanoliter high-performance liquid chromatography to inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 7, p. 1524–1531, abr. 2018.

COSTA, R. DE V. F. DA et al. Geochemical mapping of arsenic in surface waters and stream sediments of the Quadrilátero Ferrífero, Brazil. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 68, n. 1, p. 43–51, mar. 2015.

DA SILVA JÚNIOR, E. C. et al. Natural variation of arsenic fractions in soils of the Brazilian Amazon. **Science of The Total Environment**, v. 687, n. June, p. 1219–1231, out. 2019.

DE LA CRUZ, A. et al. Biomonitoring of Toxic Elements in Plants Collected Near Leather Tanning Industry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2018.

DESCHAMPS, E. et al. Soil and Sediment Geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil The Case of Arsenic. **Journal of Soils & Sediments**, v. 2, n. 4, p. 216–222, 2002.

DOBBSS, L. B. et al. Alleviation of iron toxicity in *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*) by humic substances. **Environmental Science and Pollution Research**, 2018.

- DOS REIS, D. A. et al. The Relationship Between Human Adenovirus and Metals and Semimetals in the Waters of the Rio Doce, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 144–153, 11 jul. 2019.
- EVANGELOU, M. W. H.; DAGHAN, H.; SCHAEFFER, A. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. **Chemosphere**, v. 57, n. 3, p. 207–213, out. 2004.
- FITZ, W. J.; WENZEL, W. W. Fundamentals and Potential Application To Phytoremediation. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 259–278, 2002.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, n. 8, p. 1056–1071, ago. 2005.
- GALLEGO RÍOS, S. E. et al. Evaluation of Mercury, Lead, Arsenic, and Cadmium in Some Species of Fish in the Atrato River Delta, Gulf of Urabá, Colombian Caribbean. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 8, p. 275, 7 ago. 2018.
- GARCÍA-RICO, L. et al. Health Risk Assessment and Urinary Excretion of Children Exposed to Arsenic through Drinking Water and Soils in Sonora, Mexico. **Biological Trace Element Research**, v. 187, n. 1, p. 9–21, 2 jan. 2019.
- GROCHAU, I. H.; CATEN, C. S. TEN; DE CAMARGO FORTE, M. M. Current American landscape in laboratory accreditation according to ISO/IEC 17025. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 22, n. 2, p. 57–62, 24 abr. 2017.
- GÜRKAN, R.; KIR, U.; ALTUNAY, N. Development of a simple, sensitive and inexpensive ion-pairing cloud point extraction approach for the determination of trace inorganic arsenic species in spring water, beverage and rice samples by UV–Vis spectrophotometry. **Food Chemistry**, v. 180, p. 32–41, ago. 2015.
- GÜRLEYÜK, H.; F. TYSON, J.; UDEN, P. C. Determination of extractable arsenic in soils using slurry sampling-on-line microwave extraction-hydride generation-atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 55, n. 7, p. 935–942, jul. 2000.
- HASANUZZAMAN, M. et al. Arsenic Toxicity in Plants and Possible Remediation. In: **Soil Remediation and Plants**. Elsevier, 2015. p. 433–501.
- HASSANPOOR, S.; KHAYATIAN, G.; AZAR, A. R. J. Ultra-trace determination of arsenic species in environmental waters, food and biological samples using a modified aluminum oxide nanoparticle sorbent and AAS detection after multivariate optimization. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 11–12, p. 1957–1965, 6 ago. 2015.
- HAYES, M. H. . Humic substances: Progress towards more realistic concepts of structures.

- In: DAVIES, G. ; GHABBOUR, E. A. (Ed.). . **Humic substances: Structures, properties and uses**. Cornwall: MPG Books, 1998. p. 1–27.
- HUNG, D. Q.; NEKRASSOVA, O.; COMPTON, R. G. Analytical methods for inorganic arsenic in water: a review. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 269–277, 8 out. 2004.
- INMETRO. **Inmetro - Consulta ao Catálogo da RBLE**. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/>>. Acesso em: 24 jul. 2018.
- JONES, K. C.; PETERSON, P. J. The influence of humic and fulvic acids on silver uptake by perennial ryegrass, and its relevance to the cycling of silver in soils. **Plant and Soil**, v. 95, n. 1, p. 3–8, fev. 1986.
- KAYA, G.; TURKOGLU, S. Bioaccumulation of Heavy Metals in Various Tissues of Some Fish Species and Green Tiger Shrimp (*Penaeus semisulcatus*) from İskenderun Bay, Turkey, and Risk Assessment for Human Health. **Biological Trace Element Research**, v. 180, n. 2, p. 314–326, 28 dez. 2017.
- KHAN, I.; AHMAD, A.; IQBAL, M. Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 626–634, fev. 2009.
- KHAN, K. Y. et al. Effect of humic acid amendment on cadmium bioavailability and accumulation by pak choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* L.) to alleviate dietary toxicity risk. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 63, n. 10, p. 1431–1442, 24 ago. 2017.
- KHAN, N. et al. Determination of toxic heavy metals and speciation of arsenic in seaweeds from South Korea. **Food Chemistry**, v. 169, p. 464–470, fev. 2015.
- KILIC, S.; CENGIZ, M. F.; KILIC, M. Monitoring of metallic contaminants in energy drinks using ICP-MS. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 4, p. 202, 9 abr. 2018.
- KIM, H.-R. et al. Better assessment of the distribution of As and Pb in soils in a former smelting area, using ordinary co-kriging and sequential Gaussian co-simulation of portable X-ray fluorescence (PXRF) and ICP-AES data. **Geoderma**, v. 341, n. July 2018, p. 26–38, maio 2019.
- KOMOROWICZ, I.; BARAŁKIEWICZ, D. Determination of total arsenic and arsenic species in drinking water, surface water, wastewater, and snow from Wielkopolska, Kujawy-Pomerania, and Lower Silesia provinces, Poland. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 9, p. 504, 4 set. 2016.
- KUMAR, D. et al. Effect of Arsenic on Growth, Arsenic Uptake, Distribution of Nutrient Elements and Thiols in Seedlings of *Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb. **International**

Journal of Phytoremediation, v. 17, n. 2, p. 128–134, fev. 2015.

LEE, H. G.; KWON, J. Y.; CHUNG, D. S. Sensitive arsenic speciation by capillary electrophoresis using UV absorbance detection with on-line sample preconcentration techniques. **Talanta**, v. 181, n. October 2017, p. 366–372, maio 2018.

LIU, G.; CAI, Y. Studying arsenite–humic acid complexation using size exclusion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p. 1223–1229, nov. 2013.

LIU, Q. et al. Speciation of arsenic – A review of phenylarsenicals and related arsenic metabolites. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 104, p. 171–182, jul. 2018.

MA, J. et al. Speciation and detection of arsenic in aqueous samples: A review of recent progress in non-atomic spectrometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 831, p. 1–23, jun. 2014.

MA, L. et al. Arsenic speciation in locally grown rice grains from Hunan Province, China: Spatial distribution and potential health risk. **Science of The Total Environment**, v. 557–558, p. 438–444, jul. 2016.

MACHADO, C. S. et al. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20160–20172, 2017.

MAKOWSKA, D. et al. Assessment of the content, occurrence, and leachability of arsenic, lead, and thallium in wastes from coal cleaning processes. **Environmental Science and Pollution Research**, 13 nov. 2018.

MALLICK, S. et al. Role of sulfate in detoxification of arsenate-induced toxicity in *Zea mays* L. (SRHM 445): nutrient status and antioxidants. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 2, p. 140–154, jun. 2013.

MARTINS, G. C. et al. Assessing the Brazilian prevention value for soil arsenic: Effects on emergence and growth of plant species relevant to tropical agroecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 694, p. 133663, 2019.

MINAS GERAIS. **Inventário de áreas contaminadas de minas gerais 2018**. Belo Horizonte. Disponível em:

<http://www.feam.br/images/stories/2018/AREAS_CONTAMINADAS/Inventario_Areas_Co ntaminadas_2018.pdf>.

MINAS GERAIS. **Inventário de áreas contaminadas de Minas Gerais 2019**. Belo Horizonte. Disponível em: <<http://www.feam.br/gestao-de-areas-contaminadas/inventario-e-lista-de-areas-contaminadas>>.

MOE, B. et al. Comparative cytotoxicity of fourteen trivalent and pentavalent arsenic species determined using real-time cell sensing. **Journal of Environmental Sciences**, v. 49, p. 113–124, nov. 2016.

NG, J. C. et al. Health risk apportionment of arsenic from multiple exposure pathways in Paracatu, a gold mining town in Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 673, p. 36–43, 2019.

NIELSEN, S. S. et al. Amendment of arsenic and chromium polluted soil from wood preservation by iron residues from water treatment. **Chemosphere**, v. 84, n. 4, p. 383–389, jul. 2011.

OLIVEIRA, R. M. DE et al. Evaluation of sample preparation methods for the determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 402–409, jan. 2016.

ONDRASEK, G.; RENGEL, Z.; ROMIC, D. Humic acids decrease uptake and distribution of trace metals, but not the growth of radish exposed to cadmium toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 151, p. 55–61, abr. 2018.

ONO, F. B. et al. Arsenic bioaccessibility in a gold mining area: a health risk assessment for children. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 34, n. 4, p. 457–465, 18 ago. 2012.

OROIAN, M. et al. Heavy Metals Profile in Honey as a Potential Indicator of Botanical and Geographical Origin. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 8, p. 1825–1836, 2 ago. 2016.

PADMAVATHIAMMA, P. K.; LI, L. Y.; KUMARI, U. R. An experimental study of vermi-biowaste composting for agricultural soil improvement. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1672–1681, abr. 2008.

PANDEY, D. et al. Approaches for Remediation of Arsenic Contamination from Soil and Water: A Review. **International Journal of Life Sciences Research**, v. 6, n. September, p. 146–162, 2018.

PAYE, H. D. S. et al. Valores de referência de qualidade para metais pesados em solos no Estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 2041–2051, dez. 2010.

PEREIRA, É. R. et al. Investigation of chemical modifiers for the direct determination of arsenic in fish oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 150, p. 142–147, abr. 2016.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humic chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy**, 2002.

PIERANGELI, M. A. P. et al. Elementos-traço em áreas de vegetação nativa e agricultura intensiva do Estado de Mato Grosso determinados por fluorescência de raios -x por reflexão total. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 1048–1057, ago. 2015.

PITTARELLO, M. et al. Effects of different humic substances concentrations on root anatomy and Cd accumulation in seedlings of *Avicennia germinans* (black mangrove).

Marine Pollution Bulletin, v. 130, n. March, p. 113–122, maio 2018.

PITTARELLO, M. et al. Dissolved humic substances supplied as potential enhancers of Cu, Cd, and Pb adsorption by two different mangrove sediments. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 3, p. 1554–1565, 12 mar. 2019.

PRASAD, M. N. V.; DE OLIVEIRA FREITAS, H. M. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 3, 15 dez. 2003.

RABER, G. et al. An improved HPLC–ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 524–532, set. 2012.

RAHMAN, S. et al. Review of remediation techniques for arsenic (As) contamination: A novel approach utilizing bio-organisms. **Journal of Environmental Management**, v. 134, p. 175–185, fev. 2014.

REDE METROLÓGICA DE MINAS GERAIS. **RMMG - Laboratórios Reconhecidos**.

Disponível em: <<https://www.rmmg.com.br/laboratoriosreconhecidos>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

REDE METROLÓGICA DO RIO GRANDE DO SUL. **Laboratórios Reconhecidos - Rede**

Metrológica. Disponível em: <<http://www.redemetrologica.com.br/laboratorios-reconhecidos>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

REEVES, R. D. Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: **Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2006. p. 25–52.

REZENDE, P. S. et al. Arsenic and Mercury mobility in Brazilian sediments from the São Francisco River Basin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 910–918, maio 2011.

REZENDE, P. S.; COSTA, L. M.; WINDMÖLLER, C. C. Arsenic Mobility in Sediments from Paracatu River Basin, MG, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 3, p. 588–602, 12 abr. 2015.

RIO DE JANEIRO. **Gerenciamento de áreas contaminadas do estado do Rio de Janeiro**.

Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwew/mdy4/~edisp/inea0068530.pdf>>.

SAMUEL, S. et al. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of dl- α -lipoic acid. **Toxicology Letters**, v. 155, n. 1, p. 27–34, jan. 2005.

SANKARARAMAKRISHNAN, N.; MISHRA, S. A Comprehensive Review on Various Analytical Methods for the Determination of Inorganic and Organic Arsenic in Environmental Samples. In: AGARWAL A., AGARWAL R., L. N. (Ed.). . **Environmental Contaminants. Energy, Environment, and Sustainability**. Springer ed. Singapore. p. 21–41.

SANTANA, S. F. **Distribuição de Arsênio e Oxidação de Materiais Sulfetados de Áreas de Mineração de Ouro no Estado de Minas Gerais**. Universidade Federal de Viçosa, 2005.

SANTOS, G. R. DOS; PALES, R. C.; RODRIGUES, S. G. Desigualdades regionais no Brasil – 1991-2010. **InterScience Place**, v. 1, n. 31, p. 145–173, 23 dez. 2014.

SANTOS, Q. O. DOS et al. An online preconcentration system for speciation analysis of arsenic in seawater by hydride generation flame atomic absorption spectrometry.

Microchemical Journal, v. 143, n. August, p. 175–180, dez. 2018.

SANTOS, J. L. A. et al. Arsenic quantification techniques and ISO/IEC 17025 accreditation in Brazil. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 6, n. 14, p. 803–817, 2019.

SÃO PAULO. **Relatório de áreas contaminadas e reabilitadas**. São Paulo. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/wp-content/uploads/sites/17/2019/04/Texto-explicativo_dez-2018.pdf>.

SHAFIGH, M.; GHASEMI-FASAEI, R.; RONAGHI, A. Influence of plant growth regulators and humic acid on the phytoremediation of lead by maize in a Pb-polluted calcareous soil. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 12, p. 1733–1740, 2016.

SHAHID, M. et al. Effect of fulvic acids on lead-induced oxidative stress to metal sensitive *Vicia faba* L. plant. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 6, p. 689–697, 1 ago. 2012.

SHUKLA, A.; SRIVASTAVA, S. A Review of Phytoremediation Prospects for Arsenic Contaminated Water and Soil. In: **Phytomanagement of Polluted Sites**. Elsevier, 2019. p. 243–254.

SILVA, D. et al. Arsenic and trace metals in water and sediment of the velhas river, southeastern iron quadrangle region, Minas Gerais, Brazil. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 1011–1018, 2018.

SINGH, R. et al. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 247–270, 2015.

- SOUZA, J. J. L. L. DE et al. Geochemistry and spatial variability of metal(loid) concentrations in soils of the state of Minas Gerais, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 505, p. 338–349, fev. 2015.
- SOUZA, L. C. DE et al. Teores de Arsênio em solos de três regiões do estado de Santa Catarina. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, n. 1, p. 135–144, 26 jan. 2016.
- SRIVASTAVA, S. et al. Phytofiltration of arsenic from simulated contaminated water using *Hydrilla verticillata* in field conditions. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 11, p. 1937–1941, nov. 2011.
- SRIVASTAVA, S.; D’SOUZA, S. F. Effect of variable sulfur supply on arsenic tolerance and antioxidant responses in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 6, p. 1314–1322, set. 2010.
- TANGAHU, B. V. et al. A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2011, p. 1–31, 2011.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI. SISTEMA DE BIBLIOTECAS. **Manual de normalização: monografias, dissertações e teses / Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri**. 3. ed. Diamantina. 2019.
- VAMERALI, T. et al. Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). **Environmental Pollution**, v. 157, n. 3, p. 887–894, 2009.
- VAREJÃO, E. V. V. et al. Arsenic and trace metals in river water and sediments from the southeast portion of the Iron Quadrangle, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 172, n. 1–4, p. 631–642, 18 jan. 2011.
- VARGAS, C. et al. Phytoremediation of Cu and Zn by vetiver grass in mine soils amended with humic acids. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 13, p. 13521–13530, 2016.
- VELOSO, R. W. et al. Seasonal impacts on arsenic mobility and geochemistry in streams surrounding a gold mineralization area, Paracatu, Brazil. **Applied Geochemistry**, v. 109, n. October 2018, p. 104390, 2019.
- WALLACE, A. et al. Some Interactions in Plants Among Cadmium, Other Heavy Metals, and Chelating Agents¹. **Agronomy Journal**, v. 69, n. 1, p. 18, 1977.
- WANG, Q. et al. Effects of humic acids on phytoextraction of Cu and Cd from sediment by *Elodea nuttallii*. **Chemosphere**, v. 78, n. 5, p. 604–608, jan. 2010.

- WANG, Y. et al. A simple and sensitive non-chromatographic method for quantification of four arsenic species in rice by hydride generation–atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 149, n. August, p. 197–202, nov. 2018.
- WANG, Z.; CUI, Z.; XU, X. Lysosomal membrane response of the earthworm, *Eisenia fetida*, to arsenic species exposure in OECD soil. **RSC Advances**, v. 6, n. 28, p. 23498–23507, 2016.
- WATERLOT, C.; DOUAY, F. Arsenic mobility and speciation in contaminated kitchen garden and lawn soils: an evaluation of water for assessment of As phytoavailability. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 8, p. 6164–6175, 18 abr. 2015.
- WERFF, M. M.-V. DER; OUT, T. The Effect of Humic Acid as Zn Complexing Agent on Water Cultures of *Holcus lanatus*. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 176, n. 3, p. 274–282, jan. 1981.
- WHITE, M. C.; CHANEY, R. L. Zinc, Cadmium and Manganese Uptake by Soybean from Two Zinc- and Cadmium-Amended Coastal Plain Soils¹. **Soil Science Society of America Journal**, v. 44, n. 2, p. 308, 1980.
- WOLF, R. E. et al. Simultaneous speciation of arsenic, selenium, and chromium: species stability, sample preservation, and analysis of ash and soil leachates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 9, p. 2733–2745, 12 nov. 2011.
- WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **ISRN Ecology**, v. 2011, p. 1–20, 2011.
- YADAV, G. et al. Light Intensity Alters the Extent of Arsenic Toxicity in *Helianthus annuus* L. Seedlings. **Biological Trace Element Research**, v. 158, n. 3, p. 410–421, 4 jun. 2014.
- YOGARAJAH, N.; TSAI, S. S. H. Detection of trace arsenic in drinking water: challenges and opportunities for microfluidics. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 1, n. 4, p. 426–447, 2015.
- ZHANG, H. et al. Underlying dynamics and effects of humic acid on selenium and cadmium uptake in rice seedlings. **Journal of Soils and Sediments**, 12 ago. 2019.
- ZHANG, S. et al. The influence of humic acids on the accumulation of lead (Pb) and cadmium (Cd) in tobacco leaves grown in different soils. **Journal of soil science and plant nutrition**, n. ahead, p. 0–0, 2013.
- ZHONG, L. et al. Determination of total arsenic in soil by gas chromatography after pyrolysis. **Microchemical Journal**, v. 146, n. August 2018, p. 568–574, maio 2019.
- ZHU, Q. et al. Speciation of Arsenic in Rice by Ion Chromatography with Online Anion

Suppression and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 50, n. 6, p. 1040–1048, 13 abr. 2017.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 1- SUBSTÂNCIAS HÚMICAS ESTIMULAM O CRESCIMENTO INICIAL E AMENIZAM O ESTRESSE POR ARSÊNIO EM MUDAS DE *CORYMBIA CITRIODORA*

Resumo

A utilização de plantas tolerantes ao arsênio (As) e com sistema radicular bem desenvolvido tem apresentado importância em campanhas de fitorremediação. O *Corymbia citriodora* apresenta estas características que podem ser potencializadas pelas substâncias húmicas (SH) da matéria orgânica. O objetivo deste trabalho foi avaliar se as SH extraídas de vermicomposto podem modificar a arquitetura do sistema radicular, estimular o crescimento, aumentar a robustez e aliviar o estresse promovido pelo As em plântulas de *C. citriodora*. Foram realizados dois ensaios preliminares para obter a melhor concentração-resposta para SH e a concentração tóxica de As. Posteriormente, foi realizado um experimento em vasos de Leonard com solução nutritiva e quatro tratamentos: Controle, SH, As e As+SH. Os resultados demonstraram que SH apresentaram capacidade de modificar a arquitetura do sistema radicular, a biomassa, a robustez e aliviar os efeitos danosos do As ao crescimento vegetal.

Palavras-chave: Bioestimulantes • elementos-traço • área contaminada • fitotoxidez • mineração de ouro.

1 Introdução

O Arsênio (As) é um elemento-traço de elevado risco ambiental e se apresenta distribuído em diversos ambientes por ação natural e antrópica (ASSIS et al., 2019; MARTINS et al., 2019). Diversas áreas na América Latina estão contaminadas por As e tais contaminações estão principalmente associadas a mineração de metais em minerais sulfetados (BUNDSCHUH et al., 2012). A mineração de ouro ocorre principalmente em rochas associadas ao mineral arsenopirita (FeAsS) e a exposição da rocha promove um processo conhecido como drenagem ácida de mina, responsável pela dissolução oxidativa do S e consequente acidificação do meio, acelerando a liberação de Fe e As para águas e solos (BORBA; FIGUEIREDO; CAVALCANTI, 2004).

No estado brasileiro de Minas Gerais, conhecido pela intensa atividade de mineração e por desastres ambientais recentes (DOS REIS et al., 2019), o Arsênio é o segundo metal/metaloide com maior número de ocorrências em áreas contaminadas (MINAS GERAIS,

2018). São consideradas áreas contaminadas, as águas subterrâneas com concentração de As acima de $10 \mu\text{g. L}^{-1}$ e os solos acima de 35 mg kg^{-1} para agricultura, 55 mg kg^{-1} para uso residencial e 150 mg kg^{-1} para uso industrial, sendo os responsáveis pela contaminação obrigados a propor e executar as alternativas de intervenção para reabilitação de áreas (BRASIL, 2009). A remediação é um dos processos de intervenção, e quando se trata de As é economicamente crítico, pois emprega grande quantidade de energia e reagentes químicos perigosos (SINGH et al., 2015). A utilização da fitorremediação vem mostrando viabilidade, por utilizar as plantas para realizar os processos de remoção (fitoextração/fitoacumulação), imobilização (fitoestabilização) ou volatilização (fitovolatilização) (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019) com menor custo econômico e ambiental que os tratamentos convencionais (WAN; LEI; CHEN, 2016).

Plantas hiperacumuladoras de As são aquelas que apresentam uma concentração acima de $1.000 \mu\text{g g}^{-1}$ nas folhas (REEVES, 2006). Apesar de terem sido relatadas cerca de 400 plantas hiperacumuladoras de metais até o momento, apenas algumas são capazes de hiperacumular As (HASANUZZAMAN et al., 2015) e as evidências de hiperacumulação ocorreram apenas em pteridófitas, principalmente a samambaia chinesa (*Pteris vittata* L.) (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019). Como as samambaias têm porte pequeno é importante a utilização de espécies tolerantes e com sistemas radiculares mais desenvolvidos em campanhas de fitorremediação (VAMERALI et al., 2009), características estas que podem ser observadas no *Corymbia citriodora* (MELO; DIAS; DE ASSIS, 2016), vulgarmente conhecido como eucalipto-cidrô, eucalipto-limão ou eucalipto-cheiroso. A propagação clonal de *C. citriodora* apresenta baixo nível de enraizamento, e por esta razão que seu plantio comercial ocorre tradicionalmente por propagação seminal (REIS et al., 2013). Em decorrência da grande demanda por mudas de qualidade, pesquisas sobre as alternativas tecnológicas para produção estão se intensificando e é importante a utilização de índices de qualidade para sua avaliação (STEFFEN et al., 2011).

O índice de qualidade de Dickson (IQD) é muito utilizado para avaliar robustez e equilíbrio de plantas florestais (STEFFEN et al., 2011). Ainda que em pequeno número, alguns trabalhos o utilizaram para avaliação da tolerância de plantas sob estresse por zinco (SCHEID et al., 2018), cobre (DE MARCO et al., 2016; SILVA et al., 2015), em área degradada por mineração de manganês (HOU et al., 2019) e em rejeito de minas de carvão (DOS SANTOS et al., 2017). Entretanto, os parâmetros frequentemente utilizados para avaliar a tolerância das plantas ao As são a massa seca, altura e diâmetro das plantas (MARTINS et al., 2019). Recentemente, compostos bioestimulantes, dentre eles as substâncias húmicas (SH), vem sendo

utilizados para induzir o crescimento de plantas e aumentar sua tolerância a contaminantes (CAPORALE et al., 2018; DOBBSS et al., 2018; PITTARELLO et al., 2018, 2019).

As substâncias húmicas (SH) da matéria orgânica ao longo dos anos vem sendo descritas como estimulantes de plantas arbóreas (DOBBSS et al., 2016, 2018; PITTARELLO et al., 2018; SILVA et al., 2016). Além disso, vermicomposto bruto (material humificado estável e fonte de materiais húmicos) foi utilizado para estimular o crescimento e a robustez de mudas de *C. citriodora* (STEFFEN et al., 2011). O estímulo provocado pelas SH às plantas ocorre pelo aumento do transporte de íons através da parede celular, especialmente pela ação nas bombas de prótons da membrana plasmática (MP) (P-H⁺-ATPase) (CANELLAS; OLIVARES, 2014; ZANDONADI et al., 2010). Para avaliar a dose de SH com melhor estímulo em plântulas tem se utilizado principalmente o número de raízes laterais (NRL) (DOBBSS et al., 2016) e para retirar a interferência dos minerais do solo, os estudos tem utilizado meio hidropônico (DOBBSS et al., 2016, 2018; PITTARELLO et al., 2018; SILVA et al., 2016).

Alguns trabalhos demonstraram que as SH ativam um complexo mecanismo de defesa a fatores de estresses, como seca (CANELLAS et al., 2013) e metais pesados (DOBBSS et al., 2018; PITTARELLO et al., 2018, 2019; SHAFIGH; GHASEMI-FASAEI; RONAGHI, 2016). Em condições de solo vulcânico, foi observada diminuição de enzimas do estresse oxidativo proveniente do estresse por As em cenoura tratada com ácido húmico (CAPORALE et al., 2018) mas, até a presente data, nenhum outro estudo explorou a utilização de SH em solução nutritiva, em uma espécie arbórea, visando o aumento da tolerância ao As.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se as SH extraídas de vermicomposto podem modificar a arquitetura do sistema radicular, estimular o crescimento, aumentar a robustez e aliviar o estresse promovido pelo As em *C. citriodora*, a fim de confirmar ou negar as seguintes hipóteses:

H₀: substâncias húmicas não são capazes de modificar a arquitetura do sistema radicular, estimular crescimento, aumentar a robustez e reduzir os danos provocados pelo As em plantas de *C. citriodora*

H₁: substâncias húmicas modificam a arquitetura do sistema radicular, estimulam o crescimento, aumentam a robustez e amenizam os danos provocados pelo As em plantas de *C. citriodora*

2 Material e métodos

2.1 Vermicompostagem e extração de substâncias húmicas

As substâncias húmicas foram extraídas de vermicomposto proveniente de esterco bovino previamente compostado por 30 dias, com torneamento mecânico a cada 10 dias, mantendo-se umidade entre 60 e 70 % e densidade de 50 minhocas (*Eisenia foetida*) por quilograma do material orgânico. O vermicomposto foi agitado por 24 h (125 rpm) em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (1:20, relação vermicomposto: solução), posteriormente repousado por 12 horas, sifonado para retirada do sobrenadante (SH) e centrifugado (6000 RPM por 5 min) à temperatura ambiente. As SH foram ajustadas a pH 7,0 (com HCl 0,1 mol L⁻¹), dialisadas com água deionizada em membrana 12-14 kDa-cutoff (Thomas Scientific, Inc) até estabilidade da condutividade elétrica (<1,5 µS cm⁻¹) e liofilizadas (L101, Liotop, São Paulo, Brasil). A determinação da concentração de carbono (43,4% do liofilizado) foi realizada usando um analisador automático (Perkin Elmer 2400) e então foram preparadas as soluções para os ensaios em plantas.

2.2 Experimento de crescimento de plantas

2.2.1 Concentração-resposta ótima do SH

O ensaio foi conduzido em câmara de germinação (BOD) com fotoperíodo de 12 horas e temperatura 28 ± 1°C, onde as plântulas foram germinadas em vasos com 100 g de areia umedecida até 80% de sua capacidade de campo com solução nutritiva baseada em solução de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) de baixa força iônica (10%), adicionada de diferentes concentrações de SH (0, 1, 2, 4 e 8 mmol de C de SH L⁻¹), escolhidas por englobarem as melhores doses obtidas em outros estudos com plantas arbóreas (DOBBSS et al., 2016; PITTARELLO et al., 2018). O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados (DBC) com 5 tratamentos e 4 repetições, totalizando 20 vasos. Na semeadura utilizou-se 10 sementes por vaso e aos 5 dias da germinação foram selecionadas 5 plântulas para continuidade do ensaio. Após 15 dias da germinação foi avaliado NRL, por ser o um parâmetro comumente utilizado para determinação da concentração ótima de SH (DOBBSS et al., 2016). Foi realizada regressão dos resultados de NRL para obtenção da melhor concentração de SH.

2.2.2 Concentração tóxica de As

O ensaio foi conduzido nas mesmas condições do anterior, porém aplicando-se As em diferentes concentrações (0, 67, 133, 534 e 1058 $\mu\text{M L}^{-1}$), na forma de Arsenato de sódio (Na_2HAsO_4), por ser a forma de As comumente utilizada em trabalhos com plantas e por englobar concentrações tóxicas apresentadas em outros estudos hidropônicos (COX; BELL; KOVAR, 1996; GUSMAN et al., 2013; MALLICK et al., 2013; MALLICK; SINAM; SINHA, 2011; NORTON et al., 2008). O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados (DBC) com 6 tratamentos e 4 repetições, totalizando 24 vasos. As concentrações de As foram consideradas como dados qualitativos e então foi realizado teste t de Student (LSD) ($p < 0,05$) para obter a menor concentração que provoca danos na massa seca, altura e diâmetro do coleto sem provocar a morte das plantas.

2.2.3 Concentração ótima de SH associada à concentração tóxica de As

O ensaio combinando As e SH foi realizado em vasos de Leonard de 500 g com de areia e 500 ml de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) de baixa força iônica (25% na primeira semana, 50% na segunda semana e 100% nas demais). Foram implantados quatro tratamentos: 1) controle (apenas solução de Hoagland); 2) SH (melhor concentração de SH); 3) As (menor concentração que provoca danos sem provocar a morte das plantas) e 4) As + SH (melhor concentração de SH e a menor concentração que provoca danos sem provocar a morte das plantas). O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados (DBC) com 4 tratamentos e 6 repetições, totalizando 24 vasos. O ensaio foi realizado em uma estufa de polietileno de camada única e as plantas cresceram 45 dias. No fim foram avaliados os parâmetros de crescimento utilizados para o cálculo do IQD, que se deu pela fórmula: $\text{IQD} = \text{Massa seca total} / (\text{Altura/diâmetro do caule}) + (\text{Massa seca da parte aérea/massa seca das raízes})$ (DICKSON; LEAF; HOSNER, 1960).

2.3 Análise estatística

Os dados observados nos experimentos foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk, $p = 0,05$) e quando apresentaram distribuição normal foi realizada análise paramétrica de variância unidirecional (ANOVA) e quando apresentaram diferença estatística pelo teste F da ANOVA foi realizado o teste t de Student (LSD) ($P < 0,05$). Exclusivamente para o ensaio de concentração ótima de SH (tópico 2.2.1), foi realizada análise de regressão,

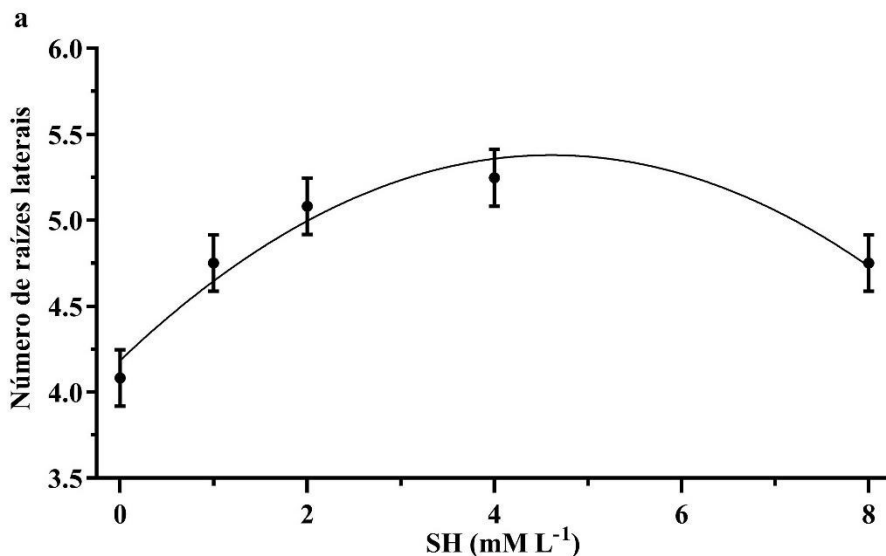
determinando a concentração de SH que resultou maior NRL. Todas as análises foram processadas no programa estatístico Sisvar (versão 5.0).

3 Resultados

3.1 Concentração-resposta ótima de SH

A Figura 4 apresenta o NRL das plantas tratadas com diferentes concentrações de SH (0, 1, 2, 4 e 8 mmol de C de SH L⁻¹) e a definição da concentração ótima pela regressão.

Figura 4 - Número de raízes laterais (NRL) em plântulas de *C. citriodora* sob diferentes concentrações de substâncias húmicas (SH) (a). Modelo de dose-resposta de SH, coeficiente de correlação (R²), nível de significância da regressão (valor de p) e ponto de inflexão (concentração ideal) para a massa seca da raiz (b).



b

| Equação ($y = b_2x^2 + b_1x + b_0$) | R ² | p | Concentração ótima de SH ($(dx/dy): b_1 + 2(b_2)x = 0$) |
|--|----------------|-------|--|
| ($Y = -0,0563x^2 + 0,5186x + 4,1843$) | 84,02 | <0,01 | 4,61 |

Os valores representam a média ± desvio padrão.

As SH modificaram a arquitetura das raízes de *Corymbia citriodora* observando-se uma modelo polinomial de segunda ordem (Fig 4). Houve um aumento do NRL seguido de redução com a elevação das doses, e a melhor dose foi estimada em 4,61 mmol de C de SH L⁻¹.

3.2 Concentração tóxica de As

A Tabela 5 apresenta massa seca, altura e diâmetro das plantas tratadas com diferentes concentrações de As (0, 67, 133, 267, 534 e 1058 $\mu\text{M L}^{-1}$).

Tabela 5 - Massa seca total, altura total e diâmetro do coleto de plântulas de *C. citriodora* tratadas com diferentes concentrações (0, 67, 133, 267, 534, 1058 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de As.

| As ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Massa seca (g vaso ⁻¹) | Altura (cm) | Diâmetro (mm) |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------|---------------|
| 0 | 4,45 ± 0,65 a | 3,39 ± 0,57 a | 0,54 ± 0,03 a |
| 67 | 4,55 ± 0,70 a | 3,53 ± 0,52 a | 0,59 ± 0,03 a |
| 133 | 3,93 ± 0,66 a | 3,53 ± 0,51 a | 0,56 ± 0,03 a |
| 267 | 4,05 ± 0,90 a | 3,00 ± 0,55 a | 0,49 ± 0,03 a |
| 534 | 1,25 ± 0,50 b | 2,24 ± 0,27 b | 0,41 ± 0,05 b |
| 1068 | 0,28 ± 0,08 b | 0,71 ± 0,27 b | 0,29 ± 0,08 b |

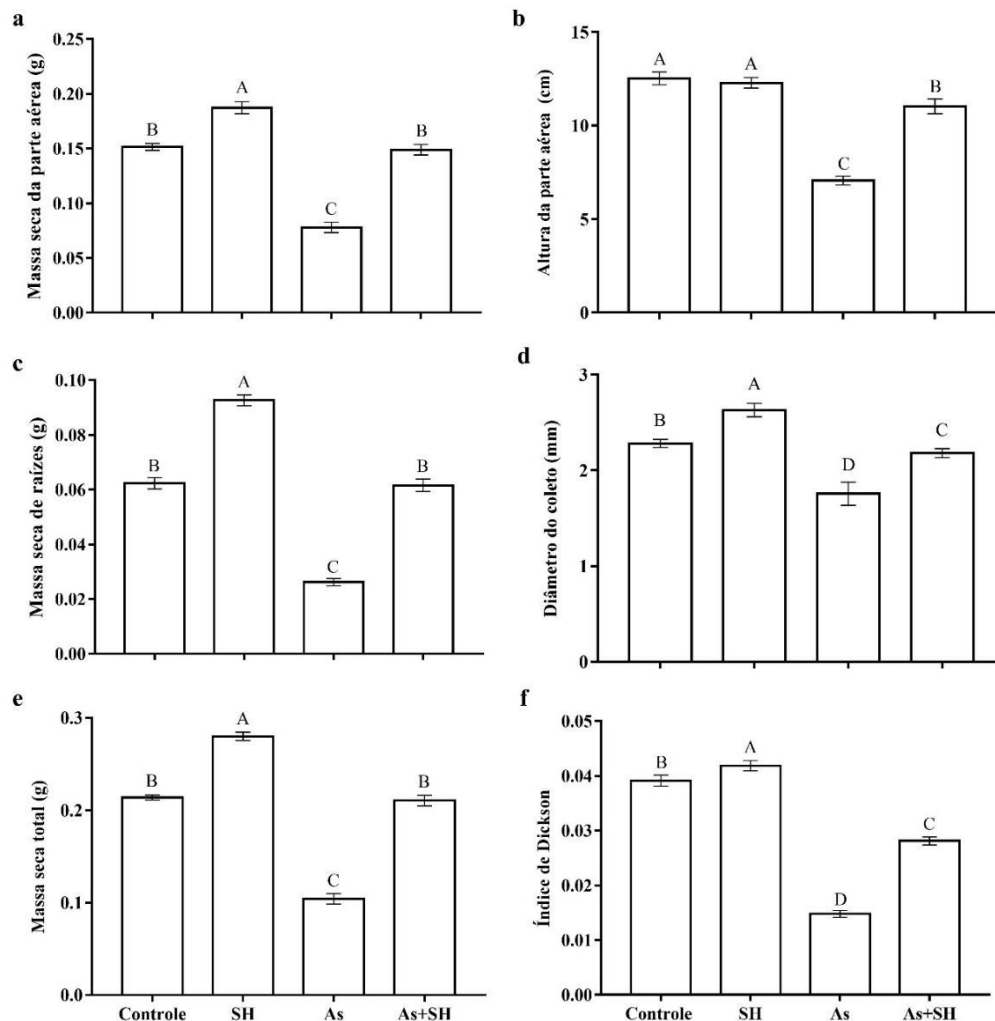
Valores apresentados representam a média ± desvio padrão. Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem pelo teste LSD ($p < 0,05$). Concentrações de As foram assumidas como dados qualitativos.

O As reduziu massa, comprimento e diâmetro das plantas nas concentrações de 534 e 1068 $\mu\text{M L}^{-1}$ (Tab. 5). A menor concentração com dano significativo foi 534 $\mu\text{M L}^{-1}$ e nela houve redução de 72% da massa, 34% do comprimento e 21% do diâmetro. Na maior concentração (1068 $\mu\text{M L}^{-1}$) houve redução severa da massa (96%) e no comprimento (79%), levando algumas plântulas à morte. Portanto, optou-se por utilizar 534 $\mu\text{M L}^{-1}$ no ensaio de combinando As e SH (3.3).

3.3 Concentração ótima de SH associada à concentração tóxica de As

A Figura 5 apresenta a massa seca de raiz parte aérea e total, a altura da parte aérea, o diâmetro do coleto e o IQD de plântulas de *C. citriodora*. tratadas com As (534 μM de As L^{-1}), SH (4,61 mmol de C de SH L^{-1}) e sua combinação.

Figura 5 - Massa seca de parte aérea (a), altura da parte aérea (b), massa seca de raízes (c), diâmetro do coleto (d), massa seca total (e) e índice de qualidade de Dickson (IQD) (f) em plantas de *C. citriodora* tratadas com SH, arsênio (As) e sua combinação (As+SH)



Os valores representam a média \pm desvio padrão e as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste LSD ($p < 0,05$).

As SH amenizaram os danos ao crescimento provocados pelo As no âmbito da massa seca, diâmetro de coleto e altura de parte aérea (Fig. 5). As massas secas de parte aérea, raízes e total das plântulas controle foram 0,15; 0,06 e 0,21 g, aumentaram (24, 49 e 31%) para 0,19; 0,09 e 0,28 g no tratamento SH e reduziram (49, 58 e 51%) para 0,08; 0,03 e 0,10 g, respectivamente, no tratamento As. As massas secas do tratamento As+SH foram similares ($p > 0,05$) aos das plantas controle, correspondendo um incremento de 91, 135 e 102 % das massas secas de parte aérea, raiz e total, respectivamente, em relação ao tratamento com As individualmente. A altura da parte aérea no tratamento controle foi 12,5 cm e apresentou valor similar ($p > 0,05$) no tratamento SH. No tratamento As, houve redução (44%) para 7,1 cm e as SH amenizaram o efeito tóxico, atingindo 11 cm no tratamento As+SH, que corresponde uma altura 55% maior que o tratamento As. O diâmetro do coleto foi 2,3 mm no tratamento controle,

aumentou (15%) para 2,6 mm no tratamento SH e reduziu (23%) para 1,8 mm no tratamento As (redução de 23%, em relação ao controle). O tratamento As+SH apresentou diâmetro de 2,2 mm, que corresponde um incremento de 24% em relação ao tratamento As.

Além dos parâmetros de crescimento, os resultados demonstram que o IQD também foi reduzido pela ação do As e os danos foram amenizados pelas SH. As plantas controle apresentaram IQD de 0,039, no tratamento SH aumentou (7%) para 0,042 e no tratamento As reduziu (62%) para 0,015. Substâncias húmicas apresentaram amenização do efeito tóxico do As no âmbito do IQD, uma vez que apresentou valor de 0,028 no tratamento As+SH, que corresponde 90% de aumento em relação ao tratamento As.

4 Discussão

O estímulo das SH apresentou dependência da dose, uma vez que os incrementos de raízes laterais ocorreram em baixas concentrações e houve inibição em concentrações mais elevadas (Fig. 4). TREVISAN et al. (2010) mostraram que a promoção do crescimento de raízes laterais em plântulas tratadas com SH ocorre devido ao seu efeito tipo auxínico e MUSCOLO et al. (1998) detectaram moléculas com características semelhantes à auxina na sua estrutura, utilizando espectrometria de massas. Além do crescimento de raízes laterais, as SH também aumentam a atividade de enzimas responsáveis pela absorção de nutrientes (TREVISAN et al., 2010), promovendo a formação de ATP, aminoácidos e proteínas (CANELLAS et al., 2013). As alterações no metabolismo dos nutrientes promovem aumento do teor de clorofila (HAMEED et al., 2018) e da fotossíntese (CANELLAS et al., 2013). A maior fotossíntese acarreta maior crescimento e associado ao incremento do metabolismo enzimático e da absorção de nutrientes gera plantas vigorosas (CANELLAS et al., 2013; STEFFEN et al., 2011).

Por outro lado, a redução do crescimento no tratamento com As (Tab. 5) é resultado de alterações no crescimento das plantas provocadas por desajustes na anatomia radicular (YADAV et al., 2014) causado por modificações mitóticas (DE FREITAS-SILVA et al., 2016) e pelo aumento na invertase ácida, que provoca menor disponibilidade de sacarose (KAUR et al., 2012). A substituição do fosfato por arsenato na estrutura do ATP forma uma molécula ADP-As instável após a sua quebra, levando à interrupção do fluxo de elétrons nas células (FINNEGAN; CHEN, 2012; SMITH et al., 2010). O estresse por As provoca alterações nutricionais, principalmente relacionadas ao fósforo (MALLICK et al., 2013; MARWA; MEHARG; RICE, 2012), refletindo em menor disponibilidade de elétrons na síntese de ATP (FINNEGAN; CHEN, 2012) e menor fotossíntese (GUSMAN et al., 2013).

Os valores do IQD nas plantas dos tratamentos controle (0,039) e SH (0,042) (Fig. 5) podem ser considerados adequados para 45 dias, uma vez que STEFFEN et al. (2011) avaliaram a mesma espécie aos 100 dias e obtiveram entre 0,05 e 0,20 de acordo com a proporção de vermicomposto no substrato. Substâncias húmicas demonstraram eficiência na redução dos danos ao crescimento provocados pelo As, refletindo no IQD (0,015 no tratamento As e 0,028 no As+SH) e evidenciando o potencial de utilização de SH na produção de mudas para áreas contaminadas. SILVA et al. (2015) observaram que espécies que apresentaram menor translocação de Cu, foram mais tolerantes e apresentaram maiores IQD e SCHEID et al. (2018) observaram que a redução da toxidez por Zn promovida por turfa aumentou IQD de plantas de *Erythrina crista-galli*.

CAPORALE et al. (2018) observaram que ácidos húmicos reduziram a disponibilidade de As para cenouras em solo vulcânico, amenizando as alterações em enzimas do estresse oxidativo. Entretanto os mecanismos fisiológicos que promovem maior tolerância ao As nas plantas tratadas por SH ainda precisam ser elucidados sem a interferência da adsorção no solo. Em meio hidropônico é possível observar complexação do elemento na solução, sem interferência dos minerais do solo, como sugerido por MARQUES et al. (2008) e PITTARELLO et al. (2018) em trabalhos com Fe e Cd, respectivamente. A absorção de arsenato ocorre pelos mesmos transportadores de fosfato (MALLICK et al., 2013; MARWA; MEHARG; RICE, 2012) e as SH podem promover um melhor metabolismo deste íon, muitas vezes reduzindo sua absorção TAN; NOPAMORNBODI (1979). As SH também podem agir na morfologia de raízes (PITTARELLO et al., 2018), na atividade da H⁺-ATPase (RODDA et al., 2006) e metabolismo de nutrientes (TREVISAN et al., 2010).

5 Conclusão

Substâncias húmicas isoladas de vermicomposto apresentaram capacidade de modificar a arquitetura do sistema radicular, a biomassa e a robustez de *Corymbia citriodora*. Os efeitos danosos do As ao crescimento vegetal (redução da biomassa, altura da parte aérea, o diâmetro do coleto) foram aliviados pelas SH, confirmando a hipótese H₁ e demonstrando seu potencial em amenizar a toxidez por esse elemento químico considerado muito tóxico do ponto de vista biológico.

Referências

ASSIS, E. M. DE et al. High concentrations of toxic metals in water consumed by the Maxakali indigenous community in Brazil. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary**

Journal of Applied Science, v. 14, n. 1, p. 1, 25 jan. 2019.

BRASIL. **Resolução Conama (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Brasil, 2009. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>

BUNDSCHUH, J. et al. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. **Science of The Total Environment**, v. 429, p. 2–35, jul. 2012.

CANELLAS, L. P. et al. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1–2, p. 119–132, 23 maio 2013.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 3, 2014.

CAPORALE, A. G. et al. May humic acids or mineral fertilisation mitigate arsenic mobility and availability to carrot plants (*Daucus carota* L.) in a volcanic soil polluted by As from irrigation water? **Chemosphere**, v. 193, p. 464–471, 2018.

COX, M. S.; BELL, P. F.; KOVAR, J. L. Differential tolerance of canola to arsenic when grown hydroponically or in soil. **Journal of Plant Nutrition**, v. 19, n. 12, p. 1599–1610, 1996.

DE FREITAS-SILVA, L. et al. Arsenic accumulation in Brassicaceae seedlings and its effects on growth and plant anatomy. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 1–9, fev. 2016.

DE MARCO, R. et al. Copper Phytoaccumulation and Tolerance by Seedlings of Native Brazilian Trees. **Environmental Engineering Science**, v. 33, n. 3, p. 176–184, mar. 2016.

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forestry Chronicle**, v. 36, p. 10–13, 1960.

DOBBSS, L. B. et al. Bioactivity of mangrove humic materials on *Rizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* seedlings, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 23, p. 1168–1176, 2016.

DOBBSS, L. B. et al. Alleviation of iron toxicity in *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) by humic substances. **Environmental Science and Pollution Research**, 2018.

DOS REIS, D. A. et al. The Relationship Between Human Adenovirus and Metals and Semimetals in the Waters of the Rio Doce, Brazil. **Archives of Environmental**

Contamination and Toxicology, v. 77, n. 1, p. 144–153, 11 jul. 2019.

DOS SANTOS, M. L. et al. The phytoprotective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong in soil containing coal-mine tailings.

International Journal of Phytoremediation, v. 19, n. 12, p. 1100–1108, 2 dez. 2017.

FINNEGAN, P. M.; CHEN, W. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism.

Frontiers in Physiology, v. 3, n. June, p. 1–18, 2012.

GUSMAN, G. S. et al. Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 4, p. 1201–1209, 28 abr. 2013.

HAMEED, A. et al. Accumulative effects of humic acid and multinutrient foliar fertilizers on the vegetative and reproductive attributes of citrus (*Citrus reticulata* cv. kinnow mandarin).

Journal of Plant Nutrition, v. 41, n. 19, p. 2495–2506, 2018.

HASANUZZAMAN, M. et al. Arsenic Toxicity in Plants and Possible Remediation. In: **Soil Remediation and Plants**. Elsevier, 2015. p. 433–501.

HOAGLAND, D. C.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plant without soil. California Agricultural Experiment. **Circular 337. The College of Agriculture University of California. Berkeley.**, 1950.

HOU, X. et al. Selection of suitable species as a key factor for vegetation restoration of degraded areas in an open-pit manganese-ore mine in Southern China using multivariate-analysis methods. **Land Degradation and Development**, v. 30, n. 8, p. 942–950, 2019.

KAUR, S. et al. Arsenic (As) Inhibits Radicle Emergence and Elongation in *Phaseolus aureus* by Altering Starch-Metabolizing Enzymes Vis-à-Vis Disruption of Oxidative Metabolism. **Biological Trace Element Research**, v. 146, n. 3, p. 360–368, 29 jun. 2012.

MALLICK, S. et al. Role of sulfate in detoxification of arsenate-induced toxicity in *Zea mays* L. (SRHM 445): nutrient status and antioxidants. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 2, p. 140–154, jun. 2013.

MALLICK, S.; SINAM, G.; SINHA, S. Study on arsenate tolerant and sensitive cultivars of *Zea mays* L.: Differential detoxification mechanism and effect on nutrients status.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, n. 5, p. 1316–1324, jul. 2011.

MARQUES, R. B. et al. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1121–1128, 2008.

MARTINS, G. C. et al. Assessing the Brazilian prevention value for soil arsenic: Effects on emergence and growth of plant species relevant to tropical agroecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 694, p. 133663, 2019.

MARWA, E. M. M.; MEHARG, A. A.; RICE, C. M. Risk assessment of potentially toxic elements in agricultural soils and maize tissues from selected districts in Tanzania. **Science of The Total Environment**, v. 416, p. 180–186, fev. 2012.

MELO, R. F.; DIAS, L. E.; DE ASSIS, I. R. Behavior of *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus citriodora* seedlings grown in soil contaminated by arsenate. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 40, p. 1–11, 2016.

MINAS GERAIS. **Inventário de áreas contaminadas de minas gerais 2018**. Belo Horizonte. Disponível em:

<http://www.feam.br/images/stories/2018/AREAS_CONTAMINADAS/Inventario_Areas_Co ntaminadas_2018.pdf>.

MUSCOLO, A.; CUTRUPI, S.; NARDI, S. Iaa detection in humic substances. **Soil Biol. Biochem**, v. 30, p. 1199–1201, 1998.

NORTON, G. J. et al. Rice-arsenate interactions in hydroponics: Whole genome transcriptional analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 8, p. 2267–2276, 2008.

PITTARELLO, M. et al. Effects of different humic substances concentrations on root anatomy and Cd accumulation in seedlings of *Avicennia germinans* (black mangrove).

Marine Pollution Bulletin, v. 130, n. March, p. 113–122, maio 2018.

PITTARELLO, M. et al. Dissolved humic substances supplied as potential enhancers of Cu, Cd, and Pb adsorption by two different mangrove sediments. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 3, p. 1554–1565, 12 mar. 2019.

REEVES, R. D. Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: **Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2006. p. 25–52.

REIS, C. A. F. et al. **Corymbia citriodora: estado da arte de pesquisas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2013.

RODDA, M. R. C. et al. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - Efeito da concentração. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 30, n. 4, p. 649–656, 2006.

SCHEID, D. et al. Turfa como indutor do crescimento e tolerância de *Erythrina crista-galli* em solo contaminado com zinco. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 4, p. 51–60, 2018.

SHAFIGH, M.; GHASEMI-FASAEI, R.; RONAGHI, A. Influence of plant growth regulators and humic acid on the phytoremediation of lead by maize in a Pb-polluted calcareous soil.

Archives of Agronomy and Soil Science, v. 62, n. 12, p. 1733–1740, 2016.

SHUKLA, A.; SRIVASTAVA, S. A Review of Phytoremediation Prospects for Arsenic Contaminated Water and Soil. In: **Phytomanagement of Polluted Sites**. Elsevier, 2019. p.

243–254.

SILVA, R. J. DA et al. Humic substances, purified MAP and hydrogel in the development and survival of *Eucalyptus urograndis*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 7, p. 625–629, 2016.

SILVA, R. F. et al. Growth of tropical tree species and absorption of copper in soil artificially contaminated. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4 suppl 1, p. 119–125, 2015.

SINGH, R. et al. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 247–270, 2015.

SMITH, S. E. et al. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. **Plant and Soil**, v. 327, n. 1–2, p. 1–21, 8 fev. 2010.

STEFFEN, G. P. K. et al. Utilização de vermicomposto como substrato na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* e *Corymbia citriodora*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, n. 66, p. 75–82, 2011.

TAN, K. H.; NOPAMORNBODI, V. Effect of Different Levels of Humic Acid on Nutrient Content and Growth of Corn (*Zea Maysl.*). **Plant and Soil**, v. 51, p. 283–287, 1979.

TREVISAN, S. et al. Humic substances biological activity at the plant-soil interface. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 6, p. 635–643, 2010.

VAMERALI, T. et al. Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). **Environmental Pollution**, v. 157, n. 3, p. 887–894, 2009.

WAN, X.; LEI, M.; CHEN, T. Cost–benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 563–564, p. 796–802, 2016.

YADAV, G. et al. Light Intensity Alters the Extent of Arsenic Toxicity in *Helianthus annuus* L. Seedlings. **Biological Trace Element Research**, v. 158, n. 3, p. 410–421, 4 jun. 2014.

ZANDONADI, D. B. et al. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. **Planta**, v. 231, n. 5, p. 1025–1036, 2010.

ARTIGO 2 - BIOATIVIDADE DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM PLANTAS DE MILHO (*ZEA MAYS* L.): FITOEXTRAÇÃO DE ARSÊNIO E ESTRESSES NUTRICIONAIS E FISIOLÓGICOS

Resumo

O arsênio (As) é um elemento-traço que representa grande risco ambiental e sua fitorremediação tem sido apontada como uma boa técnica para recuperação de ambientes contaminados. Como o As é um agente promotor do estresse em vegetais, uma estratégia para utilização de plantas em programas de fitorremediação é ativação de seus mecanismos de defesa por substâncias que tragam benefícios ao crescimento e metabolismo vegetal, tais como as substâncias húmicas (SH), descritas como principal componente da matéria orgânica de solos, águas e sedimentos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar se as SH extraídas de vermicomposto podem atenuar os estresses promovidos pelo As em plantas de milho, aumentando seu potencial de fitoextração. As SH foram extraídas de vermicomposto e os ensaios realizados em vasos de Leonard com solução nutritiva. Foi realizado um ensaio preliminar para definição da melhor concentração-resposta para as SH e outro para concentração tóxica de As para depois avaliá-los num experimento de 28 dias com os quatro tratamentos: Controle, SH, As, As+SH. Os resultados demonstraram que SH atenuaram o estresse por As em plantas de milho. A massa seca reduziu no tratamento As e reequilibrou ao controle no tratamento As+SH. As plantas tratadas com SH apresentaram menores concentrações de As, mas, como em contrapartida com maior biomassa, a fitoextração aumentou. As concentrações de P, Fe, Cu, Mn e Ni aumentaram no tratamento As e foram atenuadas no As+SH. A taxa de fotossíntese reduziu e a concentração interna de CO₂ aumentou com o estresse por As, sendo ambos efeitos atenuados pelas SH.

Palavras-chave: Fitorremediação • bioestimulantes • fósforo • fotossíntese • elementos-traço.

1 Introdução

O arsênio (As) é um elemento-traço que representa grande risco ambiental para os ecossistemas (BUNDSCHUH et al., 2012), gerando danos aos animais (SAMUEL et al., 2005), microrganismos (BERTIN et al., 2011), plantas (MARTINS et al., 2019) e humanos (ABDUL et al., 2015). Em relação à saúde humana, o As pode gerar complicações neurológicas, reprodutivas, pulmonares, cardiovasculares, dermatológicas e tumorigênicas (ABDUL et al., 2015). Sua origem pode ocorrer por fontes naturais ou antrópicas e em diversas partes do mundo

ocorrem áreas contaminadas, principalmente associadas à mineração de metais e carvão na presença de minerais sulfetados (BUNDSCHUH et al., 2012).

A remediação de áreas contaminadas é economicamente crítica, pois elas empregam uma grande quantidade de energia e reagentes químicos perigosos para remover contaminantes (PITTARELLO et al., 2017; SINGH et al., 2015). A fitorremediação tem sido apontada como uma alternativa promissora que consiste no uso de plantas para remover (por fitoextração/fitoacumulação), imobilizar (por fitoestabilização) ou volatilizar (por fitovolatilização) o As (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019) e pode ser até 25 vezes mais barata que os tratamentos convencionais químicos e térmicos, por exemplo (WAN; LEI; CHEN, 2016). Para avaliar a tolerância das plantas ao estresse por As são frequentemente utilizados a biomassa da planta, o estado nutricional e parâmetros de trocas gasosas (HASANUZZAMAN et al., 2015; KUMAR et al., 2015; MARTINS et al., 2019). Um crescimento vigoroso e adaptações climáticas são requisitos para a seleção de plantas a serem usadas em programas de fitorremediação (DING et al., 2011). No entanto, altos níveis de contaminantes podem estressar as plantas, reduzindo seu crescimento (MARTINS et al., 2019). Recentemente, foi proposto que as plantas possam ser ajudadas a superar esse estresse aplicando alguns compostos que podem estimular seu desenvolvimento, mesmo em áreas contaminadas (CAPORALE et al., 2018; CHEN et al., 2016). Esses compostos foram denominados bioestimulantes vegetais e seu uso em programas de fitorremediação é uma estratégia que vem chamando a atenção (CAPORALE et al., 2018; DOBBSS et al., 2018; PITTARELLO et al., 2018, 2019).

As substâncias húmicas (SH) são uma das principais categorias de bioestimulantes vegetais e existem vários estudos mostrando sua ação na síntese e modulação de proteínas da membrana, especialmente as bombas de prótons da membrana plasmática (MP) (P- H⁺-ATPase) (CANELLAS; OLIVARES, 2014; ZANDONADI et al., 2010). A P- H⁺-ATPase cria um gradiente eletroquímico de prótons através da MP e aumenta o transporte de íons através da membrana celular da planta (ZANDONADI et al., 2010). As plantas tratadas com SH também têm a capacidade de ativar um complexo mecanismo de defesa capaz de atenuar os efeitos deletérios produzidos por diversos agentes promotores de estresse, como a seca (CANELLAS et al., 2013) e metais pesados (DOBBSS et al., 2018; PITTARELLO et al., 2018, 2019; SHAFIGH; GHASEMI-FASAEI; RONAGHI, 2016). Em condições de solo vulcânico, foi observada diminuição da disponibilidade de As e atenuação da toxidez em cenoura tratada com ácidos húmicos (CAPORALE et al., 2018). Entretanto, até a presente data, não foi explorada na literatura a atenuação do estresse por As por SH em meio hidropônico, nem tampouco, as respostas foram relacionadas às concentrações de nutrientes e trocas gasosas.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar se as SH extraídas de vermicomposto podem atenuar estresses nutricionais e fisiológicos promovidos pelo As em plantas de milho, crescidas em meio de cultivo contaminado, aumentando seu potencial de fitoextração, a fim de confirmar ou negar as seguintes hipóteses:

H₀: substâncias húmicas não são capazes de atenuar estresses nutricionais, fisiológicos e de aumentar a fitoextração de As por plantas de milho.

H₁: substâncias húmicas atenuam estresses nutricionais, fisiológicos e aumentam a fitoextração de As por plantas de milho.

2 Material e métodos

2.1 Processo de vermicompostagem e extração de substâncias húmicas

Esterco bovino foi utilizado como substrato para a vermicompostagem, com o objetivo de obter a SH a ser utilizada nos testes biológicos. Primeiro, o esterco foi compostado por 30 dias, com torneamento mecânico a cada 10 dias. Posteriormente, o material foi vermicompostado por mais 60 dias, utilizando uma densidade de 50 minhocas (*Eisenia foetida*) para cada quilograma de esterco bovino. A umidade foi mantida entre 60-70% durante todo o processo. As substâncias húmicas foram então extraídas usando solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (1:20, relação vermicomposto: solução), agitando a suspensão por 24 h (125 rpm) à temperatura ambiente. Depois, o material permaneceu sem agitação por um período de 12 horas e a solução de sobrenadante (SH) foi separada do material precipitado por sifonação e centrifugação (6000 RPM por 5 min). A solução sobrenadante teve o pH ajustado para 7,0 com 0,1 mol L⁻¹ HCl e depois foi dialisada contra água deionizada usando uma membrana de diálise 12–14 kDa-cut-off (Thomas Scientific, Inc) até condutividade elétrica <1,5 µS cm⁻¹ e posteriormente liofilizada (L101, Liotop, São Paulo, Brasil). A concentração de carbono no SH foi determinada usando um analisador automático (Perkin Elmer 2400) (43,4% do liofilizado).

2.2 Experimentos de crescimento de plantas

2.2.1 Concentração-resposta ótima do SH

Para determinar da concentração de SH mais eficiente na estimulação do crescimento inicial do milho, as sementes (*Zea mays*, SYN8A98) foram desinfestadas embebendo-as em uma solução de NaClO a 10% por 10 min seguido de enxague abundante em água destilada. Posteriormente, as sementes foram semeadas em papel de germinação

esterilizado em câmara de crescimento a 28° C. Mudanças de milho com quatro dias de idade, com radícula entre 1,5 e 2,0 cm, foram transferidas para vasos de Leonard contendo areia previamente peneirada (0,50-0,84 mm) e lavada com HCl a 10% de seguido enxague em água destilada até obter uma condutividade elétrica $<5,0 \mu\text{S cm}^{-1}$. Solução Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) foram preparadas com sais solubilizantes em soluções contendo 0, 1, 2, 4, 8 e 16 mmol C L⁻¹ de SH. O crescimento das plantas foi conduzido por 14 dias em uma estufa de polietileno de camada única e as plantas foram coletadas para avaliar a massa seca das raízes (MSR). Essa variável foi escolhida por ser responsivas tanto para estimulação por SH (CANELLAS et al., 2019) como também para toxidez por As (MARTINS et al., 2019) em testes com plantas de milho. Os resultados foram analisados por análise de regressão com o objetivo de determinar a concentração de SH que proporcionou maior MSR.

2.2.2 Concentração tóxica de As

Uma vez que a concentração ótima de SH foi identificada, foi realizado um segundo experimento preliminar utilizando diferentes concentrações de As. O estudo foi desenvolvido conforme descrito no tópico 2.2.1., substituindo-se as soluções de SH pelas de As nas concentrações de 0, 67, 133, 267, 534 e 1058 $\mu\text{M L}^{-1}$, preparadas usando Arsenato de sódio (Na₂HAsO₄). Este teste foi realizado para verificar os efeitos das concentrações crescentes de As no desenvolvimento inicial das plantas de milho. Após 14 dias de crescimento sob as diferentes concentrações de As, as plantas foram colhidas e avaliada a MSR. A seleção da concentração de As para o experimento do tópico 2.2.3. considerou a menor concentração de As com efeitos significativos ($P < 0.05$) na MSR.

2.2.3 Concentração tóxica de As associada à concentração ótima de SH

Mudas de milho obtidas usando os mesmos procedimentos relatados anteriormente foram usadas para determinar o potencial de SH em atenuar o estresse por As. Para isso, as mudas receberam solução Hoagland suplementada com a melhor concentração de SH determinada pelo tópico 2.2.1. associado à primeira concentração de As capaz de reduzir o crescimento de milho, determinada no tópico 2.2.2. As plantas cresceram por 28 dias, em casa de vegetação. Foram delimitados quatro tratamentos: 1) controle (plantas cultivadas apenas com solução de Hoagland); 2) SH (plantas cultivadas com a melhor concentração de SH); 3) As (plantas cultivadas com a primeira concentração de As que gerou danos) e 4) As + SH (plantas cultivadas com a melhor concentração de SH e a primeira concentração de As que gerou danos).

2.2.3.1 Trocas gasosas

Parâmetros de trocas gasosas das folhas, como as taxas de assimilação de CO₂ (A), transpiração (E), condutância estomática (Gs) e a concentração interna de CO₂ (Ci) foram medidos usando um sistema portátil de fotossíntese (LI 6400 XTR, Licor, Nebraska, EUA), com uma folha padrão de 6 cm² câmara. A concentração de CO₂ na cubeta de folhas foi fixada em 400 µmol mol⁻¹. A concentração de CO₂ na cubeta foliar foi fixada em 400 µmol mol⁻¹. As medições foram realizadas sob densidade de fluxo fotossintético de 500 µmol m⁻² s⁻¹. Dentro da câmara foliar, a temperatura média foi de 28,0 ± 1,6 °C. As determinações das trocas gasosas foram realizadas entre 9 e 11 horas da manhã. A eficiência no uso da água (EUA) foi calculada pela razão de A e E (A/E).

2.2.3.2 Biomassa vegetal, concentração e fitoextração de As e concentração nutrientes

A MSR e a massa seca de parte aérea (MSPA) foram determinadas em balança analítica após secagem em estufa por 48 h, a 60 °C. Os teores de As, P, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn e Ni nas raízes e folhas foram obtidos pelo método USEPA 3052. Para isso, as raízes e as folhas foram secas em estufa (48 h, a 60 °C) e depois granuladas em um almofariz com pilão. Amostras com 250 mg de cada material foram misturadas com 5 mL de HNO₃ 95% puro e 2 mL de H₂O₂ concentrado a 35% e aquecidas até 150 °C em tubos de vidro até todo o material orgânico ser digerido. As amostras foram diluídas com água deionizada (proporção 1:10, v: v) e analisadas usando o espectrômetro ICPE 9000 (Shimadzu). A fitoextração de As foi calculada multiplicando a concentração (µg kg⁻¹) pela massa seca (kg pot⁻¹) (GUIMARAES et al., 2012), em raízes e parte aérea.

2.3 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos seguindo um delineamento em blocos casualizados (DBC) com 4 repetições. Os dados dos três ensaios foram testados quanto à normalidade (teste Shapiro-Wilk, p < 0,05) e quando apresentaram distribuição normal foi realizada análise paramétrica de variância unidirecional (ANOVA). Exclusivamente para o ensaio de concentração ótima de SH (tópico 2.2.1) os resultados foram analisados por análise de regressão, determinando a concentração de SH que resultou em maior MSR. Na determinação da concentração tóxica de As, as concentrações foram consideradas como dados qualitativos. Nos demais ensaios, quando os resultados apresentaram variância pelo teste F, foi

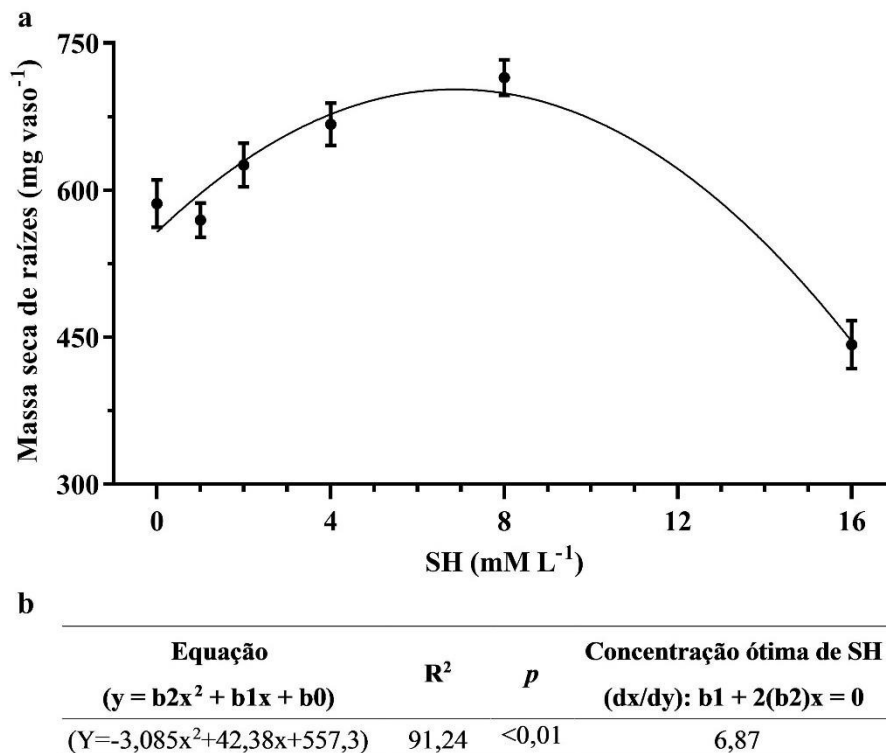
realizado o teste t de Student (LSD) ($p < 0,05$). Todas as análises foram processadas no programa estatístico Sisvar (versão 5.0).

3 Resultados

3.1 Concentração-resposta ótima do SH e concentração tóxica de As

A MSR de plantas de milho aumentou na primeira concentração de SH (Fig. 6) alcançou um pico de crescimento máximo e depois diminuiu em concentrações maiores, seguindo um modelo polinomial de segunda ordem. A melhor concentração foi então estimada em 6,87 mmol de C de SH L⁻¹ utilizando o modelo obtido, o que resultou em 22% mais MSR em comparação com o controle.

Figura 6 - Massa da raiz seca (MSR) em plantas de milho sob diferentes concentrações de substâncias húmicas (SH) (a). Modelo de dose-resposta de SH, coeficiente de correlação (R^2), nível de significância da regressão (valor de p) e ponto de inflexão (concentração ideal) para a massa seca da raiz (b).



Os valores representam a média \pm desvio padrão. * A média difere do controle pelo teste LSD ($p < 0,05$).

O aumento da concentração de As também afetou a MSR (Tab. 6). As soluções contendo 66,7, 133,5 ou 266,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de As não apresentaram resposta diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle. No entanto, soluções contendo 533,9 e 1067,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ diminuiram

acentuadamente a MSR. Dessa forma, para os experimentos subsequentes, foi escolhida a primeira concentração de As que resultou em danos significativos à planta ($533,9 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Tabela 6 - Massa seca das raízes (MSR) em plantas de milho tratadas com diferentes concentrações de As (0, 67, 133, 267, 534, 1058 $\mu\text{mol L}^{-1}$)

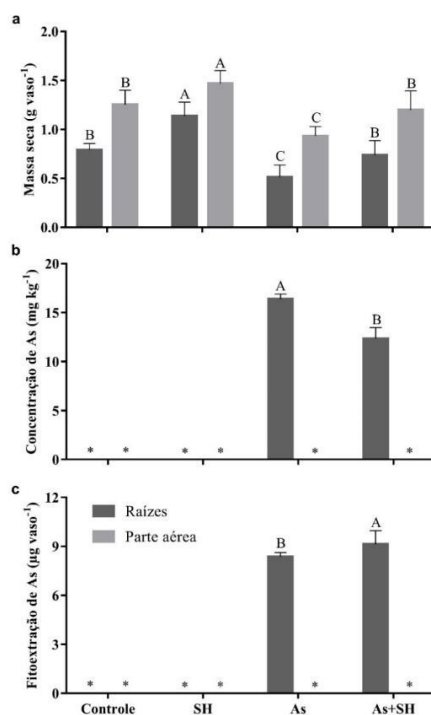
| Massa seca das raízes (g vaso ⁻¹) | As ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | | | | | |
|---|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 0 | 67 | 133 | 267 | 534 | 1068 |
| | 586 ± 21 a | 609 ± 42 a | 619 ± 50 a | 531 ± 37 a | 358 ± 34 b | 371 ± 41 b |

Valores apresentados representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem pelo teste LSD ($p < 0,05$). Concentrações de As foram assumidas como dados qualitativos.

3.2 Concentração ótima de SH associada à concentração tóxica de As: biomassa vegetal, concentração e fitoextração de As, concentração nutrientes e trocas gasosas

A MSR e a MSPA sofreram redução pela toxidez por As e os danos foram atenuados pela ação das SH (Fig. 7). A MSR das plantas controle foi $0,7 \text{ g vaso}^{-1}$, o tratamento SH aumentou (44%) para $1,1 \text{ g vaso}^{-1}$ e o tratamento As reduziu (35%) para $0,5 \text{ g vaso}^{-1}$. A MSPA nas plantas controle foi $1,3 \text{ g vaso}^{-1}$, aumentou (15%) para $1,5 \text{ g vaso}^{-1}$ no tratamento SH e reduziu (31%) para $0,9 \text{ g vaso}^{-1}$ no tratamento As. O tratamento As+SH atenuou os danos apresentados no tratamento As, apresentando $0,7 \text{ g vaso}^{-1}$ de MSR e $1,2 \text{ g vaso}^{-1}$ de MSPA, que corresponde um incremento de 40 e 33%, respectivamente, em relação ao tratamento As.

Figura 7 - Massa seca de raízes (MSR) e de parte aérea (MSPA) (a), concentração de arsênio (As) (b) e fitoextração de As (c) em plantas de milho sob adição de substâncias húmicas (SH), As e sua combinação (As +SH).

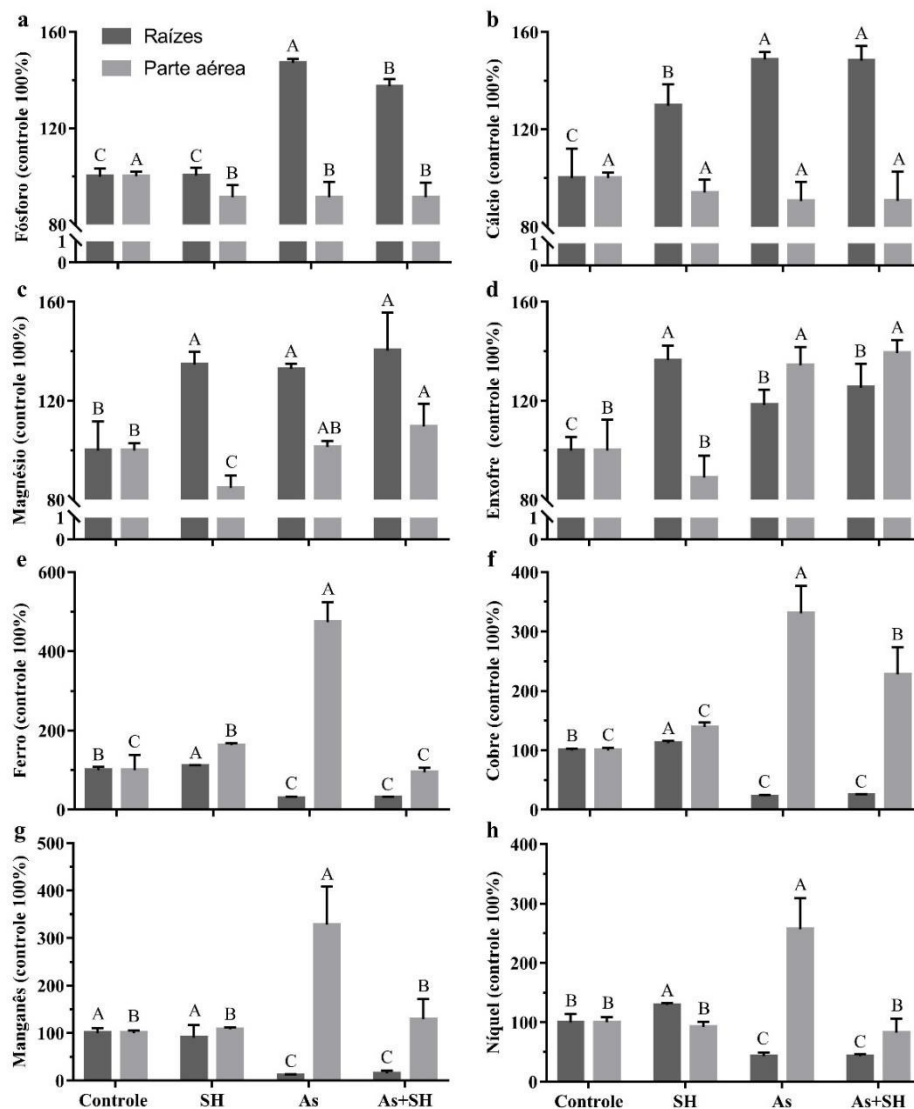


A média seguida pelas mesmas letras não difere pelo teste LSD ($p < 0,05$). * Abaixo do limite de detecção ($0,7 \text{ mg kg}^{-1}$).

A concentração de As nas raízes foi 16,4 mg kg⁻¹ no tratamento As e 12,3 mg kg⁻¹ no As+SH (redução de 35%), mas o aumento da MSR proporcionou aumento da fitoextração (Fig. 7). No tratamento As a fitoextração foi de 8,3 µg vaso⁻¹, enquanto na presença de SH (AS+SH), esse valor foi de 9,1 µg vaso⁻¹ (aumento de 9,6%).

A Figura 8 mostra a concentração de nutrientes (P, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn e Ni) nas raízes e parte aérea das plantas de milho nos diferentes tratamentos testados.

Figura 8 - Concentrações de fósforo (a), cálcio (b), magnésio (c), enxofre (d), ferro (e), cobre (f), manganês (g) e níquel (h) nas raízes e na parte aérea das plantas de milho tratadas com soluções contendo substâncias húmicas (SH), As e sua combinação (As +SH).



Os valores representam a média \pm desvio padrão. A média seguida pelas mesmas letras não difere pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Com relação ao teor de nutrientes nas raízes, as concentrações de P, Ca, Mg e S das plantas do tratamento controle foram 683, 857, 567 e 618 g kg⁻¹, respectivamente (Fig. 8). No tratamento SH, as concentrações de Ca, Mg e S aumentaram 30, 35 e 36 % para 1113, 764 e

844 g kg⁻¹ e a de P não foi alterada (p<0,05). O tratamento As aumentou 47, 49, 33 e 18 % as concentrações de P, Ca, Mg e S respectivamente em relação ao tratamento controle, totalizando valores de 1006, 1275, 753 e 732 g kg⁻¹ e o tratamento As+SH apresentou valores semelhantes (p<0,05). A concentração de P aumentou 47% com valores na ordem de 1006 g kg⁻¹ no tratamento As e o tratamento As+SH diminuiu a concentração deste elemento no tecido das raízes (redução de 7%, em relação ao tratamento As), apresentando concentração de 939 g kg⁻¹. O tratamento As+SH não alterou (p<0,05) as concentrações de Ca, Mg e S apresentadas no tratamento As, mas diminuiu (redução de 7%, em relação ao tratamento As) para 939 g kg⁻¹ a concentração de P.

Na parte aérea, as concentrações de P, Ca, Mg e S nas plantas controle foram 1382, 4317, 1650 e 960 g kg⁻¹, respectivamente (Fig. 8). O tratamento SH reduziu as concentrações de P e Mg para 1262 e 1399 g kg⁻¹, respectivamente, e não alterou (p<0,05) as de Ca e S. O tratamento As não alterou (p<0,05) as concentrações de Ca e Mg, mas reduziu (9%) a concentração de P para 1263 g kg⁻¹ e aumentou (34%) a de S para 1291 g kg⁻¹. O tratamento As+SH apresentou valores semelhantes (p<0,05) aos do tratamento As.

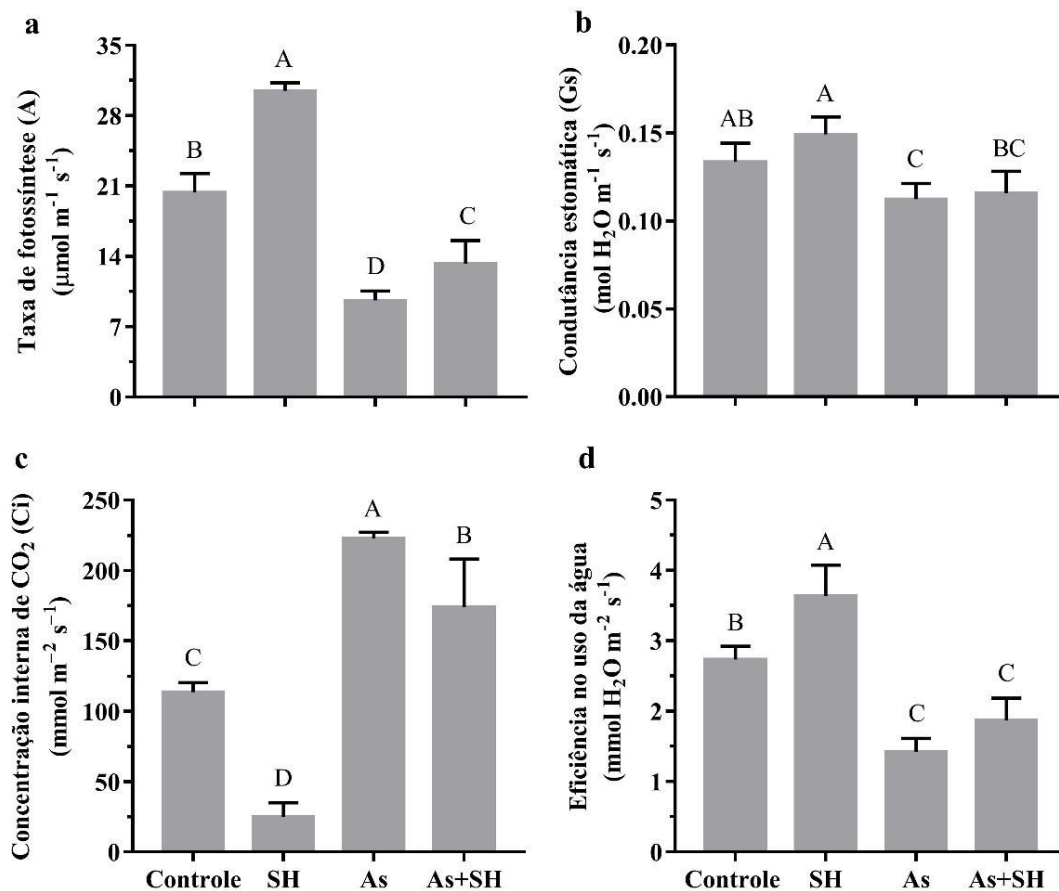
Ainda com relação as concentrações de nutrientes na parte aérea, as concentrações de Fe, Cu, Mn e Ni do tratamento controle foram 213, 6, 1, 11 mg kg⁻¹, respectivamente (Fig. 8). O tratamento SH aumentou em 63% a concentração de Fe (347 mg kg⁻¹) e não foram alteradas as concentrações de Cu, Mn e Ni. O tratamento com As individualmente aumentou em 374, 231, 228 e 157 % as concentrações de Fe, Cu, Mn e Ni com valores brutos médios de 1009, 20, 3 e 28 mg kg⁻¹, respectivamente. O tratamento com o uso combinado entre As e SH diminuiu (redução de 401, 45, 153 e 211 %, em relação ao tratamento As) os valores das concentrações de Fe, Cu, Mn e Ni apresentadas no tratamento As, com valores de 202, 13, 1 e 9 mg kg⁻¹, respectivamente.

As concentrações de Fe, Cu, Mn e Ni nas raízes das plantas controle foram 1141, 21, 45 e 37 mg kg⁻¹, respectivamente (Fig. 8). O tratamento SH aumentou (11, 12 e 29%) as concentrações de Fe, Cu e Ni para 1270, 24 e 48 mg kg⁻¹, respectivamente, mas não alterou (p<0,05) a concentração de Mn. O tratamento As reduziu (70, 77, 89 e 57%) as concentrações de Fe, Cu, Mn e Ni para 337, 5, 5 e 16 mg kg⁻¹, respectivamente, e o tratamento com As+SH apresentou valores semelhantes (p<0,05).

Os atributos de troca gasosa nas folhas das plantas de milho foram alterados devido à adição de SH e As (Fig. 9). As plantas cultivadas com adição de As tiveram a taxa fotossintética (A) reduzida em 53% em relação ao controle, enquanto a condutância estomática (Gs) e a eficiência no uso da água (EUA) foram reduzidas em 16% e 48%, respectivamente e a

concentração interna de CO_2 (C_i) aumentou 96%. Por outro lado, as plantas tratadas com SH apresentaram aumentos de 50% em A e 33% em EUA em comparação com o controle e redução de 78% na C_i . A presença de SH na solução contendo As não atenuou o efeito negativo do contaminante em relação à Gs e EUA. No entanto, atenuou o efeito na A e C_i , uma vez que o tratamento As+SH apresentou A 18% maior e C_i 22% menor em comparação ao tratamento As.

Figura 9 - Taxa de fotossíntese (a), condutância estomática (b), concentração interna de CO_2 (c) e eficiência no uso da água (d) em plantas de milho tratadas com substâncias húmicas (SH), As e sua combinação (As + SH).



Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$).

4 Discussão

A redução da MSR (Fig. 6 e 7) nas plantas sob o tratamento com As pode ter ocorrido devido à alterações na anatomia das raízes (YADAV et al., 2014), que pode ter causado alterações no metabolismo vegetal, inibindo a proliferação e o alongamento das raízes, causando alterações mitóticas (DE FREITAS-SILVA et al., 2016), aumentando a atividade da invertase ácida e reduzindo a disponibilidade de sacarose (KAUR et al., 2012). Os efeitos negativos relacionados acima provavelmente levaram as plantas a uma menor absorção de

nutrientes (MALLICK et al., 2013; MARWA; MEHARG; RICE, 2012) e a uma redução da taxa fotossintética líquida (GUSMAN et al., 2013), que juntas contribuem para uma redução do crescimento vegetativo.

Por outro lado, a contribuição do SH para o crescimento das plantas (Fig. 6 e 7) tem sido associada à maior capacidade da planta em absorver nutrientes, promover a formação de ATP, aminoácidos e proteínas que levam a uma maior taxa fotossintética (CANELLAS et al., 2005). A ativação das enzimas H^+ -ATPase gera energização dos sistemas de translocação de íons secundários, fundamentais para a absorção de nutrientes e aumenta a plasticidade da parede celular, o que está relacionado à teoria do crescimento ácido (RODDA et al., 2006). A estimulação da planta por materiais húmicos com as SH é muito bem relatada por BUSATO et al. (2016); CANELLAS; OLIVARES (2014); DOBBSS et al. (2016); NARDI et al. (2016) e está associado principalmente a aumentos no crescimento das raízes laterais e na atividade de enzimas responsáveis pela absorção de nutrientes. TREVISAN et al. (2010) mostraram que a promoção do crescimento de raízes laterais em plantas tratadas com SH ocorre devido ao seu efeito tipo auxínico. Usando espectrometria de massa, MUSCOLO; CUTRUPI; NARDI (1998) detectou moléculas com características semelhantes à auxina na estrutura do SH. Semelhante às auxinas, a SH estimula o crescimento de plantas em uma relação dose-dependente, promovendo aumentos em baixas concentrações e inibições em altas doses (DOBBSS et al., 2016; PITTARELLO et al., 2018).

Tanto o fosfato quanto o arsenato têm propriedades químicas semelhantes e competem pelos mesmos transportadores (SMITH et al., 2010), podendo até substituir algumas funções celulares (SHAIBUR et al., 2008), mas não substitui no transporte de energia (MEHARG, 1994; SMITH et al., 2010). O As substitui o P na molécula de ATP formando ADP-As, diminuindo o transporte de energia (MEHARG, 1994) gerando maior demanda pela absorção de P e aumentando a absorção (CARBONELL-BARRACHINA et al., 1998). O aumento da absorção de P (Fig. 8) sob estresse por As também já foi observado em plantas de milho (ZHANG et al., 2007), *Pteris vittata* L (CAO; MA; TU, 2004; LUONGO; MA, 2005) e canola (COX; BELL; KOVAR, 1996).

TAN; NOPAMORNBODI (1979) também observaram menor concentração de P em plantas de milho tratadas com SH (Fig. 8) e atribuíram a um melhor metabolismo do nutriente, que acarreta menor demanda de absorção. O aumento da H^+ -ATPase promovido pelas SH (AGUIAR et al., 2013; DOBBSS et al., 2016; ZANDONADI et al., 2010) pode ser um dos mecanismos que melhoram o metabolismo do P. Como o fosfato e arsenato tem dinâmicas de absorção semelhantes, a menor demanda pelo nutriente promove menores absorções (SMITH

et al., 2010), contribuindo para as menores concentrações de As e P (Fig. 7 e 8) no tratamento As+SH, em relação ao tratamento As. Outro fator que contribui para a redução da concentração de As em plantas tratadas com SH (tratamento As+SH) é a complexação na solução, como observado em solos alagados tratados com SH (QIAO et al., 2019).

Aumentos das concentrações Fe, Cu e Mn em plantas sob estresse por As (Fig. 8) são muito relatados e isso ocorre devido a uma maior demanda devido a mecanismos de defesa antioxidante, uma vez que esses nutrientes atuam como cofatores enzimáticos (KUMAR et al., 2015; MALLICK et al., 2013). O Ni também estimula o metabolismo antioxidante das plantas, aumentando a atividade de enzimas ascorbato-glutationas como catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), que protege a célula vegetal de espécies reativas de oxigênio (ERO) (NOCTOR; FOYER, 2016).

Os aumentos das concentrações de Ca, Mg e S (49, 33 e 18 %, respectivamente) foram menores que os de Fe, Cu, Mn e Ni (374, 231, 228 e 157 %, respectivamente) (Fig. 8), mas também são relatados em plantas sob estresse por As. O S tem papel considerável em mecanismos de resposta à estresses, uma vez que é componente importante da glutatona, tióis não protéicos (metabólitos antioxidantes) e fitocelatinas (SAKAI et al., 2010). Assim como no presente trabalho, KUMAR et al. (2015) também verificaram aumento das concentração de S em *Wrightia arborea* e observaram correlação entre o teor de As e o de tióis não proteicos, confirmando que o aumento foi efeito do estresse. O aumento da concentração de Ca e Mg também tem relação com o estresse por As, uma vez que o aumento da concentração de Ca foi documentado em plantas de milho (MALLICK et al., 2013), de canola (COX; BELL; KOVAR, 1996) e *Wrightia arborea* (KUMAR et al., 2015) e o de Mg em trigo (QUANJI et al., 2007) e feijão (CARBONELL-BARRACHINA; BURLÓ-CARBONELL; MATAIX-BENEYTO, 1997). Entretanto, o tratamento SH também aumentou a concentração de Ca, Mg e S em relação ao controle e apresentou valores próximos aos dos tratamentos As e As+SH, demonstrando que o aumento das suas concentrações no tratamento As não é uma resposta evidente do estresse.

A taxa de fotossíntese (A) sofreu redução pelo estresse por As e foi atenuada pelas SH, mas a atenuação não ocorreu nas reduções apresentadas em Gs e EUA (Fig. 9). A substituição de fosfato por arsenato causa dissociação do transporte de elétrons na síntese de ATP (FINNEGAN; CHEN, 2012), reduzindo o fluxo de elétrons fotossintéticos através das membranas dos tilacóides e refletindo na taxa de fotossíntese (HASANUZZAMAN et al., 2015). Além disso, o estresse promovido pelo As também afeta os dispositivos de coleta de luz (HASANUZZAMAN et al., 2015), diminui o teor de clorofila e a atividade do fotossistema II (DUMAN et al. 2010). CAPORALE et al. (2018) observaram redução do teor de clorofila A e

B em plantas de cenoura estressadas por As e aplicação de ácido húmico conseguiu melhorar os teores desses pigmentos fotossintetizantes. HAGHIGHI; TEIXEIRA DA SILVA (2013) observaram aumento na A sem elevação de Gs e EUA, em plantas de tomate tratadas com ácido húmico e atribuem o aumento ao metabolismo de carboidratos. Por outro lado, CANELLAS et al. (2013) observaram aumento na A e na Gs em plantas de milho tratadas com SH e POPESCU; POPESCU (2018) no teor de clorofila e A e ambos atribuíram a alterações na absorção e no metabolismo da água e dos nutrientes.

O aumento da Ci acompanhado de redução da condutância estomática é um indicador de que o As promoveu danos diretos no processo de fixação de CO₂, provavelmente através de uma diminuição no número e na atividade de enzimas relacionadas ao ciclo de Calvin como ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO) (GUSMAN et al., 2013; SILVA, 2008). Comportamento semelhante foi observado em *Mimosa caesalpiniaefolia* (COSTA, 2007), *Borreria verticillata* (SILVA, 2008) e *Lactuca sativa* (GUSMAN et al., 2013). Nossos resultados demonstram redução da Ci nas plantas tratadas com SH (Fig. 9), indicando benéfica ação nos processos de fixação de CO₂.

5 Conclusão

Os resultados confirmam a hipótese H₁, uma vez que SH extraídas de vermicomposto aumentaram a fitoextração de As e atenuaram seu estresse em plantas de milho, evidenciado pelas reduções de biomassa e alterações nutricionais e na taxa de fotossíntese. A taxa de fotossíntese sofreu redução pelo estresse por As e foi atenuado pela ação das SH. A condutância estomática e eficiência do uso da água também sofreram reduções pelo estresse por As, mas não foram atenuadas pelo tratamento com SH. A concentração interna de CO₂ aumentou com o estresse por As e foi amenizada pela ação das SH. As elevações das concentrações de P, Fe, Cu, Mn e Ni promovidas em resposta ao estresse por As, foram atenuadas pela ação das SH. As plantas tratadas com SH apresentaram menores concentrações de As, mas, como em contrapartida aumentaram a biomassa, pode-se afirmar que a fitoextração aumentou.

Referências

- ABDUL, K. S. M. et al. Arsenic and human health effects: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 828–846, nov. 2015.
- AGUIAR, N. O. et al. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. **Plant and Soil**, v. 362, n. 1–2, p. 161–174, 13 jan. 2013.

- BERTIN, P. N. et al. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. **The ISME Journal**, v. 5, n. 11, p. 1735–1747, 12 nov. 2011.
- BUNDSCHUH, J. et al. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. **Science of The Total Environment**, v. 429, p. 2–35, jul. 2012.
- BUSATO, J. G. et al. Efeito do extrato húmico solúvel em água e biofertilizante sobre o desenvolvimento de mudas de *Callophyllum brasiliense*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 86, p. 161, 30 jun. 2016.
- CANELLAS, L. P. et al. Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas. In: CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. D. A. (Eds.). **Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. v. 1 ed. Campos dos Goytacazes: p. 224–243.
- CANELLAS, L. P. et al. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1–2, p. 119–132, 23 maio 2013.
- CANELLAS, L. P. et al. Humic acids increase the maize seedlings exudation yield. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2019.
- CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 3, 2014.
- CAO, X.; MA, L. Q.; TU, C. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). **Environmental Pollution**, v. 128, n. 3, p. 317–325, fev. 2004.
- CAPORALE, A. G. et al. May humic acids or mineral fertilisation mitigate arsenic mobility and availability to carrot plants (*Daucus carota* L.) in a volcanic soil polluted by As from irrigation water? **Chemosphere**, v. 193, p. 464–471, 2018.
- CARBONELL-BARRACHINA, A. A. et al. Tomato plant nutrition as affected by arsenite concentration. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 235–244, fev. 1998.
- CARBONELL-BARRACHINA, A. A.; BURLÓ-CARBONELL, F.; MATAIX-BENEYTO, J. Effect of sodium arsenite and sodium chloride on bean plant nutrition (macronutrients). **Journal of Plant Nutrition**, v. 20, n. 11, p. 1617–1633, nov. 1997.
- CHEN, Z. et al. Enhanced bioreduction of iron and arsenic in sediment by biochar amendment influencing microbial community composition and dissolved organic matter content and

- composition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 311, n. 422, p. 20–29, jul. 2016.
- COSTA, A. C. **Bases fisiológicas da ação do arsênio em algumas espécies de cerrado**. Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- COX, M. S.; BELL, P. F.; KOVAR, J. L. Differential tolerance of canola to arsenic when grown hydroponically or in soil. **Journal of Plant Nutrition**, v. 19, n. 12, p. 1599–1610, 1996.
- DE FREITAS-SILVA, L. et al. Arsenic accumulation in Brassicaceae seedlings and its effects on growth and plant anatomy. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 1–9, fev. 2016.
- DOBBSS, L. B. et al. Bioactivity of mangrove humic materials on *Rizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* seedlings, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 23, p. 1168–1176, 2016.
- DOBBSS, L. B. et al. Alleviation of iron toxicity in *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) by humic substances. **Environmental Science and Pollution Research**, 2018.
- FINNEGAN, P. M.; CHEN, W. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. June, p. 1–18, 2012.
- GUIMARAES, F. P. et al. Potential of macrophyte for removing arsenic from aqueous solution. **Planta Daninha**, v. 30, n. 4, p. 683–696, 2012.
- GUSMAN, G. S. et al. Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 4, p. 1201–1209, 28 abr. 2013.
- HAGHIGHI, M.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Amendment of hydroponic nutrient solution with humic acid and glutamic acid in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) culture. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 59, n. 4, p. 642–648, ago. 2013.
- HASANUZZAMAN, M. et al. Arsenic Toxicity in Plants and Possible Remediation. In: **Soil Remediation and Plants**. Elsevier, 2015. p. 433–501.
- HOAGLAND, D. C.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plant without soil. California Agricultural Experiment. **Circular 337. The College of Agriculture University of California. Berkeley.**, 1950.
- KUMAR, D. et al. Effect of Arsenic on Growth, Arsenic Uptake, Distribution of Nutrient Elements and Thiols in Seedlings of *Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, n. 2, p. 128–134, fev. 2015.
- LUONGO, T.; MA, L. Q. Characteristics of Arsenic Accumulation by *Pteris* and non-*Pteris* Ferns. **Plant and Soil**, v. 277, n. 1–2, p. 117–126, dez. 2005.

- MALLICK, S. et al. Role of sulfate in detoxification of arsenate-induced toxicity in *Zea mays* L. (SRHM 445): nutrient status and antioxidants. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 2, p. 140–154, jun. 2013.
- MARTINS, G. C. et al. Assessing the Brazilian prevention value for soil arsenic: Effects on emergence and growth of plant species relevant to tropical agroecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 694, p. 133663, 2019.
- MARWA, E. M. M.; MEHARG, A. A.; RICE, C. M. Risk assessment of potentially toxic elements in agricultural soils and maize tissues from selected districts in Tanzania. **Science of The Total Environment**, v. 416, p. 180–186, fev. 2012.
- MEHARG, A. A. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, n. 9, p. 989–993, set. 1994.
- MUSCOLO, A.; CUTRUPI, S.; NARDI, S. Iaa detection in humic substances. **Soil Biol. Biochem**, v. 30, p. 1199–1201, 1998.
- NARDI, S. et al. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 1, p. 18–23, fev. 2016.
- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1581–1592, 2016.
- PITTARELLO, M. et al. Possible developments for ex situ phytoremediation of contaminated sediments, in tropical and subtropical regions – Review. **Chemosphere**, v. 182, p. 707–719, 2017.
- PITTARELLO, M. et al. Effects of different humic substances concentrations on root anatomy and Cd accumulation in seedlings of *Avicennia germinans* (black mangrove). **Marine Pollution Bulletin**, v. 130, n. March, p. 113–122, maio 2018.
- PITTARELLO, M. et al. Dissolved humic substances supplied as potential enhancers of Cu, Cd, and Pb adsorption by two different mangrove sediments. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 3, p. 1554–1565, 12 mar. 2019.
- POPESCU, G. C.; POPESCU, M. Yield, berry quality and physiological response of grapevine to foliar humic acid application. **Bragantia**, v. 77, n. 2, p. 273–282, 22 mar. 2018.
- QIAO, J. et al. Humic Substances Facilitate Arsenic Reduction and Release in Flooded Paddy Soil. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 9, p. 5034–5042, 7 maio 2019.
- QUANJI, L. et al. Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat

- (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 3, p. 326–331, 2007.
- RODDA, M. R. C. et al. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - Efeito da concentração. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 30, n. 4, p. 649–656, 2006.
- SAKAI, Y. et al. Influence of arsenic stress on synthesis and localization of low-molecular-weight thiols in *Pteris vittata*. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 12, p. 3663–3669, dez. 2010.
- SAMUEL, S. et al. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of dl- α -lipoic acid. **Toxicology Letters**, v. 155, n. 1, p. 27–34, jan. 2005.
- SHAFIGH, M.; GHASEMI-FASAEI, R.; RONAGHI, A. Influence of plant growth regulators and humic acid on the phytoremediation of lead by maize in a Pb-polluted calcareous soil. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 12, p. 1733–1740, 2016.
- SHAIBUR, M. R. et al. Physiological and Mineralogical Properties of Arsenic-Induced Chlorosis in Barley Seedlings Grown Hydroponically. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, n. 2, p. 333–353, 18 fev. 2008.
- SHUKLA, A.; SRIVASTAVA, S. A Review of Phytoremediation Prospects for Arsenic Contaminated Water and Soil. In: **Phytomanagement of Polluted Sites**. Elsevier, 2019. p. 243–254.
- SILVA, K. L. F. **Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio**. Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- SINGH, R. et al. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 247–270, 2015.
- SMITH, S. E. et al. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. **Plant and Soil**, v. 327, n. 1–2, p. 1–21, 8 fev. 2010.
- TAN, K. H.; NOPAMORNBODI, V. Effect of Different Levels of Humic Acid on Nutrient Content and Growth of Corn (*Zea Mays* L.). **Plant and Soil**, v. 51, p. 283–287, 1979.
- TREVISAN, S. et al. Humic substances biological activity at the plant-soil interface. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 6, p. 635–643, 2010.
- WAN, X.; LEI, M.; CHEN, T. Cost-benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 563–564, p. 796–802, 2016.
- YADAV, G. et al. Light Intensity Alters the Extent of Arsenic Toxicity in *Helianthus annuus* L. Seedlings. **Biological Trace Element Research**, v. 158, n. 3, p. 410–421, 4 jun. 2014.

ZANDONADI, D. B. et al. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. **Planta**, v. 231, n. 5, p. 1025–1036, 2010.

ZHANG, H. et al. The influence of arbuscular mycorrhizal fungi on As and P uptake by maize (*Zea mays* L.) from As-contaminated soils. **Applied Soil Ecology**, v. 38, n. 2, p. 137–145, 2007.

ARTIGO 3 - SUBSTÂNCIAS HÚMICAS MODIFICAM A EXTRUSÃO RADICULAR DE H⁺ E A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLÂNTULAS DE MILHO (*ZEA MAYS* L.) ESTRESSADAS POR ARSÊNIO

Resumo

A fitorremediação de arsênio (As) tem apresentado potencial e isso aumenta a importância de estratégias voltadas para que plantas aumentem seu poder de fitorremediar regiões contaminadas e que reduzam sua fitotoxidez no meio ambiente. Como as substâncias húmicas (SH) ativam diversos mecanismos de defesa ao estresse e tem a capacidade reconhecida de incrementar o crescimento de raízes, podem ser utilizadas para amenizar os problemas citados anteriormente. O objetivo deste trabalho foi avaliar se SH extraídas de vermicomposto podem atenuar efeitos tóxicos do As na bioenergética de plântulas de milho, no âmbito da extrusão radicular de H⁺ e da atividade das enzimas CAT, APX e SOD. As concentrações de As (0,5 mmol de As L⁻¹) e SH (6,9 mmol de C de SH L⁻¹) foram definidas em estudos anteriores e o ensaio foi realizado em câmara de germinação, onde as sementes foram germinadas por 48 horas e depois expostas aos tratamentos, por igual período, em papeis imersos nas soluções Controle (CaCl₂ 2 mM), SH (CaCl₂ 2 mM + SH), As (CaCl₂ 2 mM + As) e As+SH (CaCl₂ 2 mM + As + SH). Os resultados demonstraram que os efeitos do As na bioenergética vegetal (extrusão radicular de H⁺ e da atividade das enzimas CAT, APX e SOD) foram aliviados pelas SH, confirmando seu potencial em reduzir possíveis estresses vegetais.

Palavras chave: Elemento-traço • toxidez • húmus • ATP • Enzimas.

1 Introdução

A fitorremediação de áreas contaminadas por arsênio (As) tem demonstrado grande potencial (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2019), aumentando a importância do entendimento de mecanismos que reduzam a sua toxidez (KUMAR et al., 2015; MALLICK et al., 2013). Uma ferramenta utilizada para amenizar o efeito tóxico de elementos-traço é a aplicação de bioestimulantes, como as substâncias húmicas (SH) (CAPORALE et al., 2018; DOBBSS et al., 2018; PITTARELLO et al., 2018, 2019). A sua utilização para reduzir a fitotoxidez por As foi explorada em estudos recentes que observaram alívio do estresse no âmbito do crescimento (CAPORALE et al., 2018), fotossíntese (Artigo 2, páginas 66) e concentração dos nutrientes no tecido vegetal (Artigo 2, páginas 65).

Em alguns casos, plantas sob estresse por As aumentam a concentração de Fe, Mn e Cu (KUMAR et al., 2015; MALLICK et al., 2013) e a utilização de SH atenua seus efeitos (Artigo 2, página 65). Como estes micronutrientes são cofatores de enzimas antioxidantes (KUMAR et al., 2015; MALLICK et al., 2013), caso as atenuações promovidas pelas SH tenham relação com a redução do estresse, um comportamento semelhante deve ocorrer com a atividade de enzimas como catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e superóxido dismutase (SOD).

A concentração de P também pode aumentar com toxidez por As (CARBONELL-BARRACHINA et al., 1998) uma vez que o arsenato pode substituir o fosfato na ATP formando uma molécula ADP-As instável, levando à interrupção do fluxo de elétrons nas células (MEHARG, 1994; SMITH et al., 2010), provocando maior demanda pela absorção de P (CARBONELL-BARRACHINA et al., 1998), gerando maior atividade da H^+ -ATPase (MEHARG, 1994; SMITH et al., 2010) indicando possível aumento da extrusão radicular de H^+ . No Artigo 2 (página 65) foram observadas elevações nutricionais ocasionadas pelo estresse por As foram atenuadas por SH e esta redução na absorção deve ocorrer por uma menor extrusão radicular de H^+ .

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar se SH extraídas de vermicomposto podem atenuar efeitos tóxicos do As na bioenergética de plântulas de milho, no âmbito da extrusão radicular de H^+ e da atividade das enzimas CAT, APX e SOD, a fim de confirmar ou negar as seguintes hipóteses:

H₀: substâncias húmicas não são capazes de atenuar efeitos da toxidez por arsênio sobre a bioenergética vegetal (extrusão radicular de H^+ e atividade das enzimas CAT, APX e SOD) em plântulas de milho.

H₁: substâncias húmicas atenuam efeitos da toxidez por arsênio sobre a bioenergética vegetal (extrusão radicular de H^+ e atividade das enzimas CAT, APX e SOD) em plântulas de milho.

2 Materiais e métodos

As SH foram extraídas de vermicomposto proveniente de esterco bovino seguindo as recomendações da sociedade internacional das substâncias húmicas (IHSS) e as doses de SH (6,9 mmol de C de SH L⁻¹) e As (0,5 mmol de As L⁻¹) foram definidas no Artigo 2 (página 63). O ensaio foi conduzido em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas e temperatura 28 ± 1°C, onde as sementes (Syngenta - Híbrido Feroz Viptera 3) foram germinadas em bandeja

por 48 horas em papéis de germinação na horizontal e então selecionadas as com raízes entre 1 e 1,5 cm para serem utilizadas nos ensaios a seguir:

2.1 Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade das SH sobre a bomba de H⁺

A estimativa da atividade da H⁺-ATPase foi avaliada pela medição de acidez em solução (AGUIAR et al., 2013; DA SILVA et al., 2015), realizada nas plântulas de milho dispostas em papéis de germinação enrolados na vertical em potes de 500 ml (3 sementes papel e 3 papéis por pote), com 100 ml dos seguintes tratamentos: SH (CaCl₂ 2 mM + 6,9 mmol de C de SH L⁻¹), As (CaCl₂ 2 mM + 0,5 mmol de As L⁻¹) e As+SH (CaCl₂ 2 mM + 0,5 mmol de As L⁻¹ + 6,9 mmol de C de SH L⁻¹). Nesse experimento, o meio mínimo (CaCl₂ 2 mM) foi utilizado a fim de evitar qualquer influência dos nutrientes, que poderiam funcionar de maneira sinérgica com os tratamentos, estimulando o desenvolvimento radicular e o metabolismo das plântulas (AGUIAR et al., 2013). As plantas foram submetidas ao tratamento com e sem os tratamentos controle (CaCl₂ 2 mM) durante 48 horas. Após este período, foram transferidas para um recipiente com 50 mL de uma solução de CaCl₂ 2mM a pH 7. A medida da acidez (pH) da solução foi realizada com o auxílio de um pHmetro durante 150 minutos. As raízes foram digitalizadas e secas em estufa de ar forçado, e a quantidade de H⁺ foi expressa em extrusão de H⁺ por grama de massa seca de raiz. Desse mesmo experimento, amostras de raízes e folhas foram coletadas, mantidas a 4° C e levadas imediatamente para a extração dos extratos enzimáticos brutos e posterior análise da atividade das enzimas antioxidantes (PEIXOTO et al., 1999).

2.2 Análises Bioquímicas (atividade das enzimas antioxidantes)

2.2.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Para obtenção do extrato enzimático, amostras de raízes e folhas (massa fresca) das plântulas submetidas aos diferentes tratamentos foram maceradas em nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado um meio de homogeneização composto por: 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) (PEIXOTO et al., 1999). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 12.000 g por 15 min, a 4°C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

2.2.2 Superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1)

A atividade total de SOD foi determinada por espectrometria a 25 ° C, seguindo a redução do citocromo *c* a 550 nm, conforme descrito por STEEL; NAIR, (1995) com pequenas modificações. A mistura de reação consistiu em tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8) contendo xantina 0,5 mM (dissolvida em NaOH) e citocromo 0,1 mM *c*. O ensaio de controle foi iniciado pela adição de 0,04 unidades de xantina oxidase e a taxa de redução do citocromo *c* foi monitorada a 550 nm por 1 min. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da taxa de redução do citocromo *c* pela adição de 10–50 µL de extrato vegetal. Uma unidade da atividade total de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de redução do citocromo *c* em 50%.

2.2.3 Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada como descrito por KRAUS; MCKERSIE; FLETCHER (1995) com algumas modificações. A atividade da CAT foi determinada por espectrometria a 25 ° C numa mistura de reação contendo tampão de 1 ml de 100 mM de fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 2,5 mL H₂O₂ (solução a 30%), preparado imediatamente antes da utilização. A reação foi iniciada pela adição de 15 µl de extrato de planta e a atividade foi determinada seguindo a decomposição de H₂O₂ pela alteração na absorbância a 240 nm durante 2 minutos contra um H₂O₂ de branco analítico.

2.2.4 Peroxidase do Ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11)

A atividade da peroxidase de ascorbato foi medida por espectrofotometria a 290 nm. A mistura de reação consistiu em uma solução contendo 650 µL de tampão fosfato de potássio (80 mM, pH 7,0), 100 µL de ascorbato 5 mM, 100 µL de EDTA 1 mM, 100 µL de H₂O₂ 1 mM e 50 µL de extrato em um Banho de água a 30 ° C. H₂O₂ foi adicionada no momento da leitura depois de 1 min numa cubeta de quartzo (NAKANO; ASADA, 1981).

2.3 Análise estatística

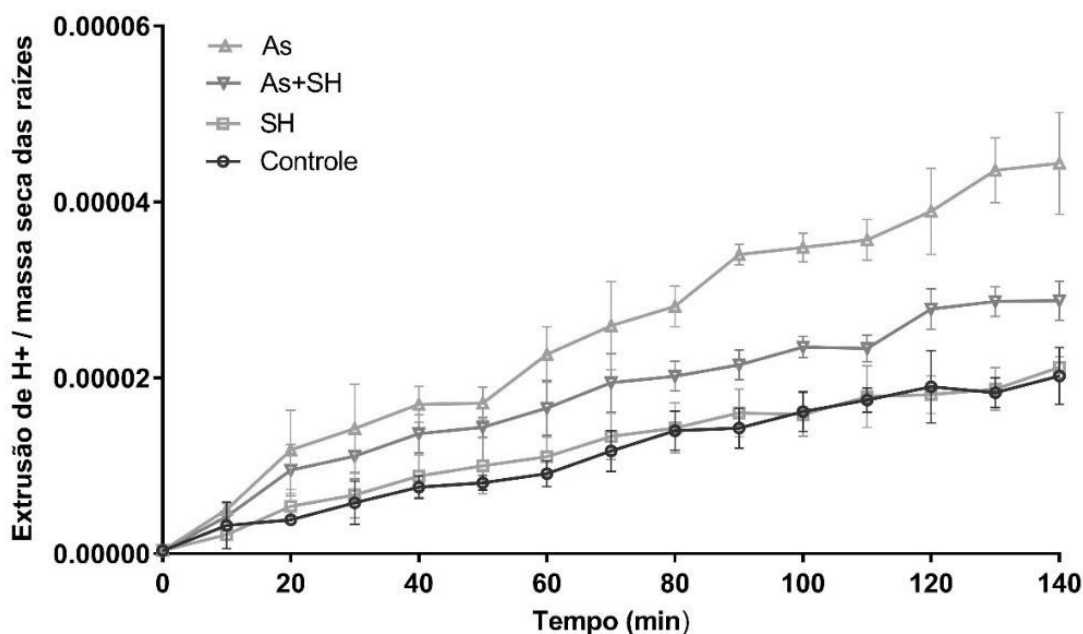
O delineamento experimental adotado foi blocos casualizados (DBC) com 4 tratamentos e 4 repetições (4 potes, contendo 3 papeis com 3 sementes em cada), totalizando 16 vasos. Os dados foram testados para normalidade (Shapiro-Wilk test) ($p = 0,05$) e realizada

a análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$). Quando houve diferença significativa, realizou-se teste t de Student (LSD) ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico Sisvar (5.0).

3 Resultados e discussão

A extrusão de H^+ por massa de raízes aumentou no tratamento As (90% maior que o controle) e o foi aliviado no tratamento As+SH (28% menor que o tratamento As) aos 140 min. O aumento da H^+ -ATPase pelo estresse por As tem relação com o P, pois o arsenato substitui o fosfato formando uma molécula ADP-As instável, gerando à interrupção do fluxo de elétrons nas células, aumentando por conseguinte a atividade desta enzima (MEHARG, 1994; SMITH et al., 2010) e possivelmente a extrusão de H^+ observada no presente estudo. Vale ressaltar que os aumentos na extrusão de H^+ (Fig. 10) são de ordem exponencial e refletem paralelamente seus respectivos decréscimos de pH, sendo que o tratamento utilizando-se a interação entre As+SH mostra um possível efeito de melhoria ao estresse provocado pelo As no meio de cultivo podendo ser um forte indicativo do efeito benéfico de materiais húmicos aliviando o efeito tóxico provocado por metais pesados às plantas.

Figura 10 - Extrusão de H^+ pela massa seca de raízes de plântulas de milho após tratamento com SH, As e sua combinação (As+SH).



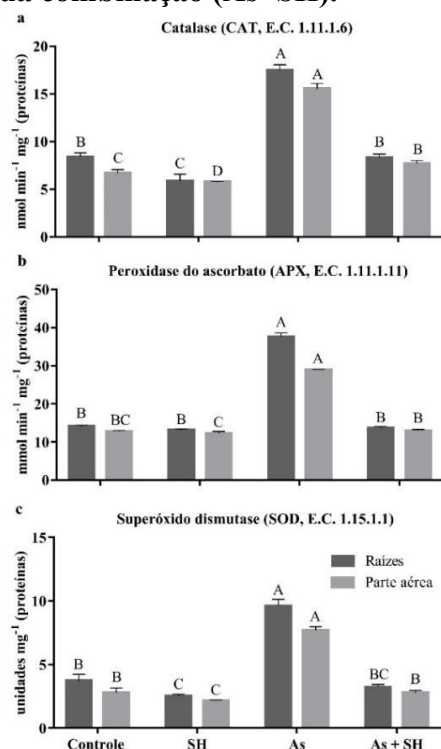
Valores apresentados representam a média \pm desvio padrão.

Em geral, observa-se, em outros trabalhos, uma maior acidez gerada pelo tratamento com materiais húmicos (AGUIAR, 2011; DA SILVA et al., 2015) refletindo uma

indução do “crescimento ácido” (CANELLAS et al., 2005; CORDEIRO; FERNANDES; SOUZA, 2010), ou seja um maior crescimento das plantas associado aos efeitos benéficos das substâncias húmicas. Em contrapartida, no presente trabalho observa-se que os tratamentos com SH e As+SH causam uma possível diminuição do estresse que foi confirmada pelos resultados da atividade das enzimas antioxidantes (Fig. 11). Plantas estressadas tendem a aumentar a atividade das bombas de H^+ e possivelmente, paralelamente terem aumentado a acidez das soluções de cultivo. De acordo com AGUIAR (2011), a acidificação do meio pode estar relacionada a dois principais fatores, sendo eles a produção de CO_2 pela respiração radicular e a extrusão de H^+ pela H^+ -ATPase presente tanto na membrana plasmática quanto nos vacúolos das células.

A atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e superóxido dismutase (SOD) nas raízes aumentaram em meio contaminado com As e foi reequilibrada para valores similares ao controle na combinação de As com SH (tratamento As+SH) (Fig. 11). A CAT nas plântulas do tratamento controle foi $8,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$, reduziu (30%) para $5,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ no SH, aumentou (109%) para $17,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ no As e foi similar ao controle no As+SH. A APX no controle foi $14,1 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$, aumentou (168%) para $37,6 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ no As e apresentou valores similares ao controle nos tratamentos SH e As+SH. A SOD nas plântulas controle foi 3,7 unidades mg prot^{-1} , reduziu (32%) para 2,5 unidades mg prot^{-1} no SH, aumentou (158%) para 9,6 unidades mg prot^{-1} no tratamento As e foi similar ao controle no As+SH.

Figura 11 - Atividade das enzimas catalase (CAT) (a); peroxidase do ascorbato (APX) (b); e superóxido dismutase (SOD) (c) nas raízes e na parte aérea de plântulas de milho após tratamento com SH, As e sua combinação (As+SH).



Valores apresentados representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não difere pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Na parte aérea a atividade das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e superóxido dismutase (SOD) também foi aumentada pela toxidez por As e amenizada na combinação com SH (tratamento As+SH) (Fig. 11). A CAT foi $6,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ no tratamento controle, reduziu (14%) para $5,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ no SH, aumentou (133%) para $15,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ no As e para $7,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ no As+SH (15% em relação ao controle). A APX foi $12,7 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ no controle, aumentou (127%) para $28,9 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ no As e apresentou valores similares ao controle nos tratamentos SH e As+SH. A SOD foi $2,8 \text{ unidades mg prot}^{-1}$ no controle, reduziu (23%) para $2,1 \text{ unidades mg prot}^{-1}$ no SH, aumentou (177%) para $7,7 \text{ unidades mg prot}^{-1}$ no As e no As+SH foi similar ao controle.

A exposição ao As resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) associadas à conversão de As (V) em As (III) e provoca danos às membranas celulares e ao DNA (SRIVASTAVA et al., 2011). Uma estratégia de proteção contra o estresse oxidativo é aumentar a produção de enzimas antioxidantes (Fig. 11), como como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) (DIXIT et al., 2015; SURIYAGODA; DITTERT; LAMBERS, 2018). Além disso, o As (V) pode regular positivamente genes que codificam enzimas antioxidantes (CHAKRABARTY et al., 2009).

A atividade das enzimas CAT, SOD e APX que aumentou com a presença de As (tratamento As), teve seu valor amenizado pela ação das SH (tratamento As+SH) no presente trabalho. Estes resultados concordam com SHETEIWY et al. (2017), que obtiveram aumento da atividade destas enzimas em plantas sob estresse por Zn e a combinação com SH também reduziu seus valores. Além disso, os resultados são reforçados pelo Artigo 2 (página 65), que apresentou aumento da concentração de micronutrientes em raízes na presença de As e reequilíbrio na combinação com SH, sugerindo uma redução da atividade enzimática, uma vez que Fe, Cu e Mn atuam como cofatores de enzimas antioxidantes (KUMAR et al., 2015; MALLICK et al., 2013).

No presente estudo, o tratamento SH reduziu a atividade das enzimas CAT e SOD (Fig. 11) e estes resultados foram consistentes com os observados por SHETEIWY et al. (2017). Entretanto em contraste com nossos resultados, alguns trabalhos observaram aumento na atividade de CAT, SOD e APX quando tratadas com SH, atribuindo a eventos bioquímicos semelhantes às condições de estresse, que levariam à estimulação da produção de EROs nas plântulas e à ativação de enzimas antioxidantes, melhorando os mecanismos de defesa para futuras condições de estresse (AGUIAR et al., 2016; DOBBSS et al., 2018; GARCÍA et al., 2012). MOROZESK et al. (2017) também observaram que de maneira geral as SH aumentam a atividade enzimática (CAT, SOD e APX), mas as respostas dependem da concentração, uma vez que em algumas não ocorreu o aumento, apontando que a atribuição de estresse benéfico sugerida em trabalhos anteriores (AGUIAR et al., 2016; DOBBSS et al., 2018; GARCÍA et al., 2012) precisa ser melhor investigada, pois nossos resultados indicam até redução da atividade de CAT e SOD.

4 Conclusão

Substâncias húmicas isoladas de vermicomposto apresentaram capacidade de alterar a bioenergética de plântulas de *Zea mays* L. Os efeitos do As (extrusão radicular de H⁺ e da atividade das enzimas CAT, APX e SOD) foram aliviados pelas SH, confirmando a hipótese H₁ e demonstrando seu potencial em reduzir o estresse oxidativo promovido por esse elemento-traço.

Referências

AGUIAR, N. O. **Características químicas e bioatividade de ácidos húmicos isolados de vermicompostos em diferentes estádios de maturação**. Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil., 2011.

- AGUIAR, N. O. et al. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. **Plant and Soil**, v. 362, n. 1–2, p. 161–174, 13 jan. 2013.
- AGUIAR, N. O. et al. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Annals of Applied Biology**, v. 168, n. 2, p. 203–213, 2016.
- CANELLAS, L. P. et al. Bioatividade de substâncias húmicas – ação sobre o desenvolvimento e metabolismo das plantas. In: CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. D. A. (Eds.). **Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. v. 1 ed. Campos dos Goytacazes: p. 224–243.
- CAPORALE, A. G. et al. May humic acids or mineral fertilisation mitigate arsenic mobility and availability to carrot plants (*Daucus carota* L.) in a volcanic soil polluted by As from irrigation water? **Chemosphere**, v. 193, p. 464–471, 2018.
- CARBONELL-BARRACHINA, A. A. et al. Tomato plant nutrition as affected by arsenite concentration. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 235–244, fev. 1998.
- CHAKRABARTY, D. et al. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. **Chemosphere**, v. 74, n. 5, p. 688–702, fev. 2009.
- CORDEIRO, F. C.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Influência dos ácidos húmicos no metabolismo vegetal pode ser considerada uma resposta auxínica? **Revista de Ciência da Vida**, v. 30, n. 2, p. 111–131, 2010.
- DA SILVA, M. A. C. et al. Ácidos húmicos de vermicomposto estimulam o crescimento in vitro de plântulas de *Cattleya warneri* (Orchidaceae). **Rodriguesia**, v. 66, n. 3, p. 759–768, 2015.
- DIXIT, G. et al. Sulfur mediated reduction of arsenic toxicity involves efficient thiol metabolism and the antioxidant defense system in rice. **Journal of Hazardous Materials**, v. 298, p. 241–251, nov. 2015.
- DOBBSS, L. B. et al. Alleviation of iron toxicity in *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) by humic substances. **Environmental Science and Pollution Research**, 2018.
- GARCÍA, A. C. et al. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. **Ecological Engineering**, v. 47, p. 203–208, out. 2012.
- IBRAHIM, M. et al. Application Effects of Cadmium and Humic Acid on the Growth, Chlorophyll Fluorescence, Leaf Gas Exchange and Secondary Metabolites in *Misai Kucing* (*Orthosiphon stamineus*) Benth. **Annual Research & Review in Biology**, v. 18, n. 3, p. 1–14, 2017.
- KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Increased Antioxidant Enzyme Activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570–576, fev. 1995.
- KUMAR, D. et al. Effect of Arsenic on Growth, Arsenic Uptake, Distribution of Nutrient Elements and Thiols in Seedlings of *Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, n. 2, p. 128–134, fev. 2015.
- MALLICK, S. et al. Role of sulfate in detoxification of arsenate-induced toxicity in *Zea mays* L. (SRHM 445): nutrient status and antioxidants. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 2, p.

140–154, jun. 2013.

MEHARG, A. A. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, n. 9, p. 989–993, set. 1994.

MOROZESK, M. et al. Effects of humic acids from landfill leachate on plants: An integrated approach using chemical, biochemical and cytogenetic analysis. **Chemosphere**, v. 184, p. 309–317, 2017.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068–1072, 1981.

PEIXOTO, P. H. P. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.

PITTARELLO, M. et al. Effects of different humic substances concentrations on root anatomy and Cd accumulation in seedlings of *Avicennia germinans* (black mangrove). **Marine Pollution Bulletin**, v. 130, n. March, p. 113–122, maio 2018.

PITTARELLO, M. et al. Dissolved humic substances supplied as potential enhancers of Cu, Cd, and Pb adsorption by two different mangrove sediments. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 3, p. 1554–1565, 12 mar. 2019.

SHETEIWY, M. S. et al. Regulation of ZnO nanoparticles-induced physiological and molecular changes by seed priming with humic acid in *Oryza sativa* seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 83, n. 1, p. 27–41, 27 set. 2017.

SHUKLA, A.; SRIVASTAVA, S. A Review of Phytoremediation Prospects for Arsenic Contaminated Water and Soil. In: **Phytomanagement of Polluted Sites**. Elsevier, 2019. p. 243–254.

SMITH, S. E. et al. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. **Plant and Soil**, v. 327, n. 1–2, p. 1–21, 8 fev. 2010.

STEEL, C. C.; NAIR, N. G. Oxidative Protective Mechanisms and Resistance to the Dicarboximide Fungicide, Iprodione, in *Alternaria alternata*. **Journal of Phytopathology**, v. 143, n. 9, p. 531–535, set. 1995.

SURIYAGODA, L. D. B.; DITTERT, K.; LAMBERS, H. Mechanism of arsenic uptake, translocation and plant resistance to accumulate arsenic in rice grains. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 253, n. October 2017, p. 23–37, 2018.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho de tese evidenciaram que substâncias húmicas (SH) isoladas de vermicomposto apresentaram capacidade de amenizar a fitotoxidez (*Corymbia citriodora* e *Zea mays* L.) por As e aumentar sua fitoextração (*Z. mays*) em meio hidropônico. Em relação à biomassa, robustez (*C. citriodora*), alterações nutricionais, fotossíntese e bioenergética (*Z. mays*) os efeitos danosos do As foram aliviados pelas SH, trazendo contribuições inovadoras para o estudo de fitotoxidez. O aumento da concentração de micronutrientes em plantas tratadas com As levantou a possibilidade de estresse oxidativo, por serem cofatores enzimáticos, e no decorrer do trabalho foi confirmada ao observar aumento atividade destas enzimas.

O trabalho trouxe boas perspectivas para utilização de SH sistemas de fitorremediação, uma vez que nas condições dos ensaios, ou seja, em meio hidropônico e solução nutritiva, houve redução da concentração de As nas raízes e com o aumento da massa da planta ocorreu maior fitoextração. Além disso, ainda pode servir de subsídio para ensaios futuros envolvendo a dinâmica do As com SH em solos e com outras espécies vegetais, sendo também importante explorar a interação com a biologia do solo, a combinação com outros amenizantes e contaminantes, a dinâmica de adsorção e até mesmo o a destinação final do material vegetal contaminado.