

**CRISTIANE JOVELINA DA SILVA**

**TOXIDADE DO ARSÊNIO E PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA  
ATENUAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS EM *Spirodela*  
*intermedia* W. KOCH (LEMNACEAE)**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013**

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

T

S586t  
2013

Silva, Cristiane Jovelina da, 1988-  
Toxicidade do arsênio e papel do óxido nítrico na atenuação  
dos danos causados em *Spirodela intermedia* W. Koch  
(Lemnaceae) / Cristiane Jovelina da Silva. – Viçosa, MG, 2013.  
ix, 57f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Enzimas. 2. Plantas aquáticas - Teor de arsênio.  
3. Arsênio. 4. Óxido nítrico. 5. Oxigênio. 6. Raízes (Botânica).  
7. Fluorescência. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 584.64

**CRISTIANE JOVELINA DA SILVA**

**TOXIDADE DO ARSÊNIO E PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA  
ATENUAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS EM *Spirodela*  
*intermedia* W. KOCH (LEMNACEAE)**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2013.

---

Luzimar Campos da Silva

---

Cleberson Ribeiro  
(Coorientador)

---

Juraci Alves de Oliveira  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus presente em cada dificuldade, cada superação e cada vitória!

Aos meus pais Aparecida e Geraldo pelo carinho, amor e apoio incondicional.

À minha família, por acreditar nos meus sonhos e sempre me incentivar a seguir em frente.

Aos meus grandes amigos, por me darem a força e o apoio necessários para que eu continuasse nessa caminhada.

À minha família viçosense Ana e Luana e principalmente à Amanda pelo apoio, carinho, amizade e ajuda.

Aos colegas de laboratório, Adinan, Fernanda Vidal, Fernanda Farnese, Luhan e Flávio pelo companheirismo e ajuda. Em especial, a companheira de trabalho, Regiane, pelos incontáveis dias de trabalho sem descanso. Pelos sábados, domingos e feriados em longos experimentos. Pelas risadas garantidas mesmo em dias exaustivos e pela motivação de que no final tudo daria certo.

Ao meu querido orientador e amigo Juraci, pelos conselhos, apoio, força e paciência, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu coorientador Cleberson pelos ensinamentos, atenção e pelos bons conselhos.

À professora Luzimar por aceitar o convite para a banca e assim, enriquecer esse trabalho.

Aos técnicos Bhering e Carlos pela ajuda, conselhos e sabedoria.

Aos professores do programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal e a todos os funcionários que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) que permitiu realizar as análises de fluorescência e varredura. Em especial à Karla, pela atenção e interesse no trabalho realizado.

Aos colegas de sala pelos incontáveis dias de estudo, pela ajuda, companhia e pelo carinho.

Ao amigo Haroldo pela imensa ajuda nas análises estatísticas e pelo apoio.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal pelo curso e infraestrutura oferecidos.

À Viçosa por me acolher durante esses dois anos de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para a minha formação como pessoa e profissional durante a execução do mestrado.

## **BIOGRAFIA**

Cristiane Jovelina da Silva, filha de Maria Aparecida da Cruz Silva e Geraldo Magela da Silva, nasceu em oito de março de 1988, na cidade de Barbacena, MG.

Em 2005 concluiu o segundo grau na “Escola Agrotécnica Federal de Barbacena”, Barbacena-MG, onde também obteve o título de Técnico em Zootecnia.

Em março de 2007 ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora, graduando-se em Ciências Biológicas em janeiro de 2011.

Iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa em fevereiro de 2011 e em fevereiro de 2013 submeteu-se à defesa de dissertação.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>4</b>
2.1 Objetivos específicos .....	4
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>5</b>

### **Capítulo I: Sistema de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelo arsênio em plantas de *Spirodela intermedia* W. Koch (Lemnaceae)**

<b>RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 Obtenção, aclimação e exposição das plantas ao arsenato .....	13
2.2 Determinação da concentração de arsênio .....	13
2.3 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio .....	13
2.4 Determinação da concentração de ânion superóxido .....	14
2.5 Determinação da peroxidação de lipídios .....	14
2.6 Avaliação do efeito do arsênio sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidativo das plantas .....	15
2.6.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos .....	15
2.6.2 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) .....	15
2.6.3 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) .....	16
2.6.4 Determinação da atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) .....	16
2.6.5 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) .....	17
2.6.6 Determinação da atividade da redutase da glutathiona (GR, EC 1.6.4.2) .....	17
2.6.7 Determinação da atividade da peroxidase da glutathiona (GPX, EC 1.11.1.9) .....	17
2.6.8 Determinação de proteínas .....	18
2.7 Extração e determinação das concentrações de antocianinas .....	18
2.8 Análise da micromorfologia dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	18
2.9 Delineamento experimental e análise estatística .....	19
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 Concentração de Arsênio em <i>S. intermedia</i> .....	19
3.2 Concentração de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e MDA .....	19
3.3 Efeito do arsênio sobre o sistema antioxidativo enzimático .....	20
3.4 Concentração de antocianinas .....	22
3.5 Micromorfologia dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	22
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>29</b>

**Capítulo 2: Efeito do óxido nítrico na atenuação do estresse oxidativo desencadeado por arsênio em *Spirodela intermedia* W. Koch (Lemnaceae)**

<b>RESUMO .....</b>	<b>34</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
2.1 Cultivo e exposição das plantas ao arsenato e ao nitroprussiato de sódio .	37
2.2 Determinação da concentração de arsênio .....	38
2.3 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos .....	38
2.3.1 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	38
2.3.2 Determinação da atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7).....	39
2.3.3 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1).....	39
2.4 Determinação de proteínas.....	40
2.5 Determinação da peroxidação de lipídios .....	40
2.6 Extravasamento de eletrólitos.....	40
2.7 Determinação da atividade da redutase do nitrato (NR, EC 1.6.6.1) .....	41
2.8 Detecção <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico (NO).....	41
2.9 Delineamento experimental e análise estatística .....	41
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
3.2 Peroxidação de lipídios e extravasamento de eletrólitos .....	42
3.3 Efeito do arsênio sobre o sistema antioxidativos enzimático das plantas...	43
3.4 Atividade da redutase do nitrato .....	44
3.5 Detecção <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico (NO).....	45
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>57</b>



## RESUMO

SILVA, Cristiane Jovelina da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Toxicidade do arsênio e papel do óxido nítrico na atenuação dos danos causados em *Spirodela intermedia* W. Koch (Lemnaceae).** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientador: Cleberson Ribeiro

A toxicidade do arsênio (As) e seus efeitos no sistema antioxidante enzimático e não enzimático foram analisados em *Spirodela intermedia*. As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, foram expostas a concentrações crescentes de As por 24 horas. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos de níveis tóxicos de As sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o sistema antioxidante enzimático e não enzimático e a morfologia externa das raízes. O acréscimo na concentração de As nas plantas desencadeou danos como aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. Houve aumento linear do ânion superóxido, porém o peróxido de hidrogênio aumentou somente até a concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de As. Também foi observado incremento no teor de antocianinas e na atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutathione (GPX) e redutase da glutathione (GR). Em contraste, houve pequena queda na atividade da enzima catalase. Foi visualizado alterações micromorfológicas na coifa da raiz. Apesar da redução no teor de peróxido de hidrogênio nas concentrações mais elevadas, a atividade das enzimas antioxidantes não foi suficiente para amenizar os danos, uma vez que a concentração do ânion superóxido e de MDA aumentou linearmente com o acréscimo de As. As alterações micromorfológicas visualizadas na coifa da raiz, provavelmente foram decorrentes do aumento de EROs e consequente aumento da peroxidação lipídica. Em um segundo experimento, óxido nítrico (NO) foi suprido na forma de nitroprussiato de sódio (SNP). As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5,  $\frac{1}{2}$  força iônica, foram expostas a quatro tratamentos, sendo eles controle e As com e sem SNP, permanecendo nessas condições por 24 horas. Avaliou-se a influência do óxido nítrico (NO) sobre o dano de membrana e a atividade das enzimas antioxidativas e produtora de NO. Realizou-se também a detecção de fluorescência *in situ* desencadeada por NO. Houve aumento no teor de MDA, extravasamento de eletrólitos, enzimas antioxidativas e redutase

do nitrato ao comparar o tratamento As ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) com As na presença de SNP. Sendo assim, considera-se que o efeito protetor da aplicação de SNP parece ser resultado da reação direta do NO com os EROs. Nas plantas submetidas ao estresse por As, observou-se maior produção de NO, resultado comprovado pela redutase do nitrato e pelo aumento na fluorescência. Quando fornecido na forma exógena, o NO também agiu diretamente na remoção de metabólitos tóxicos gerados em resposta ao As. Assim, verificou-se que o NO, fornecido pelo SNP, ameniza a toxicidade do As sobre o metabolismo de *S. intermedia*.

## ABSTRACT

SILVA, Cristiane Jovelina da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Toxicity of arsenic and role of nitric oxide in alleviating the damage caused in *Spirodela intermedia* W. Koch (Lemnaceae).** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-Adviser: Cleberson Ribeiro

The toxicity of arsenic (As) and its effects on antioxidant system were analyzed in *S. intermedia*. Plants treated in nutrient solution, pH 6.5, were exposed to increasing concentrations of As over a period of 24 hours. The objectives of this study were to evaluate the effects of toxic levels of As on production of reactive oxygen species (ROS), the antioxidative system and root external morphology. The increasing concentration of As was accompanied by higher production of reactive oxygen species and lipid peroxidation. There was a linear augmentation in the amount of superoxide anion and an increase in amount of hydrogen peroxide up to a concentration of 1.0 mg L<sup>-1</sup> As. Augmentation in the amount of anthocyanins and higher activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) was also observed. In contrast, there was a slight decay in catalase activity. Despite the reduction in the concentration of hydrogen peroxide in higher concentrations of As, the activity of antioxidant enzymes was not enough to buffer the damage, since the concentration of superoxide anion and MDA increased linearly with the increase of As. In a second experiment, nitric oxide (NO) was supplied as sodium nitroprusside (SNP). Plants treated in nutrient solution, pH 6.5, ½ ion force, were subjected to four conditions: control (nutrient solution); SNP (15 mg L<sup>-1</sup>); As (2.0 mg L<sup>-1</sup>); As + SNP (2.0 and 15 mg L<sup>-1</sup>, respectively) over a period of 24 hours. It was evaluated the influence of nitric oxide (NO) on membrane damage and activity of antioxidant enzymes and NO production enzyme. In situ fluorescence detection was used to reveal NO presence. There was an increase in MDA content, membrane leakage, activity of antioxidative enzymes and nitrate reductase comparing 2.0 mg L<sup>-1</sup> As conditions with As + SNP treatment. Therefore, it is considered that the protective effect of the application of SNP appears reflects direct reaction of NO with ROS. The plants under arsenic stress showed higher NO production, confirmed by the increase in nitrate reductase activity and augmentation in fluorescence levels. When

provided exogenously, NO also acted directly in the removal of toxic metabolites generated in response to As. Therefore, it was found that NO, supplied by SNP, buffers As toxicity in *S. intermedia*.

## INTRODUÇÃO GERAL

O arsênio (As) é um metalóide presente naturalmente na água e no solo, porém, atividades como a produção industrial de pesticidas, herbicidas, conservantes de madeira e a mineração aumentaram consideravelmente as concentrações desse elemento no ambiente (Bhattacharya et al., 2007). Algumas das formas químicas mais comuns de As incluem o arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), monometilarsenato (MMA) e dimetilarsenito (DMA), em ordem decrescente de toxicidade (Wang e Mulligan, 2006).

As maiores concentrações de As são encontrados nas águas subterrâneas, como resultado de interações água-rocha e de condições físicas e geoquímicas ideais para a mobilização e acumulação (Smedley e Kinniburgh, 2002). Em águas superficiais, ricas em oxigênio a concentração de As varia de 0,15-0,45  $\text{mg L}^{-1}$  (Sharma e Sohn, 2009), com predominância do arsenato, o qual, assim como o arsenito, é biodisponível para as plantas aquáticas (Rahman et al., 2007).

As plantas variam consideravelmente na sua tolerância ao As, conforme se observa em espécies que crescem perto de minas abandonadas ou em substratos ricos nesse elemento. Nessas condições, as plantas são capazes de acumular o elemento tóxico ou mesmo excluí-lo, podendo, portanto, tolerar o estresse imposto.

Vários estudos envolvendo a acumulação de As em plantas aquáticas vem sendo realizados por diversos pesquisadores, com principal foco sobre a aplicação das mesmas na fitorremediação (Robinson et al., 1995; Brooks e Robinson, 1998; Robinson et al., 2006; Rai, 2009). Dentre as espécies que apresentam crescimento rápido e maior capacidade para acumular elevada concentração de As destacam-se o aguapé (*Eichhornia crassipes*), a salvinia (*Salvinia* spp.), a samambaia d'água (*Azolla* spp.), a Hydrilla (*Hydrilla verticillata*), o agrião d'água (*N. officinale*, *N. microphyllum*) e as lentilhas d'água (*Lemna*, *Spirodela* e *Wolffia*) (Rahman e Hasegawa 2011).

As espécies *Spirodela intermedia* e *Lemna minor* L., da família Lemnaceae, juntamente com as macrófitas flutuantes *Pistia stratiotes* L. (alface d'água), apresentam elevada taxa de crescimento e têm sido usados para a remoção de Cd, Cr e Pb da água (Nasu e Kugimoto, 1981; Sridahar, 1986; Bassi et al., 1990; Jain et al., 1990; Taraldzen e Norberg-King, 1990; Wang,

1990; Maine et al., 2001; Cardwell et al., 2002). Essas espécies, embora apresentem diversas características favoráveis à biorremediação de elementos tóxicos, não estão isentas de sofrerem os danos decorrentes da ação desses poluentes.

Um dos principais efeitos da toxicidade induzida pelo As em plantas é o estresse oxidativo que leva a injúria celular, principalmente por causar a peroxidação de lipídios (Sunkar et al., 2003; Raquel e Tena, 2005). O dano celular se inicia com a peroxidação de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares (Singh et al., 2007). Isso acarreta alteração de permeabilidade e flexibilidade e, ainda, a ruptura das estruturas celulares, conforme observado no sistema de membranas do cloroplasto (Li et al., 2006) e nas demais membranas celulares (Meharg, 1993). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas que atuam nas respostas das plantas a estressores bióticos (Delledonne et al., 2001) e abióticos (Delledonne, 2005; Zago et al., 2006), cuja produção depende de sinais e estímulos endógenos (Liu et al., 2009; Karuppanapandian et al., 2011).

O aumento na produção de EROs, como radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) e seus derivados, na ausência de mecanismos efetivos de proteção, são altamente reativas e causam distúrbios no sistema redox da célula. Há, assim, influência nas principais vias metabólicas, através de alterações diretas nas atividades enzimáticas e nas propriedades de membrana, bem como na estrutura do DNA (Cassels e Curry, 2001; Konieczny et al., 2008). Destaca-se, em nível celular, a perda da integridade da membrana, o que causa efluxo de íons, principalmente de potássio, e alteração das propriedades elásticas da parede celular devido à ação nos mecanismos enzimáticos da biossíntese de componentes da parede (Barceló e Poschenrieder, 1990). Esses danos podem ser avaliados através de quantificação de malonaldeído, produto da peroxidação lipídica, extravasamento de eletrólitos e da análise da ultraestrutura com a utilização da microscopia de varredura, a qual permite o exame e a análise das características microestruturais de amostras biológicas e na qual o grande interesse é obter informações topográficas bem enfocadas com espécimes microscópicos até macroscópicos.

Na manutenção dos níveis normais das EROs atuam mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Apel e Hirt, 2004; Gill e Tujeta., 2010). O

sistema antioxidativo enzimático é constituído principalmente pelas enzimas dismutase de superóxido, catalase, peroxidases como peroxidase de ascorbato e peroxidase da glutatona e redutase de glutatona. E mecanismos não enzimáticos, como a glutatona, o ascorbato e antocianinas (Singh et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio, embora apresentem efeitos tóxicos, podem atuar como sinalizadoras nas respostas celulares (Jaspers e Kangasjarvi, 2010; Moller, 2010, Pinto et al., 2012; Rogers, 2012; Suzuki et al., 2012). O óxido nítrico (NO), por exemplo, em concentrações adequadas, é benéfico ao metabolismo vegetal, com envolvimento nos mecanismos de defesa de plantas a estresses ambientais, sendo como molécula sinalizadora ou como antioxidante. O NO é um radical livre gasoso com meia-vida em sistemas biológicos de, aproximadamente, 3-5 s (Tuteja et al., 2004). Apresenta alta difusibilidade ( $4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{O}$ ) e pode se movimentar facilmente em regiões hidrofílicas na célula e se difundir livremente através da bicamada lipídica das membranas (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007).

O NO, nas plantas, pode ser sintetizado a partir de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) ou a partir de nitrato, pela ação da enzima redutase do nitrato (RN) ou por fontes não enzimáticas (Neill et al., 2003). A atividade da NOS, dependente de arginina, pode ocorrer nos peroxissomos (Corpas et al., 2004), nos cloroplastos (Foissner et al., 2000; Gould et al., 2003) e nas mitocôndrias (Guo e Crawford, 2005).

O NO está envolvido na tolerância das espécies vegetais a diversos tipos de estresses abióticos, como o estresse hídrico (Tian e Lei, 2006), salino (Shi et al., 2007) e por metais pesados (Singh et al., 2008). Essa molécula atua como antioxidante, na eliminação de radicais superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ), e como agente de sinalização, promovendo a elevação da atividade de enzimas antioxidativas, especialmente da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (Kopyra e Gwózd, 2003; Zhao et al., 2008).

A localização do NO nos tecidos vegetais, embora seja difícil (Sthör e Stremlau, 2006), tem sido realizada com a utilização das diaminofluoresceínas (DAFs), que são marcadores utilizados para a detecção do NO em tecidos *in vivo* ou *in situ*, através da emissão de fluorescência (Yao et al., 2004, Kojima et al., 1998). A transformação química do composto 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) está baseada na reatividade de diaminas vicinais aromáticas com o NO, em presença de  $\text{O}_2$ . A N-nitrosilação de DAFs resulta na formação de um

triazol, DAF-2T, que emite fluorescência esverdeada (Kojima et al., 1998) (Fig 1). As DAFs não reagem diretamente com o NO, mas sim com suas formas oxidadas como, por exemplo, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Fernandes et al., 2004, Mur et al., 2011). De modo geral, as DAFs permitem a marcação do NO em amostras biológicas (Nagano, 1999) e sua excitação acontece no comprimento de luz visível, região que causa menor dano celular e evita a autofluorescência das amostras vegetais (Nagano, 1999).

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência do arsênio (As) sobre o estresse oxidativo e na morfologia externa de raízes de *Spirodela intermedia* e o papel do óxido nítrico (NO).

### **2.1 Objetivos específicos**

1. Avaliar o estresse oxidativo causado por diferentes concentrações de As a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).
2. Avaliar a atuação do sistema enzimático e não enzimático na remoção de EROs em diferentes concentrações de As.
3. Avaliar as alterações micromorfológicas causados pelo As nas raízes.
4. Analisar os efeitos do As e de um doador exógeno de NO sobre a atividade da redutase do nitrato.
5. Avaliar a influência do NO sobre a intensidade do estresse oxidativo e sobre o funcionamento dos mecanismos antioxidativos enzimáticos em plantas submetidas ao arsênio.
6. Detectar e localizar a presença de NO nas raízes com uso da microscopia confocal.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**:373-399

**Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J** (2007) Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Sci* **172**: 876-887

**Barceló J, Poschenrieder C** (1990). Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J Plant Nutr* **13**: 1-37

**Bassi M, Grazia-Corradi M, Realini M** (1990) Effect of chromium (VI) in two freshwater plants, *Lemna minor* and *Pistia stratiotes*. 2. Biochemical and physiological observations. *Cytobios* **62**: 101-109

**Bhattacharya P, Welch AH, Stollenwerk KG, McLaughlin MJ, Bundschuh J, Panaullah G** (2007) Arsenic in the environment: biology and chemistry. *Sci Total Environ* **379**: 109-120

**Brooks RR, Robinson BH** (1998) Aquatic phytoremediation by accumulator plants. In Brooks RR, *Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in archaeology, microbiology, mineral exploration, phytomining and phytoremediation*. CAB International, New York, pp 203-226

**Cardwell A, Hawker D, Greenway M** (2002) Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. *Chemosphere* **48**: 653-663

**Cassels AC, Curry RF** (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for macropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tiss Org* **64**:145-157

**Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, Leon AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, Gomez M, Del Rio, LA** (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plant. *Plant Physiol* **136**: 2722-273

**Delledonne M** (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 390-396

**Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 13454-13459

**Fernandes E, Costa D, Toste SA, Lima JLFC, Reis S** (2004) In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Radical Biol Med* **37**: 1895-1905

**Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J** (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J* **23**: 817-82

- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **48**: 909-930
- Gould KS, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D** (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response. *Plant Cell Environ* **26**: 1851-1862
- Guo FQ, Crawford NM** (2005) Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**: 3436-3450
- Jain S, Valsudevan P, Jha N** (1990) *Azolla pinnata* R Br. and *Lemna minor* for removal of lead and cadmium from polluted water. *Water Res* **24**: 177-183
- Jaspers P, Kangasjarvi J** (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plant* **138**:405-413
- Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K, Kim W**(2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aus J Crop Sci* **5**:709-725
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T** (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* **70**: 2446-2454
- Konieczny R, Libik M, Tuleja M, Niewiadomska E, Miszalski Z** (2008) Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. *Acta Physiol Plant* **30**:71-79
- Kopyra M, Gwózd EA** (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol Biochem* **41**: 1011-1017
- Li WX, Chen TB, Huang ZC, Lei M, Liao XY** (2006) Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Chemosphere* **62**: 803-809
- Liu Y, Shi L, Ye N, Liu R, Jia W, Zhang J** (2009) Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in Arabidopsis. *New Phytol* **183**: 1030-1042
- Maine M, Duarte M, Suñé N** (2001) Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water Res* **35**: 2629-2634
- Meharg AA** (1993) The role of plasmalemma in metal tolerance in angiosperms: minireview. *Physiol Plant* **88**: 91-198
- Moller IM** (2010) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Phys* **52**: 561-591
- Mur LAJ, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJM, Prats E** (2011) Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary. *Plant Sci* **181**: 509- 519

- Nagano, T** (1999) Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* **14**: 283-290
- Nasu Y, Kugimoto M** (1981) Duckweed as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. *Arch Environ Cont Toxicol* **10**: 159-169
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT** (2003) Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* **159**:11-35
- Pinto MC, Paradiso A, Leonetti P, De Gara L** (2012) Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant J* **48**: 784-795
- Rahman MA, Hasegawa H** (2011) Aquatic arsenic: Phytoremediation using floating macrophytes. *Chemosphere* **83**:633-646
- Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Okumura C, Rahman MM** (2007) Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.): a good option for phytoremediation. *Chemosphere* **69**: 493-499
- Rai PK** (2009) Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. *Crit Rev Env Sci Technol* **39**: 697-753
- Raquel R, Tena M** (2005) Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry* **66**: 1519-1528
- Robinson B, Kim N, Marchetti M, Moni C, Schroeter L, Dijssel C** (2006) Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Environ Exp Bot* **58**: 206-15
- Robinson BH, Brooks RR, Outred HA, Kirkman JH** (1995) The distribution and fate of arsenic in the Waikato river system, North Island, New Zealand. *Chem Spec Bioavailab* **7**: 89-96
- Rogers HJ** (2012) Is there an important role for reactive oxygen and redox regulation during floral senescence? *Plant Cell Environ* **35**:217-233
- Sharma VK, Sohn M** (2009) Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ Int* **35**: 743-759
- Shi Q, Dinf F, Wang X, Wei M** (2007) Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiol Biochem* **45**: 542-550
- Singh HP, Batish DR, Kaur G, Arora K, Kohli RK** (2008) Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environ Exp Bot* **63**:158-167
- Singh HP, Batish DR, Kohli, RK, Arora K** (2007) Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolusaureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regul* **53**: 65-73

- Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP, Sharma N, Kohli RK** (2009) Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* **20**: 289-297
- Smedley PL, Kinniburgh DG** (2002) A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Appl Geochem*, **17**: 517-68
- Sridahar M** (1986) Trace element composition of *Pistia stratiotes* in a polluted lake in Nigeria. *Hydrobiologia* **131**: 273-276
- Sthör C, Stremlau S** (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp Bot* **57**: 463-470
- Sunkar R, Bartels D, Kirch HH** (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J* **35**: 452-464
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G** (2012) ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ* **35**:259-270
- Taraldzen J, Norberg-King T** (1990) New method for determining effluent toxicity using duckweed (*Lemna minor*). *Environ Toxicol Chem* **9**: 761-767
- Tian X, Lei Y** (2006) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biol Plant* **50**: 775–778.
- Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK** (2004) Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *J Biomed Biotechnol* **4**: 227-237
- Wang S, Mulligan CN** (2006) Occurrence of arsenic contamination in Canada: sources, behavior and distribution. *Sci Total Environ* **366**: 701-721
- Wang W** (1990) Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ Res* **52**: 7-22
- Yao D, Vlessidis AG, Evmiridis NP** (2004) Determination of nitric oxide in biological samples. *Microchim Acta* **147**: 1-20
- Zago E, Morsa S, Dat JF, Alard P, Ferrarini A, Inzé D, Delledonne M, Breusegem F** (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide- responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol* **141**: 404-411
- Zhao L, He J, Wang X, Zhang L** (2008) Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *J Plant Physiol* **165**: 182-191

## CAPITULO I

### **SISTEMA DE DEFESA CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO ARSÊNIO EM PLANTAS DE *Spirodela intermedia* W. KOCH (LEMNACEAE)**

## Sistema de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelo arsênio em plantas de *Spirodela intermedia* W. Koch (Lemnaceae)

### RESUMO

Plantas de *Spirodela intermedia* (Lemnaceae) foram submetidas a doses crescentes de arsênio (As), a fim de avaliar o estresse oxidativo, o sistema antioxidante e a morfologia externa da raiz. As plantas foram tratadas com 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As adicionado à solução nutritiva, durante um período de 24 horas. Determinou-se a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>, MDA e antocianina, além da atividade da catalase (CAT), dismutase do superóxido (SOD), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPX). A micromorfologia do ápice radicular foi avaliada em microscopia eletrônica de varredura, também foi avaliada. O aumento da concentração de As na solução foi acompanhada pelo aumento na atividade de enzimas antioxidantes, anion superóxido e no teor de antocianinas. No entanto, uma diminuição na atividade da CAT e na quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentrações acima de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As foi observada. Por conseguinte, a tolerância de *S. intermedia* pode estar relacionada com a elevada atividade das enzimas antioxidantes, POX, APX, GPX e SOD, que se intensificaram com o aumento da dose de As aplicado. Com o aumento da atividade destas enzimas houve queda significativa no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, os níveis de <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> aumentaram com o aumento da dose de arsênio, demonstrando que a alta atividade da SOD não foi suficiente para remover o <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>. A CAT parece não desempenhar papel crucial na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez que sua atividade decresceu com o aumento da dose de As. O excesso de EROs, especialmente <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que não foi totalmente eliminado pelo sistema antioxidativo pode ter causado danos de membrana, levando a mudanças estruturais na coifa quando exposta ao As.

Palavras-chave: enzimas antioxidantes, espécies reativas de oxigênio, metabolismo antioxidante, micromorfologia da raiz.

## 1. INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um metaloide altamente tóxico que existe na natureza numa variedade de formas químicas, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas, como resultado de sua participação em complexos biológicos, processos químicos e algumas aplicações industriais (Stockwell et al 1994; Stummeyer et al 1996). As formas inorgânicas, arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), presente em águas superficiais, e o arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), presente em águas subterrâneas, são consideradas as mais tóxicas e disponíveis para as plantas (Tripathi et al., 2007; Mishra et al., 2010). Por ser um análogo ao fosfato, a principal via de absorção do  $\text{As}^{\text{V}}$  em plantas é através dos transportadores de fosfato. Como os elementos são quimicamente semelhantes, provavelmente, parte da toxicidade imposta ocorre pela substituição do fosfato pelo  $\text{As}^{\text{V}}$ , levando a danos ao ATP, principal fonte de energia das células. (Zhao et al., 2009; Wang et al., 2010). Já o  $\text{As}^{\text{III}}$  entra através de aquoponinas na forma de  $\text{As}(\text{OH})_3$ . (Zhao et al. 2010).

Há estudos que relacionam o As com o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais ocasionam o estresse oxidativo, como radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ). Como o processo de oxidação de  $\text{As}^{\text{V}}$  ocorre rapidamente, entende-se que parte dos efeitos tóxicos do As está relacionado ao seu produto de oxidação, o  $\text{As}^{\text{III}}$  (Zhao et al., 2010). Além disso, mesmo que arsenato possa substituir o fosfato em diversos processos metabólicos, ele não é capaz de desempenhar suas funções (Shri et al., 2009). É o que ocorre, por exemplo, na fosforilação oxidativa, em que o arsenato desloca o fosfato na síntese de ATP, diminuindo a produção de energia na planta (Terwelle e Slater, 1967, Ullrich-Eberius et al., 1989). Devido a essa interferência nas reações de transferência de energia o As parece estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Khan et al., 2009, Singh et al., 2009).

O estresse oxidativo resultante do acúmulo de EROs pode levar a alterações na planta, como danos a lipídeos de membranas (Khan et al., 2009), mudanças nos teores de pigmentos (Ozturk et al., 2010), modificações nas atividades de enzimas antioxidantes e nos teores de antioxidantes não-enzimáticos (Mishra et al., 2008, Shri et al., 2009).

O estresse oxidativo decorre do aumento na geração de EROs, resultando em danos celulares e mesmo na morte celular. Estes danos podem ser evitados ou minimizados pela atuação de mecanismos antioxidativos enzimáticos, como as enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidases (POX), catalases (CAT) e peroxidases do ascorbato (APX), e mecanismos não enzimáticos, como a glutatona, o ascorbato e antocianinas (Singh et al., 2009).

A SOD age como uma primeira defesa contra EROs, dismutando o superóxido para  $H_2O_2$ . Já as enzimas APX, GPX e CAT, subsequentemente, detoxificam  $H_2O_2$ . O balanço das atividades de SOD, APX, POX, CAT e GR é crucial para a supressão dos níveis tóxicos de EROs nas células. Mudanças no balanço das enzimas detoxificadoras de EROs induzem mecanismos compensatórios. Por exemplo, quando a atividade da catalase é reduzida em plantas e as enzimas protetoras como APX e GPX são expressas em maiores quantidades, em efeito compensatório (Apel e Hirt, 2004).

Outros antioxidantes não enzimáticos de grande importância são os compostos fenólicos. Dentre eles, mais de 6000 diferentes flavonóides (Marchand, 2002; Yang et al., 2001), sendo suas maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas, diidroflavonóis chalconas e antocianinas (Cook, Samman, 1996). Os flavonóides agindo como antioxidantes podem consumir EROs e, ainda, quelar íons metálicos que seriam capazes de participar da reação de Fenton (Valko et al., 2006). Nesse grupo, estão presentes as antocianinas, que têm a sua síntese aumentada em situações de toxidez e metais pesados, como por exemplo, o As (Guimarães, 2006).

Além do estudo do sistema antioxidativos em plantas, estudos estruturais e ultra-estruturais podem ser úteis na avaliação de danos causados por poluentes em plantas, uma vez que é possível a identificação de alterações estruturais antes mesmo de se detectar retardamento nas taxas de crescimento em plantas de áreas contaminadas (Päivöke, 1983a).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou analisar o efeito do As sobre o estresse oxidativo em plantas e como o mesmo altera a ultraestrutura de raízes de *Spirodela intermedia*.



## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção, aclimação e exposição das plantas ao arsenato**

Plantas aquáticas de *Spirodela intermedia* W. Koch (Lemnaceae), obtidas no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa, foram coletadas e deixadas 24 h em água potável, a fim de remover possíveis impurezas. Após esse período, foram aclimatadas por 3 dias em recipientes de polietileno, contendo 6 L de solução nutritiva de Clark (1975), meia força iônica, pH 6,5, em sala de crescimento, com temperatura e luminosidade controladas ( $25 \pm 2$  °C,  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e fotoperíodo de 16 horas.

Após o período de aclimação, amostras de, aproximadamente, 3 g de plantas, receberam os seguintes tratamentos: solução nutritiva com arsênio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ , sendo que o controle recebeu apenas solução nutritiva. Vinte e quatro horas depois, as plantas foram coletadas e lavadas por 30 s em água destilada corrente e armazenadas a  $-80$  °C para as análises subsequentes.

### **2.2 Determinação da concentração de arsênio**

Amostras de 0,1 g de material seco das plantas foram digeridas com mistura nitro-perclórica (2:1), em bloco digestor, com temperatura controlada ( $100\text{-}120^\circ\text{C}$ ) até a completa oxidação do material vegetal (Marin et al., 1993). O extrato mineral obtido foi diluído para 10 mL com água desionizada e, então, a concentração de As foi determinada por espectrofotometria de emissão em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES Perkin Elmer, OPTIMA 8300, EUA).

### **2.3 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio**

Amostras de 0,3 g de plantas, trituradas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, seguido de centrifugação a  $10.000 \text{ xg}$ , por 15 min,  $4^\circ\text{C}$  (Kuo e Kao, 2003).

Alíquotas de 30 µL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000), homogeneizadas e mantidas no escuro por 30 min. Seguiu-se a determinação da absorvância a 560 nm e a quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> realizada com base em curva de calibração, utilizando concentrações padronizadas de peróxido de hidrogênio. As interferências decorrentes dos reagentes e do extrato vegetal foram subtraídas das análises das amostras.

#### **2.4 Determinação da concentração de ânion superóxido**

Amostras de 0,05 g da planta inteira foram cortadas em pequenos segmentos e incubadas em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na<sub>2</sub>EDTA) 100 µM, β-nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20 µM e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001), em tubos hermeticamente fechados. A reação foi iniciada pela introdução de 100 µL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, utilizando-se seringa cromatográfica, seguida de incubação a 28°C com agitação constante por 5 min. Os fragmentos foram removidos e, a partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura da absorvância a 480 nm, durante 5 min. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem material vegetal. A produção de ânion superóxido foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Boveris, 1984).

#### **2.5 Determinação da peroxidação de lipídios**

Amostras de 0,160 g de plantas foram homogeneizadas com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) e centrifugadas a 12.000 xg a 4° C por 15 min. Alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) em TCA 20 %. A mistura foi incubada em banho de aquecimento a 98° C por 30 min, e a reação foi interrompida em banho de gelo por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg durante 10 min, e a absorvância determinada a 532 nm. A turbidez inespecífica

foi corrigida através da subtração da absorbância da mesma em 600 nm. Utilizou-se o coeficiente de extinção  $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para quantificar a concentração dos peróxidos de lipídios, sendo os resultados expressos em  $\text{nmol MDA g}^{-1}$  de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

## **2.6 Avaliação do efeito do arsênio sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidativo das plantas**

### **2.6.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos**

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações da atividade da catalase (CAT), da peroxidase (POX), da peroxidase do ascorbato (APX), da superóxido dismutase (SOD), da peroxidase da glutatona (GPX) e da redutase da glutatona (GR), foram obtidas pela maceração de 0,3 g de plantas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de homogeneização, seguido de centrifugação a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C. Os meios de homogeneização foram: 1) Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto et al., 1999), para as enzimas CAT, POX e SOD. 2) Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ascorbato 1 mM e EDTA 1 mM (Nakano e Asada, 1981), para a APX. 3) Tampão Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM e  $\text{MgCl}_2$  10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001), para a GPX. 4) Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1 %, para a GR (Carlberg e Mannervik, 1985).

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

Determinou-se a atividade da SOD pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$ , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2  $\mu\text{M}$  (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com

papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi determinada pela medição da absorvância a 560 nm. A medição da absorvância, nesse mesmo comprimento de onda, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual tempo, serviu de branco e foi subtraída da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade da SOD foi expressa em  $U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

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

Determinou-se a atividade da catalase pela adição de 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,8 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM (Havir e McHale, 1987). Durante o primeiro minuto de reação, mantida a  $25^\circ\text{C}$ , mediu-se o decréscimo na absorvância a 240 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson et al., 1995) e expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

### **2.6.4 Determinação da atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)**

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,8 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogallol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM (Kar e Mishra, 1976). O incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a  $25^\circ\text{C}$  determinou a produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Chance e Maehley, 1955) e expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

]

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

A atividade da APX foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de ascorbato 0,8 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,0 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0. Observou-se o decréscimo na absorvância a 290 nm, à 25°C, durante o primeiro minuto de reação (Nakano e Asada, 1981; Koshiba, 1993). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Nakano e Asada, 1981) e expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína.

### **2.6.6 Determinação da atividade da redutase da glutathiona (GR, EC 1.6.4.2)**

A atividade da redutase da glutathiona foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático bruto de plantas a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, glutathiona oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM (em tampão TRIS-HCl 0,5 mM, pH 7,5), segundo Carlberg e Mannervik (1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30°C, foi medido no primeiro minuto. Calculou-se a atividade enzimática através do coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Foyer e Halliwell, 1976) e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  proteína.

### **2.6.7 Determinação da atividade da peroxidase da glutathiona (GPX, EC 1.11.1.9)**

A atividade da peroxidase da glutathiona foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto das plantas diluído a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,114 M, glutathiona reduzida (GSH) 1 mM, NADPH 0,2 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutathiona (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30°C, foi medido no primeiro minuto de reação. Calculou-se a atividade enzimática através do coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Anderson e Davis, 2004) e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína.

## **2.6.8 Determinação de proteínas**

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (Bradford et al., 1976), utilizando albumina bovina (BSA) para realizar a curva padrão.

## **2.7 Extração e determinação das concentrações de antocianinas**

Amostras de 1 g de massa fresca de plantas foram maceradas com 15 mL de metanol acidificado com HCl (pH 3,0) (Kamperidou e Vasilakakis, 2006), deixadas em geladeira por 14 horas, filtradas e o conteúdo de antocianinas estimado como concentração de perlagonidina 3-glicosídeo a 510 nm, usando um coeficiente de extinção molar de  $3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e expresso em  $\mu\text{g}$  de antocianina  $\text{g}^{-1}$  de massa fresca (Cordenunsi et al., 2002).

## **2.8 Análise da micromorfologia dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Amostras radiculares de 2 cm de *S. intermedia*, após o tratamento com  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de As, e tendo solução nutritiva como controle, foram uniformemente selecionadas, lavadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2, e incubadas por 2 h em glutaraldeído 2,5% (em tampão fosfato de potássio 0,1M). Após esse período, as raízes foram novamente lavadas em tampão por 10 min e submetidas a uma série de desidratação em álcool nas concentrações de 30%, 50%, 70% e (3x) 100%, sendo que as raízes permaneceram por 10 minutos em cada solução. Com o fim da desidratação, as raízes foram levadas ao ponto crítico (BAL-Tec, CPD 030, BR), montadas em *stubs* e posteriormente metalizadas em ouro (Balzers, FDU 010, BR), seguidas de análise e registro de imagens obtidas em microscópio eletrônico de Varredura (LEO, 1430VP, Reino Unido).

## 2.9 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo 5 tratamentos e 5 repetições, sendo que cada unidade experimental consistiu de 3 gramas de planta por vaso. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância para todos os experimentos. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Genes (Cruz, C.D., 2006).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Concentração de arsênio em *S. intermedia*

Os teores de As encontrado nas plantas de *S. intermedia* aumentaram com o incremento da concentração deste elemento em solução. (Tabela 1). Observou-se que a absorção de As não atingiu a saturação, sendo que o valor obtido na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As foi, aproximadamente, o dobro daquele observado na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

**TABELA 1:** Teores de As em *Spirodela intermedia* após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Teor de As (µg g <sup>-1</sup> MF)
0,0	0,00± 1.28 e*
0,5	458,60 ± 25,58 d
1,0	641,00 ± 24,53 c
1,5	739,00 ± 15,47 b
2,0	892,80 ± 40,36 a

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média ± desvio padrão.

### 3.2 Concentração de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e MDA

A exposição das plantas aos tratamentos contendo arsênio (As) aumentou a concentração de peróxido nas plantas de forma gradativa até a concentração 1 mg L<sup>-1</sup> de As, iniciando no controle com valores próximos a 143 nmol de peróxido g<sup>-1</sup> MF até uma concentração próxima a 158 nmol de peróxido g<sup>-1</sup> MF na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> As. A partir da concentração de

1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, observamos uma queda nas concentrações de peróxido, chegando a valores menores do que os valores encontrados no controle. Houve queda de 5% nos tratamentos 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As em relação ao controle (Tabela 2).

Para o ânion superóxido, nota-se que no tratamento de concentração 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As houve um aumento de 125% nos níveis do ânion em relação ao controle chegando até 224% no tratamento de 2 mg L<sup>-1</sup>. Porém nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As não houve diferença significativa em relação ao controle (Tabela 2).

O grau de peroxidação lipídica, avaliado pela concentração de MDA, aumentou com o incremento de As na solução nutritiva (Tabela 2). Em todas as concentrações de As utilizadas verificou-se que os teores de MDA variaram significativamente entre os tratamentos, com evidência de danos crescentes na estrutura de membranas.

**TABELA 2:** Teores de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ânion superóxido (•O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e peroxidação lipídica (MDA-TBA) em plantas de *Spirodela intermedia*, após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de As.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Teores H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)	Teores de •O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)	Teores de MDA (nmol g <sup>-1</sup> MF)
0,0	142.70 ± 4,54 bc	105, 06 ± 22,88c	1,84 ± 0,26 d*
0,5	150.02 ± 4,83ab	108.84 ± 22,17c	1,85 ± 0,19 d
1,0	157.96 ± 2,71a	95.49 ± 4,20c	3,33 ± 0,07 c
1,5	135.04 ± 3,25cd	236.58 ± 22,52b	7,29 ± 0,10 b
2,0	131.12 ± 0,97d	340.98 ± 25,34a	9.63 ± 0,21 a

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média ± desvio padrão.

### 3.3 Efeito do arsênio sobre o sistema antioxidativo enzimático

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) nas plantas expostas as menores concentrações de As também iniciou constante nos primeiros tratamentos, porém no tratamento de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, houve aumento de 124%, ultrapassando os 223% na atividade enzimática em relação ao controle (Tabela 3).

A exposição das plantas ao As em concentrações mais baixas não promoveu diferença significativa na atividade da catalase (CAT). Permanecendo valores muito semelhantes ao controle até a concentração de



0,5 mg L<sup>-1</sup> de As. Entretanto, nas concentrações de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As até 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As, houve uma queda abrupta da atividade enzimática, chegando a valores até 67% na atividade em relação ao controle (Tabela 3).

Percebe-se, no entanto, um comportamento inverso ao analisarmos a atividade da enzima peroxidase (POX), em que a atividade enzimática permaneceu muito semelhante ao controle até o tratamento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As e a partir da concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de As, houve um aumento de 48%, ultrapassando os 153% no tratamento 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As em relação ao controle (Tabela 3).

**TABELA 3:** Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) em plantas de *Spirodela intermedia* após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de As.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	SOD (U de SOD min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína)	CAT (μmol de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína)	POX (μmol de purporogalina min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína)
0,0	16,40 ± 1,14 b	302,04 ± 20,36 a	59,92 ± 4,54 c*
0,5	14,85 ± 0,88 bc	311,13 ± 9,83 a	53,67 ± 4,83 c
1,0	13,67 ± 1,14 c	252,98 ± 13,63 b	54,13 ± 2,71 c
1,5	22,72 ± 0,71 a	98,12 ± 20,64 c	86,28 ± 3,32 b
2,0	21,41 ± 0,53 a	119,57 ± 17,89 c	132,38 ± 0,97 a

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média ± desvio padrão.

As enzimas peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutathione (GPX) e redutase da glutathione (GR) também mantiveram um comportamento semelhante à SOD e à POX. Com os tratamentos iniciais de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de As e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de As apresentando atividades muito semelhantes ao controle e os tratamentos de 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de As com aumento substancial nos valores. A APX que iniciou sua atividade com aproximadamente 1,5 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína, apresentou acréscimo para 2,7 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína no tratamento de maior concentração, resultando em aumento de 80% na atividade enzimática. A GPX começou em valores próximos a 1,5 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína no controle e no tratamento de mais alta concentração chegou a 3,2 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína, um aumento de 113% na atividade dessa enzima. Seguindo a mesma tendência, verificou-se que a atividade da GR teve aumento mais expressivo do que aquele obtido no controle (Tabela 4).

**TABELA 4:** Atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutatona (GPX) e redutase da glutatona (GR) em plantas de *Spirodela intermedia* após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de As.

Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	APX (μmol de ácido ascórbico min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> de proteína)	GPX (μmol de glutatona reduzida min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> de proteína)	GR (μmol de glutatona oxidada min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> de proteína)
0,0	1,49 ± 0,13 c	1,46 ± 0,05 d	0,45 ± 0,07 d*
0,5	1,47 ± 0,07 c	1,54 ± 0,17 cd	0,42 ± 0,06 d
1,0	1,65 ± 0,14 c	1,79 ± 0,11 c	0,89 ± 0,05 c
1,5	2,38 ± 0,08 b	2,63 ± 0,19 b	1,19 ± 0,11 b
2,0	2,73 ± 0,15 c	3,20 ± 0,18 a	1,58 ± 0,10 a

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média ± desvio padrão.

### 3.4 Concentração de antocianinas

Pela tabela 5, observa-se que o teor de antocianina cresceu de acordo com as maiores concentrações de As. No controle foi encontrado o valor de 31 μg de antocianina g MF<sup>-1</sup>, alcançando o valor de 70 μg de antocianina g<sup>1</sup> MF<sup>-1</sup>, representando um aumento de 225% na concentração de antocianinas.

**TABELA 5:** Concentração de antocianinas em *Spirodela intermedia*, em função de diferentes concentrações de As.

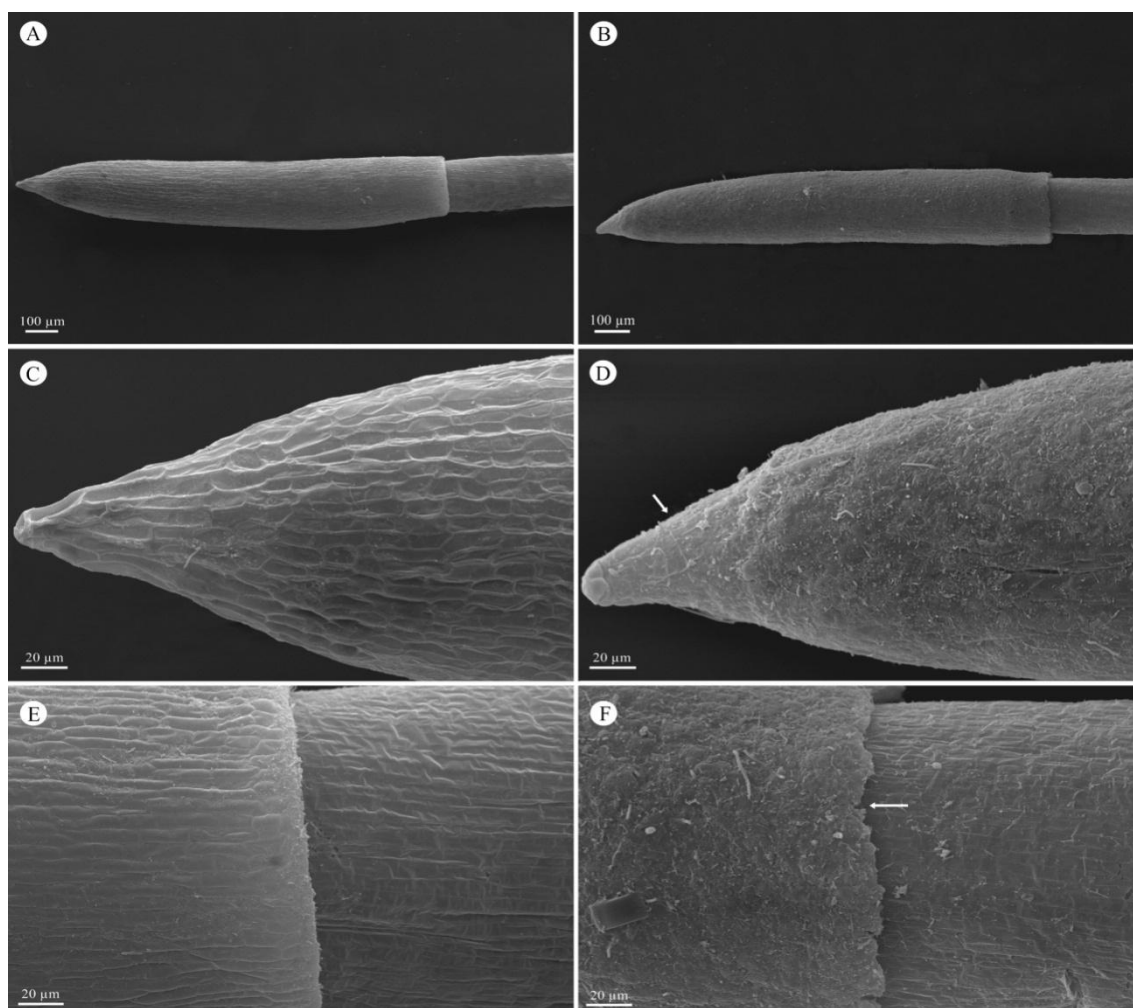
Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Teor de antocianinas (μg MF <sup>-1</sup> )
0	31,05 ± 1,38 d*
0,5	34,04 ± 1,52 d
1,0	41,88 ± 0,90 c
1,5	63,07 ± 0,96 b
2,0	70,01 ± 2,75 a

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média ± desvio padrão.

### 3.5 Micromorfologia dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A observação dos ápices radiculares em microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou que o tratamento com As na maior concentração (2,0 mg L<sup>-1</sup>) causou diversos tipos de danos nas coifas de *S. intermedia*. (Fig. 1). Estes danos caracterizaram-se pela intensa desorganização do tecido radicular (Fig. 1D)

comparadas as do tratamento controle (Fig. 1C), pelo surgimento de células em colapso no início da coifa (seta, Fig. 1D) e pelas rupturas caracterizadas pelo “rasgamento” na extremidade final da coifa (seta, Fig 1F).



**Figura 1:** Ápice radicular de *Spirodela intermedia* expostas ou não a 2 mg L<sup>-1</sup> As durante 24 horas. Tratamento controle (A, C e E); Expostas ao tratamento (B, D e F). Setas indicam colapso das células e ruptura do tecido da coifa.

#### 4. DISCUSSÃO

Diferentes espécies vegetais têm apresentado padrões divergentes de acúmulo de As quando expostas a este metalóide, contudo, de forma geral, ocorre aumento na absorção de As com a elevação da concentração desse elemento em solução (Baldwin et al., 2009). O padrão de elevação dos teores de As apresentado por estas espécies revela que, possivelmente, as concentrações utilizadas não foram suficientemente grandes para promover a saturação dos mecanismos de absorção e acúmulo desse elemento.

A exposição de *S. intermedia* a concentrações crescentes de As desencadeou a ocorrência de estresse oxidativo, o que foi evidenciado pelo aumento na concentração de EROs e na peroxidação lipídica. Em vegetais, a geração de EROs desencadeada pelo As geralmente é consequência da conversão do arsenato em arsenito, reação que faz parte do mecanismo de tolerância das plantas a este poluente (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). O As pode ainda reduzir diretamente o oxigênio molecular ou alterar proteínas das mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, levando a desequilíbrios no potencial redox celular e à formação de EROs (Zhang e Quiu, 2007).

No presente estudo, a adição de As em solução nutritivas com plantas de *S. intermedia* resultou no incremento na atividade enzimática da SOD, POX, APX, GPX e GR, indicando uma manifestação inicial de defesa antioxidante (Marquezcargarcia e Cordoba, 2010). Entretanto, houve uma queda na atividade da CAT, o que pode ser explicado pela funcionalidade da enzima na planta.

O radical ânion superóxido e os seus derivados, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, são os principais causadores de danos oxidativos aos componentes celulares (Mittler, 2002). Os radicais superóxidos transformam-se espontaneamente em  $H_2O_2$ , porém a reação é mais efetiva se for catalisada pelas SODs. Entretanto, a participação conjunta de outras enzimas capazes de degradar o  $H_2O_2$  é de fundamental importância, a fim de manter normal a quantidade de EROs nas células (Valko et al., 2006). Dessa forma, a ação das dismutases do superóxido constitui-se na primeira linha de defesa das plantas contra o estresse oxidativo, o que reforça a ideia de que a maior atividade dessas enzimas é importante característica de tolerância (Apel e Hirt, 2004).

O aumento na atividade de SOD com elevação da concentração de As no meio foi observado em *Pteris vittata* (Cao et al., 2004), em *Holcus lanatus* (Hartley-Whitaker et al., 2001), em *Lycopersicon esculentum* e em *Zea mays* (Miteva e Peycheva, 1999). Assim como nestas espécies, no presente trabalho, observa-se aumento na atividade de SOD após exposição a crescentes concentrações de As. Plantas submetidas a outros agentes tóxicos têm apresentado atividade de SOD análogas às desse estudo. *Hordeum vulgare* teve aumentos na atividade de SOD com a elevação da concentração de cádmio no meio (Tiryakioglu et al., 2006), enquanto que *Ceratophyllum demersum* exibiu aumento da atividade quando exposta a elevadas concentrações de chumbo (Mishra et al., 2006).

O acréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio pode ser um indicativo da atuação da SOD. Entretanto, esse aumento pode ter ocorrido de forma independente do ânion superóxido, pela conversão de arsenato em arsenito, podendo resultar em danos a ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Mascher et al., 2002). Estas elevações nos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após exposição ao As indicam a ocorrência de desbalanço oxidativo em ambas as espécies.

Atuando sobre o peróxido produzido pela SOD e por processos oxidativo na célula, temos a catalase (CAT) e a peroxidase (POX). Essas enzimas antioxidantes são produzidas por plantas sob condições de estresse oxidativo na presença de metais pesados (Sairam et al., 1998). Cao et al. (2004), trabalhando com *Pteris vittata* submetida a cinco diferentes concentrações de As, obtiveram resultados semelhantes aos observados neste estudo, com queda da atividade da catalase em concentrações mais altas. Vários fatores podem afetar a atividade desta enzima, como o agente tóxico estressante, sua concentração, o tempo de exposição e a espécie vegetal, o que, de certa forma, pode fazer com que a atividade dessa enzima seja submetida a grandes variações (Pereira et al., 2010).

Além disso, os EROs formados durante o estresse oxidativo causado por metais pesados parecem inibir diretamente a síntese de enzimas antioxidativas (Pawlik-Skowronska et al., 2004). Tais observações ficam evidentes em diversos trabalhos, como o de Mishra et al. (2006), aonde foi observado queda da atividade da CAT quando *Ceratophyllum demersum* foi exposta ao Pb. E no trabalho de Schneider et al. (2011), em que houve uma intensa queda na atividade da catalase em concentrações altas de As em plantas micorrizadas. Entretanto, contrariamente, Tiryakioglu et al. (2006) não observaram variações na atividade de CAT ao expor *Hordeum vulgare* a diferentes concentrações de cádmio.

Como em *S. intermedia*, aumento na atividade da POX tem sido observado por diferentes espécies quando expostas ao As (Mascher et al., 2002; Miteva et al., 2005). Segundo Mittler (2002), a CAT e a POX degradam o peróxido de hidrogênio, mas as afinidades dessas enzimas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são de ordens diferentes. Como as POX apresentam maior afinidade pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugere-se que elas sejam responsáveis pela modulação fina, e, portanto, envolvidas na sinalização, enquanto a CAT atua na remoção do excesso de EROs durante o estresse.

Igualmente à atividade da POX a peroxidase do ascorbato (APX) aumentou em resposta ao aumento das EROS. As APX agem contra os intermediários reativos de oxigênio, degradando o  $H_2O_2$ , mas, diferentemente de outras enzimas, a APX requer ascorbato e depende de um sistema de regeneração de glutathione reduzida, o ciclo ascorbato-glutathione (Noctor e Foyer, 1998). Dada a importância dessa enzima na defesa antioxidante das plantas, o aumento de sua atividade tem sido apresentado por várias espécies quando expostas a diferentes agentes tóxicos (Mishra et al., 2006; Moller et al., 2007).

A peroxidase da glutathione (GPX) é, também, considerada importante componente do sistema enzimático antioxidativo, convertendo  $H_2O_2$  em  $H_2O$ , pela utilização de glutathione reduzida (GSH), produzida pela redutase da glutathione (GR). Como esta enzima faz parte do ciclo ascorbato-glutathione (Noctor e Foyer, 1998) o aumento de sua atividade é proporcional a atividade da GR, como visto nesse trabalho.

A atuação conjunta das enzimas CAT, POX, APX e GPX foi capaz de remover o excesso de  $H_2O_2$  produzido em razão da indução promovida pelas concentrações mais altas de As. Nesses casos, os valores de concentração de  $H_2O_2$  foram reduzidos, o que não evitou completamente a ação tóxica do As, possivelmente devido à ação de outros componentes gerados durante a exposição das plantas a esse metalóide, como o ânion superóxido.

A atividade da redutase da glutathione (GR) é importante componente do mecanismo antioxidante, pois participa do ciclo ascorbato-glutathione, regenerando glutathione reduzida (GSH), utilizando o NADPH como agente redutor. Sua participação nesse ciclo é imprescindível para a manutenção da homeostase celular durante o estresse causado por EROs (Noctor e Foyer, 1998). Além disso, esta enzima catalisa a regeneração da GSH a partir da glutathione oxidada (GSSG). Essa é produzida pela transformação do desidroascorbato (DHA) a ascorbato (AA), mediante catálise da redutase do desidroascorbato, contribuindo para a manutenção homeostática dos EROs no interior das células (Noctor e Foyer, 1998; Aravind e Prasad, 2005). A GSH, por sua vez, uma vez formada, serve de substrato para GPX que atua na decomposição do excesso de  $H_2O_2$  produzido pelo estresse (Drazkiewicz et al., 2003). Assim, como as outras enzimas antioxidantes, a GR teve sua atividade aumentada neste trabalho nas plantas expostas a altas doses de As, sugerindo

que esta enzima também pode apresentar susceptibilidade aos efeitos tóxicos de As principalmente em maiores concentrações desse metalóide.

Outra linha de defesa das plantas contra o estresse oxidativo, além das enzimas antioxidativas é a biossíntese e o acúmulo de compostos fenólicos os quais são uma das respostas de plantas aos diferentes estresses bióticos e abióticos (Juszczuk et al., 2004). Os maiores teores de antocianinas observados em concentrações elevadas de As podem estar relacionados com sua participação como agentes antioxidantes, protegendo as células contra os radicais livres produzidos por diversas vias metabólicas, conforme sugerido por Rice-Evans et al. (1997). As antocianinas, grupo mais comum de flavonóides, são metabólitos secundários que podem ser produzidos em resposta a deficiência de fosfato (Marschner, 1995). Como o arsenato é análogo ao fosfato, ocorre competição pelos mesmos sítios de absorção (Tu et al., 2004; Mkandawire et al., 2005), o que poderia induzir a síntese de antocianinas, demonstrando um efeito indireto da absorção de As.

O conteúdo de MDA, produto final da peroxidação de lipídeos, tem sido avaliado como uma medida do grau de estresse oxidativo que é causado principalmente pelas espécies reativas de oxigênio (Mishra et al., 2008). Embora tenha ocorrido redução nos teores de  $H_2O_2$  em *S. intermedia* quando submetida a concentrações mais elevadas de As, este queda não correspondeu decréscimo nos teores de MDA, sugerindo que o dano oxidativo foi intenso e o sistema antioxidante não conseguiu reverter os danos de membrana pela remoção de EROs. Além disso, houve aumento da concentração de ânion radical superóxido, que pode ter contribuído de forma significativa para esses danos em membrana. Resultados semelhantes foram encontrados por Khan et al. (2009) que também encontrou aumentos nos teores de EROs sem correlação com aumentos nos teores de MDA em baixas doses de As.

Como o As é absorvido na forma de arsenato, sua similaridade química com o macronutriente fosfato, essencial no metabolismo dos vegetais, favorece sua absorção em quantidades relativamente elevadas do poluente. Essa absorção é realizada através de transportadores de fosfato existentes na raiz, por competição entre os dois elementos e pela substituição do fosfato pelo arsenato (Kabata-Pendias e Pendias, 2001; Sharples et al., 2000). Como resultado, o arsenato pode substituir o fosfato em processos bioquímicos e/ou

promover a diminuição da concentração de fosfato no meio intracelular, levando à redução de processos metabólicos vitais, como a fosforilação oxidativa na mitocôndria. Estes processos promovem uma queda na produção de poder redutor (NADPH) e de adenosina trifosfato (ATP), reduzindo a disponibilidade de energia para a raiz (Meharg & Macnair, 1994).

Essa falta de energia pode ter sido a causa da morte celular e conseqüentemente das alterações estruturais verificadas nas raízes de *S. intermedia*. Associado a esse fato, temos a ação direta do As, que é o grande responsável por danos estruturais em macromoléculas, conforme relatos da literatura em espécies vegetais expostas a concentrações tóxicas de As (Hartley-Whitaker et al., 2001; Mascher et al., 2002; Nascimento, 2007; Singh et al., 2007).

Além disso, a intensa descamação e colapso das células da coifa em *S. intermedia* podem ser atribuídos às EROs, que quando em excesso, danificam diversas estruturas celulares. Singh et al. (2007) atribuíram a redução nas taxas de crescimento radicular e os danos na estrutura anatômica à ocorrência de estresse oxidativo, resultando em danos às células.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399

**Aravind P, Prasad MNV** (2005) Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiol Biochem* **43**: 107-116

**Cao X, Ma LQ, Tu C** (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environ Pollut* **128**: 317-325

**Cook NC, Samman S** (1996) Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources - review. *J Nutr Biochem* **7**: 66-76

**Dong J, Wu F, Zhang G** (2006) Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* **64**: 1659-1666

**Drazkiewicz M, Skorznska-Polit E, Krupa Z** (2003) Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Sci* **164**: 195-202

**Guimarães FP** (2006) Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução. Master thesis. Universidade Federal Viçosa, Viçosa, MG.

**Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Bookum WT, Schat H, Meharg AA** (2001) Phytochelatin are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol* **126**: 299-306

**Israr M, Sahi S, Datta R, Sarkar D** (2006) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* **65**: 591-598

**Juszczuk IM, Wiktorowska A, Malusá E, Rychter AM** (2004) Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* **267**: 41-49

**Kabata-Pendias A, Pendias H** (2001) Trace elements in soils and plants. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press. 413p

**Khan I, Ahmad A, Iqbal M** (2009) Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicol Environ* **72**: 626-634

**Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M** (2009) Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ Chem Lett* **7**: 1-19

**Marchand LL** (2002) Cancer preventive effects of flavonoides - a review. *Biomed Pharmacother* **56**: 296-301

**Márquez-García B, Córdoba F** (2010) Antioxidative system in wild populations of *Erica andevalensis*. *Environ Exp Bot* **68**: 58-65

**Marschner H** (1995) Functions of mineral nutrients: macronutrients. In Marschner H, Mineral nutrition of higher plants, Ed 2. Academic Press, London, pp 229-299

**Mascher R, Lippmann B, Holzinger S, Bergmann H** (2002) Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci* **163**: 961-969

**Meharg AA, Hartley-Whitaker J** (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol* **154**: 29-43

**Meharg AA, Macnair MR** (1994) Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv. that differ in their tolerance of arsenate. *Plant and Soil* **162**: 99-106.

**Mishra S, Jha AB, Dubey RS** (2010) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma* **248**: 565- 577

**Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Trivedi PK** (2008) Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L.. *Aquat Toxicol* **86**: 205-215

**Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindaraian R, Kuriakose SV, Prasad MN** (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol Biochem* **44**: 25-37

**Mishra S, Svivastava S, Tripathi RD, Kumar R, Seth CS, Gupta DK** (2006) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* **65**: 1027-1039

**Mishra VK, Upadhyay AR, Pandey SK, Tripathi BD** (2008) Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Plant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent. *Environ Monit Assess* **141**: 49-58

**Miteva E, Hristova D, Nenova V, Maneva S** (2005) Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. *Sci Hortic* **105**: 343-358

**Miteva E, Peycheva S** (1999) Arsenic accumulation and effect on peroxidase activity in green bean and tomatoes. *Bulg J Agric Sci* **5**: 737-740

**Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410

**Mkandawire M, Dudel EG** (2005) Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Sci Total Environ* **336**: 81-89

**Moller IM, J ensen PE, Hansson A** (2007) Oxidative Modifications to cellular components in plants. *Ann Rev Plant Biol* **58**:459-81

- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- Ozturk F, Duman F, Leblebici Z, Temizgul R** (2010) Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environ Exp Bot* **67**: 65-70
- Päivöke A** (1983) The long-term effects of zinc on the growth and development, chlorophyll content and nitrogen fixation of garden pea. *Ann Bot Fennici* **20**: 205-213
- Pawlik-Skowronska B, Pirszel J, Kalinowska R, Skowronski T** (2004) Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat Toxicol* **70**: 201-212
- Pereira FJ, Magalhães PC, Souza TC, Castro EM, Alves JD** (2010) Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. *Pesq Agropec Bras* **45**: 450-456
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G** (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* **2**: 152-159
- Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC** (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol Plantarum* **41**: 387-394
- Schneider J** (2011) Ocorrência e ação fitoprotetora de fungos arbusculares em solos contaminados com arsênio. PhD thesis. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Sharples JM, Meharg AA, Chambers SM, Cairney JWG** (2000) Mechanisms of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenosyphus ericae*. *Plant Physiology* **124**: 1327-1334.
- Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi K, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Rakesh T** (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf* **72**: 1102-1110
- Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K** (2007) Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regul* **53**: 65-73
- Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP, Sharma N, Kohli RK** (2009) Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* **20**: 289-297
- Stockwell PB, Corns WT** (1994) Environmental sensors based on atomic fluorescence. *Analyst* **119**: 1641-1645
- Stoeva N, Bineva T** (2003) Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *J Plant Physiol* **29**: 87-95

**Stummeyer J, Harazim B, Wippermann T** (1996) Speciation of arsenic in water samples by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry at trace levels using a post-column reaction system. *Anal Bioanal Chem* **354**: 344-351

**Ter Welle HF, Slater, EC** (1967) Uncoupling of respiratory-chain phosphorylation by arsenate. *Biochem Biophys* **143**: 1-17

**Tiryakioglu M, Eker S, Ozkutlur F, Husted S, Cakmak I** (2006) Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *J Trace Elem in Med and Biol* **20**: 181-189

**Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJM** (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol* **25**: 156-165

**Tu S, Ma LQ, MacDonald GE, Bondada B** (2004) Effects of arsenic species and phosphorus on arsenic absorption, arsenate reduction and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* L.. *Environ Exp Bot* **51**: 121-131

**Ullrich-Eberius CI, Sanz A, Novacky J** (1989) Evaluation of arsenate and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *J Exp Bot* **40**: 119-128

**Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M** (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact* **160**: 1-40

**Wang H, Huang J, Bi YB** (2010) Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Sci* **179**: 281-288

**Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL** (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* **21**: 381-406

**Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP** (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol* **181**: 777-794

**Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA** (2010) Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 535-559

## **CAPITULO II**

### **EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO DESENCADEADO POR ARSÊNIO EM *Spirodela intermedia* W. KOCH (LEMNACEAE)**

## **Efeito do óxido nítrico na atenuação do estresse oxidativo desencadeado por arsênio em *Spirodela intermedia* W. Koch (Lemnaceae)**

### **RESUMO**

Plantas de *S. intermedia* W. Koch foram submetidas a uma concentração tóxica de arsênio (As) com o objetivo de induzir o estresse oxidativo e avaliar o papel do óxido nítrico (NO), fornecido via nitruprussiato de sódio (SNP), como agente atenuante desse estresse. As plantas foram tratadas com 2 mg L<sup>-1</sup> de As, com ou sem SNP (15,0 mg L<sup>-1</sup>), adicionados à solução nutritiva durante 24 horas. O teor de As, de MDA e a porcentagem de extravasamento de eletrólitos foram determinadas, além da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e redutase do nitrato (NR). Também foi realizada a detecção de NO com o uso da microscopia confocal. A presença do SNP associado ao As resultou em menores concentrações de MDA e extravasamento de eletrólitos em comparação com as plantas tratadas apenas com As. O mesmo foi observado para a atividade das enzimas SOD, CAT, POX e NR. O papel protetor do NO diminuiu os danos oxidativos induzidos por As, possivelmente pela remoção direta das EROs. O aumento da redutase do nitrato indica a produção de óxido nítrico da própria célula frente ao estresse. Porém, a adição do SNP ao meio com As parece ter inibido a ação da redutase do nitrato, indicando uma retroinibição por NO. Diante dos resultados, podemos concluir que o NO atua como um agente protetor de membranas, atuando contra as espécies reativas de oxigênio direta ou indiretamente.

**Palavras-chave:** Sistema antioxidante, espécies reativas de oxigênio, fluorescência, redutase do nitrato

## 1. INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que, em baixas concentrações, apresenta grande estabilidade (Lamattina et al., 2003). Devido ao seu pequeno tamanho e propriedades hidrofóbicas, ele é altamente difusível pelas células, tanto no citosol quanto através das membranas, com uma difusibilidade de  $4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  em água (Arasimowicz e Floryszakwieczorek, 2007). Alguns pesquisadores consideram a possibilidade do NO ser um novo hormônio vegetal, já que atua de maneira dose-dependente e é produzido em pequenas concentrações, podendo sinalizar zonas distantes daquela onde foi produzido (Belligni e Lamattina, 2002). Seu transporte pode ser feito por difusão (distâncias curtas) ou a longa distância, através da ligação reversível com a glutatona, gerando S-nitrosoglutationa (Belligni e Lamattina, 2002; Leitner et al., 2009).

O NO é uma molécula conhecida há muito tempo, mas a sua atuação como um sinalizador indispensável aos seres vivos é conhecimento recente (Durner e Klessig, 1999). Atribui-se a sua descoberta, juntamente com outros gases, a Joseph Priestley, em 1772, conforme descrito na sua obra "Experiments and Observations on Different Kinds of Air". Após sua descoberta, o NO foi negligenciado na biologia por muitos anos, só voltando a ser estudado recentemente.

Mesmo que o estudo do NO em plantas tenha começado há bastante tempo, com o trabalho de Klepper (1979), no qual se detectou a produção endógena de NO, nesse período, não se imaginava que o NO poderia ser um sinalizador em plantas. Foi apenas em 1997 que se constatou a produção endógena substancial de NO por várias espécies vegetais, de maneira independente de herbicidas ou poluentes (Wildt et al., 1997).

Atualmente, o NO tem sido considerado uma importante molécula de sinalização celular, com múltiplas funções biológicas em plantas (Delledonne, 2005; Besson-Bard et al., 2008; Wilson et al., 2008; Siddiqui et al., 2011). Há estudos que comprovam sua atuação na indução de germinação das sementes (Belligni e Lamattina, 2000; Sirova et al., 2011), no crescimento e desenvolvimento das plantas (He et al., 2004; Frey et al., 2012), na regulação da maturação e senescência das plantas (Lin, et al., 2012; Procházková et al., 2011), na defesa contra patógenos (Yoshioka et al., 2010; Gaupels et al.,

2011), na tolerância a altas temperaturas (Xuan et al., 2010), mediando o fechamento estomático (Stimler et al., 2011) e na sinalização dos estresses induzidos por metais (Besson-Bard et al., 2009; Xiong et al., 2010).

Apesar de muitos pesquisadores relatarem a função reguladora do NO na sinalização celular, há várias questões que ainda precisam ser elucidadas em relação ao processo de biossíntese (Wilson et al., 2008). A produção de NO mediada pela enzima sintase do NO dependente de arginina (NOS) carece de confirmação (Leitner et al., 2009), mas a síntese de NO dependente da redutase do nitrato (NR) está bem estabelecida (Rockel et al., 2002; Xu e Zhao, 2003; Sakihama et al., 2002).

Na membrana plasmática das células radiculares de tabaco foi detectada a enzima redutase do nitrito-NO (Ni-NOR), que catalisa a conversão do nitrito em NO, utilizando elétrons provenientes de um doador ainda desconhecido (Stohr et al., 2001). Além disso, o transporte de elétrons nas mitocôndrias pode também produzir NO *in vitro*, mas em tecidos intactos essa via não se mostrou muito significativa e, por isso, não está ainda bem estabelecida (Planchet et al., 2005). Rumer et al. (2009) detectaram a formação de NO a partir de hidroxilaminas em culturas celulares quando em presença de oxigênio. Essa produção parece depender de espécies reativas de oxigênio (EROs) e esses autores sugeriram que as EROs seriam o fator limitante na produção de NO por essa via. Foi também proposta uma via de síntese do NO a partir das poliaminas espermidina e espermina (Tun et al., 2006; Yamasaki e Cohen, 2006), porém essa rota ainda não está bem caracterizada.

O fornecimento exógeno de NO, através de moléculas doadoras, como nitroprussiato de sódio (SNP), apresentam efeitos atenuantes de estresse causado por As (Singh et al., 2009). O SNP é uma molécula inorgânica que não atravessa as membranas celulares, mas é capaz de liberar NO, que por sua vez, entra nas células onde atua. O seu efeito protetor tem sido atribuído à eliminação de radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e/ou à elevação da atividade de enzimas antioxidantes, especialmente da dismutase do superóxido (SOD) (Kopyra e Gwózd, 2003; Zhao et al., 2008; Wang et al., 2010), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (Zhao et al., 2008; Wang et al., 2010), peroxidase total (POX) (Wang et al., 2010). O NO parece atuar ativando a expressão de genes de enzimas antioxidativas e alterando a expressão gênica por interação direta com fatores de transcrição por S-nitrosilação, ou então,



ativando a rota de sinalização que irá afetar os fatores de transcrição no final da rota (Neill et al., 2003; Grün, 2006).

Em contrapartida, a liberação de NO é acompanhada pela liberação de cianeto, o que pode levar à toxicidade celular através da produção de peroxinitrito e peróxido de hidrogênio, dependendo da dose aplicada (Wang et al., 2002). Apesar disso, dentre as moléculas doadoras de NO, o SNP tem demonstrado os melhores resultados (Murgia et al., 2004).

Mesmo com toda a sua importância, ainda são escassos os trabalhos sobre a sinalização promovida pelo NO em plantas e a localização *in situ* do mesmo em tecidos vegetais, se comparados com o grande número de publicações tratando da ação dessa molécula em animais (Neill et al., 2003). As pesquisas que demonstram o envolvimento do NO nos vegetais vem crescendo significativamente, mas, mesmo assim, muitos estudos ainda são necessários (Wilson et al., 2008)

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel do NO como agente atenuante dos efeitos tóxicos causados pelo As em plantas aquáticas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Cultivo e exposição das plantas ao arsenato e ao nitroprussiato de sódio**

Plantas de Spirodela (*Spirodela intermedia* W. Koch Lemnaceae) coletadas no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa foram e transferidas para recipientes de polietileno, contendo 6 L de solução nutritiva de Clark (1975), meia força, pH 6,5, e aclimatadas por 3 dias em sala de crescimento, com temperatura e luminosidade controladas ( $25 \pm 2$  °C,  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), sob fotoperíodo de 16 horas.

Após o período de aclimação, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: (a) solução nutritiva, como controle; (b) solução nutritiva com nitroprussiato de sódio (SNP)  $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; (c) solução nutritiva com arsênio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  e (d) solução nutritiva com As  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  juntamente com SNP  $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ . No período de 24 horas do início dos

tratamentos, procedeu-se a coleta das plantas, a lavagem em água destilada corrente e a armazenagem a -80 °C para futuras análises.

## **2.2 Determinação da concentração de arsênio**

Amostras de 0,1 g de material seco das plantas foram digeridas com mistura nitro-perclórica (2:1), em bloco digestor, com temperatura controlada (100-120°C) até a completa oxidação do material vegetal (Marin et al., 1993). O extrato mineral obtido foi diluído para 10 mL com água desionizada e, então, a concentração de As foi determinada por espectrofotometria de emissão em plasma no espectrofotômetro (ICP-OES Perkin Elmer, OPTIMA 8300, Estados Unidos).

## **2.3 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos**

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações da atividade da catalase (CAT), da peroxidase (POX) e da superóxido dismutase (SOD), foram obtidas pela maceração de 0,3 g de plantas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto et al., 1999), seguido de centrifugação a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C.

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

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 200 µL do extrato enzimático bruto a 2,8 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM (Havir e McHale, 1987). Durante o primeiro minuto de reação, mantida a 25°C, mediu-se o decréscimo na absorvância a 240 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Anderson et al., 1995) e expressa em µmol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **2.3.2 Determinação da atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)**

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,8 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM (Kar e Mishra, 1976). O incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C determinou a produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Chance e Maehley, 1955) e expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

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

Determinou-se a atividade da SOD pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$ , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2  $\mu\text{M}$  (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, interrompeu-se a iluminação e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi determinada pela medição da absorvância a 560 nm. A medição da absorvância, nesse mesmo comprimento de onda, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual tempo, serviu de branco e foi subtraída da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade da SOD foi expressa em  $\text{U min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

## 2.4 Determinação de proteínas

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (Bradford et al.,1976), utilizando albumina bovina (BSA) para realizar a curva padrão.

## 2.5 Determinação da peroxidação de lipídios

Amostras de 0,160 g de plantas foram homogeneizadas com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) e centrifugadas a 12.000 xg por 15 min. Alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) em TCA 20 %. A mistura foi incubada em água fervente por 30 min, e a reação foi interrompida em banho de gelo por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg durante 10 min, e a absorvância determinada a 532 nm. Corrigiu-se a turbidez inespecífica através da subtração da absorvância da mesma em 600 nm. Utilizou-se o coeficiente de extinção  $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para quantificar a concentração dos peróxidos de lipídios, sendo os resultados expressos em nmol MDA  $\text{g}^{-1}$  de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

## 2.6 Extravasamento de eletrólitos

Para a análise do extravasamento de eletrólitos utilizou-se segmentos de tecido vegetal de aproximadamente 0,4 g, os quais passaram por lavagem e acondicionamento em tubos de tampa rosqueável, contendo 20 mL de água desionizada. Após fechados, os tubos foram acondicionados à temperatura de 25°, por 6 h sendo, em seguida, aferida a condutividade inicial do meio ( $X_i$ ) usando condutímetro de bancada (Digimed, DM31, Brasil). Posteriormente os tubos foram submetidos à temperatura de 80°C, por 120 minutos, em estufa de secagem e, após resfriamento do conteúdo das mesmas, aferiu-se a condutividade final ( $X_f$ ). A condutividade da água destilada usada no experimento foi usada como branco. Expressou-se o extravasamento de eletrólitos como a porcentagem de condutividade em relação à condutividade total após o tratamento por 120 minutos a 80° C:  $[(X_i/X_f) \times 100]$  (Scotti e Thu, 1997).

## **2.7 Determinação da atividade da redutase do nitrato (NR, EC 1.6.6.1)**

Aproximadamente 0,5 g de material vegetal foi cortado em pequenos segmentos, incubadas em 5 mL do meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5 e KNO<sub>3</sub> 0,2 M e infiltrados no vácuo. Após 1 h incubadas em banho maria a 30 °C no escuro e sob agitação, as amostras foram filtradas. Adicionou-se a uma alíquota de 2 mL do sobrenadante 100 µL de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N e 1 mL de N-2-nafitiletileno 0,02%. Após, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em µmol NO<sub>2</sub><sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF com base em curva de calibração.

## **2.8 Detecção *in situ* da produção de óxido nítrico (NO)**

Após 24 h de exposição aos tratamentos, procedeu-se à coleta de plantas para análise *in situ* da produção de NO. Raízes inteiras foram incubados em solução de 4,5 diaminofluoresceína diacetato (DAF-FM DA) 10 µM, à temperatura ambiente, na ausência de luz (Kojima et al., 1998; Magalhães et al., 2000). Decorridos 15 min, segmentos radiculares foram lavados em água destilada para retirada do excesso da substância marcadora e, em seguida, montados em água entre lâmina e lamínula. Seguiu-se a análise imediata em microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss, LSM 510, DE) meta com laser de comprimento de onda de 488 nm e filtros de comprimentos de onda de 505 e 530 nm, com pinhole de 3 Airy Unit. As imagens obtidas foram computadas e analisadas utilizando-se o programa Zeiss LCM Image Browser. Para todos os tratamentos, realizou-se o controle negativo, sem a presença da substância marcadora DAF-FM DA, a fim de visualizar a fluorescência natural (autofluorescência).

## **2.9 Delineamento experimental e análise estatística**

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo 4 tratamentos e 5 repetições, sendo que cada unidade experimental consistiu de 3 gramas de planta por vaso. E os dados

submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância para todos os experimentos. Procedeu-se todas as análises com o auxílio do programa Genes (Cruz, C.D., 2006).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Concentração de Arsênio em *S. intermedia*

A absorção do As pelas plantas ocorreu de forma relativamente rápida, atingindo teores elevados com 24 h. Observou-se, também, a participação do NO na redução da absorção desse metalóide, fazendo com que os teores de As nas plantas expostas somente ao As fossem 37% maiores do que aquelas obtidas no tratamento com As + SNP (Tabela 1).

**TABELA 1:** Concentrações de As em *Spirodela intermedia* expostas por 24 horas aos tratamentos contendo As e SNP, isoladamente e em conjunto. Médias  $\pm$  desvio padrão

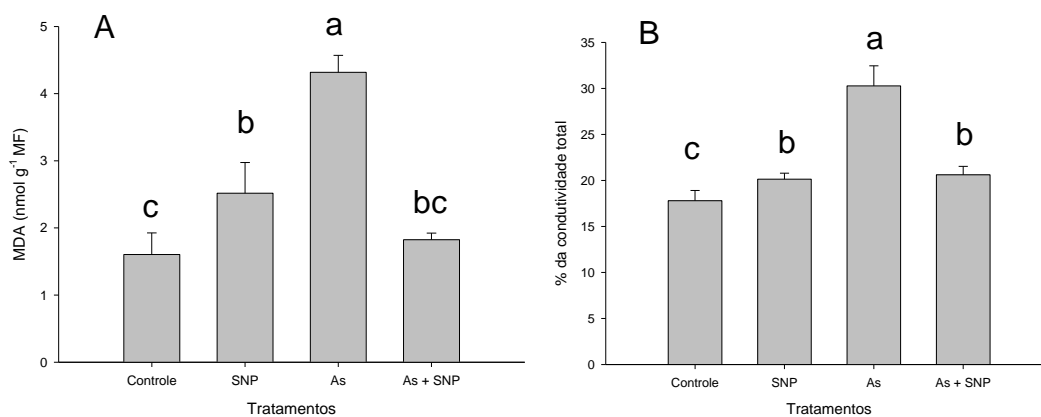
Concentração de As (mg L <sup>-1</sup> )	Teor de As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MF)
Controle	0,00 $\pm$ 0.49 c*
SNP	0,00 $\pm$ 0.67 c
As	465,20 $\pm$ 28,34 b
As + SNP	739,00 $\pm$ 15,47 a

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 3.2 Peroxidação de lipídios e extravasamento de eletrólitos

Ao final das 24 horas de exposição ao As, a concentração de malonaldeído (MDA) alcançou valor 168 vezes maior do que aquele obtido no controle e 138% maior que o tratamento de As na presença de SNP. Já os tratamentos de As+SNP e somente SNP não diferiram estatisticamente entre si e com o controle. (Fig 1A)

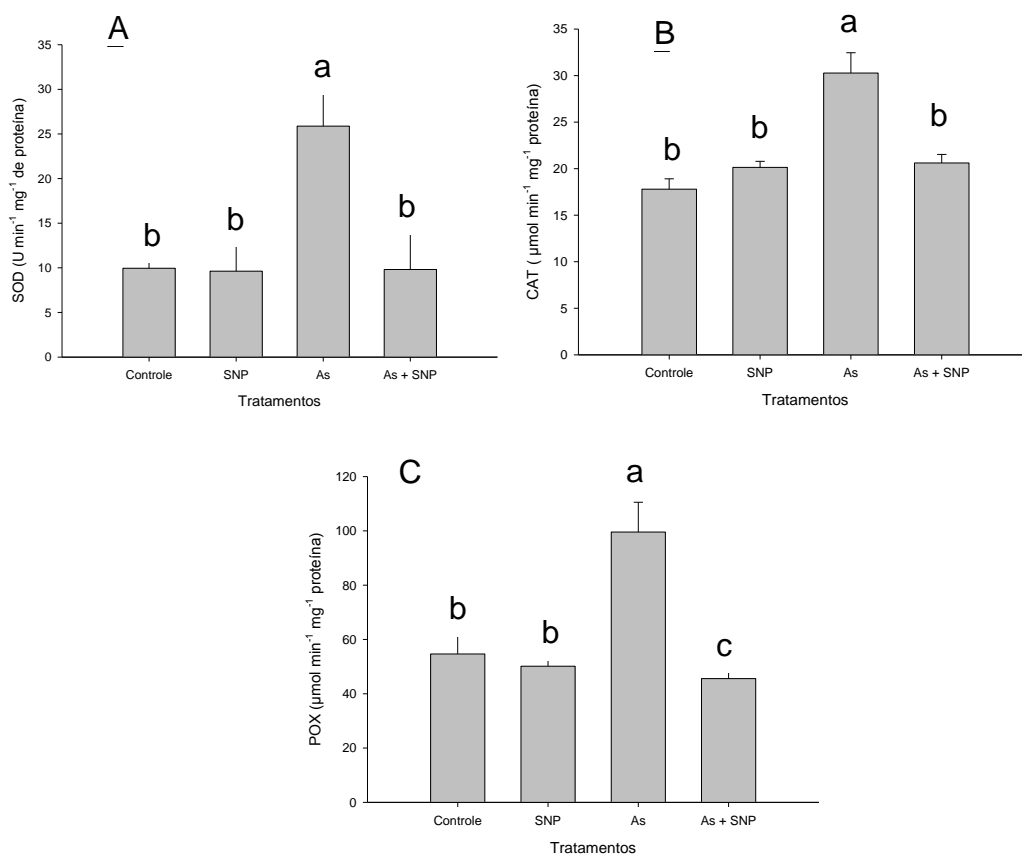
Seguindo a mesma tendência, pode-se observar na Figura 1B, o aumento de 50% de extravasamento de eletrólitos no tratamento contendo apenas As em relação ao controle e ao tratamento somente com SNP de 50% e um aumento de 76% em relação ao tratamento contendo As + SNP.



**Figura 1:** Concentrações de malonaldeído (MDA) e extravasamento de eletrólitos em *Spirodela intermedia* após 24 horas de exposição aos tratamentos: Controle, SNP 15 mg L<sup>-1</sup>, As 2 mg L<sup>-1</sup> e As+SNP. Médias seguidas pela mesma não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.3 Efeito do arsênio sobre o sistema antioxidativos enzimático das plantas

A atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) aumentou nas plantas expostas ao arsênio (As), com acréscimos da ordem de 212, 25 e 83%, respectivamente, maiores do que no controle, após 24 horas de exposição. A presença de SNP na solução contendo As não resultou em qualquer incremento dessas atividades, mantendo os valores semelhantes àqueles observados nas plantas do controle (Fig 2A, B e C).

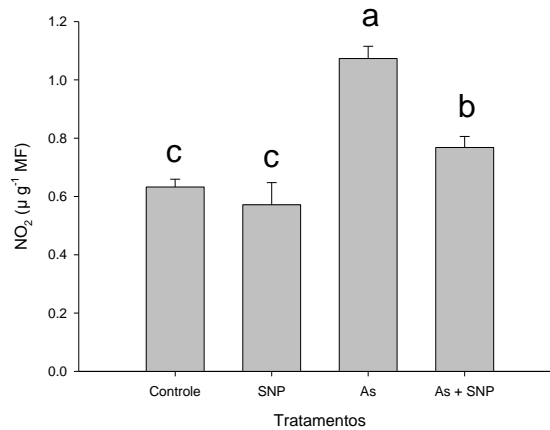


**Figura 2:** Atividade das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), peroxidase (C), em *Spirodela intermedia* após 24 horas de exposição aos tratamentos Controle, SNP 15,0mg L<sup>-1</sup>, As 2,0 mg L<sup>-1</sup> e As+SNP. Médias seguidas pela mesma não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.4 Atividade da redutase do nitrato

Ao observarmos a atividade da redutase do nitrato foi reduzida em 26% na atividade em plantas submetidas ao tratamento com SNP em relação ao controle. Porém houve um aumento expressivo de quase 70% se compararmos o tratamento submetido somente ao As com controle e reduziu 40% em relação ao tratamento de As com SNP (Fig 3).





**Figura 3:** Atividade da enzima redutase do nitrato, em *Spirodela intermedia* após 24 horas de exposição aos tratamentos Controle, SNP 15 mg L<sup>-1</sup>, As 2 mg L<sup>-1</sup> e As+SNP. Médias seguidas pela mesma não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

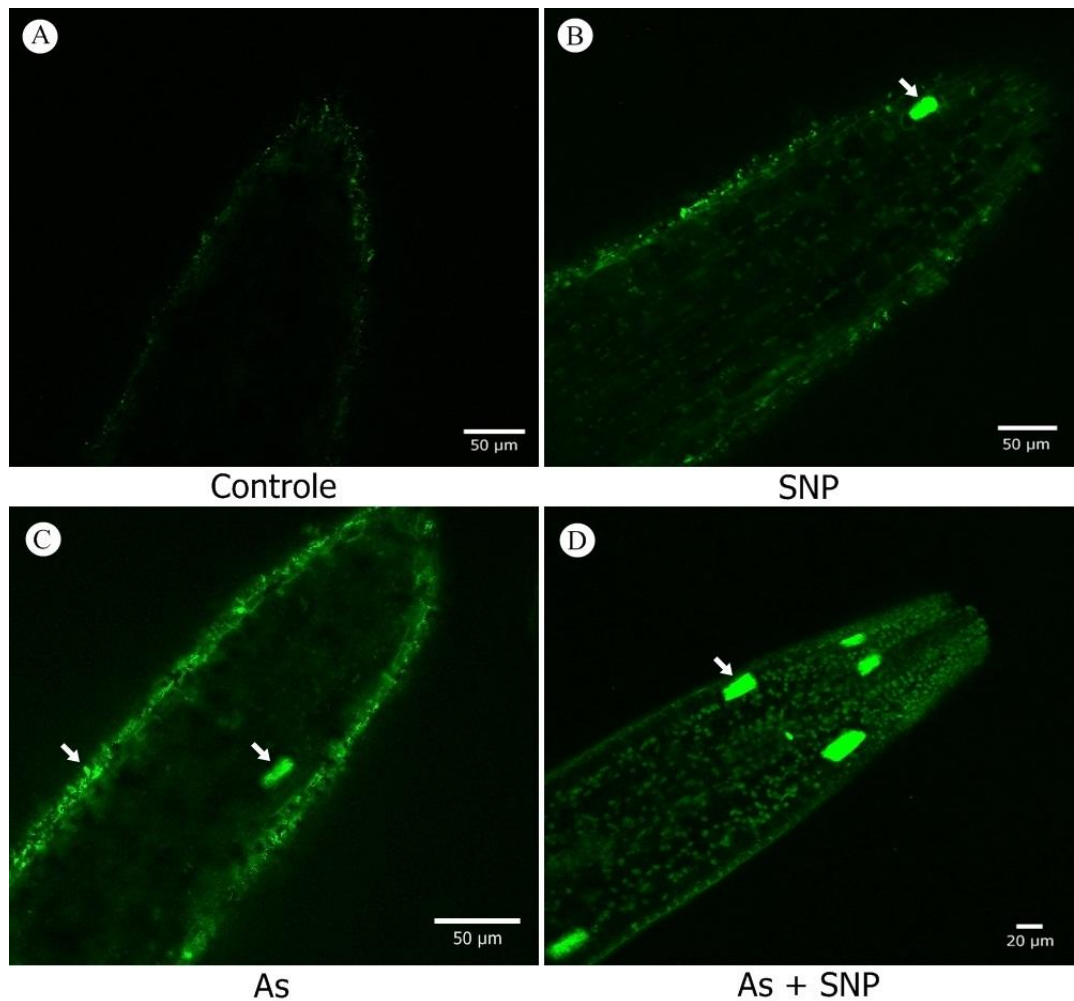
### 3.5 Detecção *in situ* da produção de óxido nítrico (NO)

A raiz das plantas, sem aplicação do marcador DAF 2-FM DA, apresentou baixa emissão de fluorescência, sendo este considerado o controle negativo de fluorescência natural das raízes (Fig 4 B, D, F, H).

O tratamento controle, com aplicação de DAF 2-FM DA, apresentou reduzida emissão de fluorescência, porém mais alta que raízes sem aplicação de DAF 2-FM DA revelando produção basal de NO (Fig 4 A).

Nas plantas expostas apenas ao SNP, doador exógeno de NO, houve maior emissão de fluorescência, se comparado ao controle (Fig 4 C).

Já a exposição das plantas ao As resultou em elevada emissão de fluorescência uniformemente distribuída, possível de ser visualizada em grande parte da raiz (Fig 4 E). Nas plantas expostas ao As + SNP ocorreu intensa produção de NO. Embora a emissão tenha ocorrido de forma similar àquela observada nas plantas expostas apenas ao As, o padrão de distribuição da fluorescência foi diferente, sendo possível identificar emissões pontuais de fluorescência em células individuais e em toda a raiz (Fig 4 G).



**Figura 4:** Produção *in situ* de NO em raízes de *Spirodela intermedia*, coletadas após 24 h de tratamento, utilizando o marcador DAF-FM 2 DA: A) Controle; C) SNP; E) As e G) As+SNP. E sem aplicação de DAF-FM 2 DA: B) Controle; D) SNP; F) As e H) As+SNP. As setas indicam maior intensidade de fluorescência.

#### 4. DISCUSSÃO

Foi possível observar uma maior concentração de arsênio em plantas expostas somente ao As em solução, se comparada com o tratamento onde também houve a adição de SNP. Isso pode ser explicado pelo fato de o óxido nítrico (NO) ter exercido um papel protetor, preservando as membranas e impedindo a livre passagem do As. Outra hipótese o estímulo do NO na produção de pectina e hemicelulose nas raízes diminuindo, assim, a absorção de As, conforme resultados obtidos por Xiong et al. (2009) em plantas de arroz expostas ao cádmio em presença de NO.

A maior produção de EROs em presença de As leva a um desequilíbrio no potencial redox celular e aumenta a capacidade oxidante da célula, desencadeando danos em vários processos fisiológicos (Singh et al; 2009).

Este efeito tóxico do As, entretanto, foi revertido em *S. intermedia* pela presença de SNP, provavelmente devido ao aumento da sua capacidade antioxidante. O SNP pode agir como mensageiro celular e desencadear sinais para aumentos na atividade do sistema antioxidante nas células. É possível que, adicionalmente ao seu efeito como molécula sinalizadora, o SNP tenha agido como antioxidante, eliminando diretamente o excesso de EROs (Xiong et al., 2010)

O equilíbrio na atividade das enzimas antioxidativas (SOD, CAT e POX) é de grande importância para manter o estado redox da célula, evitando a o acúmulo de EROs e principalmente a formação de radicais hidroxila altamente tóxicos (Apel e Hirt, 2004).

A SOD é a primeira enzima a atuar na remoção de EROs eliminando o  $O_2^-$  e formando  $H_2O_2$  (Alscher et al., 2002). Em presença de SNP juntamente com o As, a atividade da SOD apresentou redução, o que, neste caso, pode ter ocorrido em função da redução na concentração do  $O_2^-$  por ação direta do NO, diminuindo assim, o substrato da enzima. Resultados semelhantes foram encontrados em raízes de trigo submetidas ao estresse por cádmio, onde a aplicação do SNP causou a redução na atividade da SOD, assim como de outras enzimas e em raízes de arroz, submetidas ao As e SNP (Singh et al., 2008 e 2009).

O NO, fornecido via SNP, teve papel semelhante na atividade da catalase (CAT) e da peroxidase (POX) em *S. intermedia* exposta ao As, auxiliando na atenuação dos danos tóxicos causados por este elemento. Essa ação do NO sobre a CAT e a POX foi, também, verificado em outras condições de estresse, como relatado por Beligni e Lamattina (2002) em folhas de batata tratadas com herbicida e por Wang et al. (2011) em *Hydrilla verticillata* tratada com amônia. Tanto a CAT quanto a POX atuam na remoção de  $H_2O_2$ , porém essas duas classes de enzimas apresentam afinidades diferentes para com o substrato. As peroxidases são responsáveis pela fina modulação de  $H_2O_2$ , removendo-o mesmo em quantidades menores, enquanto que as catalases são responsáveis pela remoção dessa molécula em altas concentrações, ou seja, durante o estresse (Willekens et al., 1997; Mittler 2002).

Com menor concentração desses EROs, os danos celulares são reduzidos, inclusive a peroxidação lipídica (Darley-Usmar et al., 2000). Em plantas expostas ao As+SNP observou-se diminuição na peroxidação de

lipídios e no extravasamento de eletrólitos, conforme verificado em respostas de toxicidade induzida por cobre (Yu et al., 2005), alumínio (Wang e Yang, 2005) e cádmio (Sing et al., 2008). O processo de peroxidação de lipídios é resultado de uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de EROs sobre os lipídios insaturados das membranas celulares gerando, principalmente, radical lipídico, radical alcoxila e radical peroxila. Essas reações levam à destruição da estrutura da membrana, falência dos mecanismos de troca de metabólitos, extravasamento de eletrólitos e, numa condição extrema, à morte celular. A peroxidação lipídica talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia sequência de lesões na célula (Darley-Usmar et al., 2000). Além de atuar como agente indutor de mecanismos antioxidantes, o NO pode agir diretamente por combinação com radical alcoxila e radical peroxil, o que interrompe a peroxidação lipídica evitando a propagação do evento (Wink e Mitchell, 1998).

A redução na geração de MDA e no extravasamento de eletrólitos observado nas plantas expostas ao tratamento As + SNP demonstram o efeito citoprotetor do NO, reduzindo os danos celulares e dessa forma, impedindo grande absorção de As pelas plantas. (Singh et al., 2008 e 2009, Valentovicová et al., 2010).

O NO em plantas é sintetizado basicamente por meio de duas rotas metabólicas: uma tem como precursor a L-arginina e envolve a ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) e a outra parte do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), que é transformado em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pela ação da redutase do nitrato (RN) e, em seguida, em NO (Neill et al., 2003; Crawford 2006; Wilson et al., 2008). A aplicação de nitroprussiato de sódio (SNP), fornecedor exógeno de óxido nítrico (NO) foi capaz de reduzir a atividade da RN, semelhante ao encontrado nos trabalhos de Wang e Yang (2005) e Wang et al. (2010). Essa redução pode se dar por uma retroinibição da enzima na presença de NO (Zheng et al., 2005).

A exata localização e quantificação de NO em extratos ou tecidos de plantas é possível graças à utilização de marcadores, como as diaminofluoresceínas (DAFs) (Kojima et al., 1998). Nas plantas submetidas ao estresse por As, houve maior produção de NO, confirmado pela elevada intensidade de fluorescência. Correlacionando os resultados obtidos, sugere-se que o NO produzido, nesse caso, atua como indutor da atividade de enzimas

do sistema antioxidante, atenuando os danos oxidativos. Em plantas tratadas com As e SNP foi observada, também, intensa emissão de fluorescência, indicando elevada concentração de NO. Nesse caso, entretanto, o NO pode ter participado diretamente na remoção de EROs, atenuando, de forma mais eficiente, os danos tóxicos do As. Resultados semelhantes foram obtidos por Singh et al. (2009), em que plantas de arroz, também expostas ao As, tiveram aumento na atividade das enzimas antioxidantes.

Desta forma, o NO, suprido na forma de SNP, é capaz de atenuar o estresse oxidativo desencadeado pelo As, restaurando a homeostase celular e diminuindo a peroxidação lipídica. A localização *in situ* do óxido nítrico pode ser avaliada por microscopia de fluorescência, no qual demonstrou um maior aumento de NO em plantas tratadas com As.

## 5. RERERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* **53**: 1331-1341.

**Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399.

**Arasimowicz M, Floryszakwieczorek J** (2007) Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Sci* **172**: 876887

**Aravind P, Prasad MNV** (2005) Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiol Biochem* **43**: 107-116

**Beligni MV, Lamattina L** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and deetiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215-221

**Beligni MV, Lamattina L** (2002) Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant Cell Environ* **25**: 737-748

**Besson-Bard A, Gravot A, Richaud PA, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou JP, Pugin A, Wendehenne D**(2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in Arabidopsis by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol* **149**:1302-1315

**Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D**(2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **59**:21-39

**Cao X, Ma LQ, Tu C** (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environ Pollut* **128**: 317-325

**Cook NC, Samman S** (1996) Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources - review. *J Nutr Biochem* **7**: 66-76

**Crawford NM** (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot***57**: 471-478

**Darley-USmar VM, Patel RP, O'Donnell VB, Freeman BA** (2000) Antioxidant Actions of Nitric Oxide. In Ignarro LJ, Nitric Oxide Biology and Pathobiology. Academic Press, London, pp 265-276

**Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (2005) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**:585-588

**Dong J, Wu F, Zhang G** (2006) Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* **64**: 1659-1666

**Drazkiewicz M, Skorznska-Polit E, Krupa Z** (2003) Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L). Plant Sci **164**: 195-202

**Durner J, Klessig DF** (1999) Nitric oxide as a signal in plants. Curr Opin Plant Biol **2**: 369-374

**Frey NFD, Mbengue M, Kwaaitaal M, Nitsch L, Altenbach D, Häweker H, Lozano-Duran R, Njo MF, Beeckman T, Huettel B, Borst JW, Panstruga R, Robatzek S** (2012) Plasma membrane calcium ATPases are important components of receptor-mediated signaling in plant immune responses and development. Plant Physiol **159**:798-809

**Gaupels F, Spiazzi-Vandelle E, Yang D, Delledonne M** (2011) Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response. Nitric Oxide **25**:222-228

**Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J** ( 2006 ) Nitric oxide and gene regulation in plants. J Exp Bot **57**: 507-516

**Guimarães FP** (2006) Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução. Master thesis. Universidade Federal Viçosa, Viçosa, MG.

**Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Bookum WT, Schat H, Meharg AA** (2001) Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. Plant Physiol **126**: 299-306

**He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM** (2004) Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. Science **305**:1968-1971

**Israr M, Sahi S, Datta R, Sarkar D** (2006) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. Chemosphere **65**: 591-598

**Juszczuk IM, Wiktorowska A, Malusá E, Rychter AM** (2004) Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Soil **267**: 41-49

**Khan I, Ahmad A, Iqbal M** (2009) Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. Ecotoxicol Environ **72**: 626-634

**Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M** (2009) Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environ Chem Lett **7**: 1-19

**Klepper LA** (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) emissions from herbicide-treated soybean plants. Atmos Environ **13**: 537-542

**Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T** (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. Anal Chem **70**: 2446-2454

**Kopyra M, Gwózdź FA** (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. Plant Physiol Biochem **41**: 1011-1017

- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 109-139
- Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Deledonne M** (2009) NO signals in the haze: nitric oxide signaling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**:451-458
- Lin A, Wang Y, Tang J, Xue P, Li C, Liu L, Hu B, Yang F, Loake GJ, Chu C**(2012) Nitric oxide and protein S-nitrosylation integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiol* **158**:451-464
- Marchand LL** (2002) Cancer preventive effects of flavonoides - a review. *Biomed Pharmacother* **56**: 296-301
- Márquez-García B, Córdoba F** (2010) Antioxidative system in wild populations of *Erica andevalensis*. *Environ Exp Bot* **68**: 58-65
- Marschner H** (1995) Functions of mineral nutrients: macronutrients. In Marschner H, Mineral nutrition of higher plants, Ed 2. Academic Press, London, pp 229-299
- Mascher R, Lippmann B, Holzinger S, Bergmann H** (2002) Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci* **163**: 961-969
- Meharg AA, Hartley-Whitaker J** (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol* **154**: 29-43
- Mishra S, Jha AB, Dubey RS** (2010) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma* **248**: 565- 577
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Trivedi PK** (2008) Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L.. *Aquat Toxicol* **86**: 205-215
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindaraian R, Kuriakose SV, Prasad MN** (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol Biochem* **44**: 25-37
- Mishra S, Svivastava S, Tripathi RD, Kumar R, Seth CS, Gupta DK** (2006) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* **65**: 1027-1039
- Mishra VK, Upadhyay AR, Pandey SK, Tripathi BD** (2008) Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Plant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent. *Environ Monit Assess* **141**: 49-58
- Miteva E, Hristova D, Nenova V, Maneva S** (2005) Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. *Sci Hort* **105**: 343-358



- Miteva E, Peycheva S** (1999) Arsenic accumulation and effect on peroxidase activity in green bean and tomatoes. *Bulg J Agric Sci* **5**: 737-740
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Mkandawire M, Dudel EG** (2005) Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Sci Total Environ* **336**: 81-89
- Moller IM, J ensen PE, Hansson A** (2007) Oxidative Modifications to cellular components in plants. *Ann Rev Plant Biol* **58**:459-81
- Murgia I, Pinto MC, Delledonne M, Soavea C, Gara L** (2004) Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *J Plant Physiol* **161**: 777-783
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT** (2003) Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* **159**: 11-35
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- Ozturk F, Duman F, Leblebici Z, Temizgul R** (2010) Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environ Exp Bot* **67**: 65-70
- Päivöke A** (1983) The long-term effects of zinc on the growth and development, chlorophyll content and nitrogen fixation of garden pea. *Ann Bot Fennici* **20**: 205-213
- Pawlik-Skowronska B, Pirszel J, Kalinowska R, Skowronski T** (2004) Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat Toxicol* **70**: 201-212
- Pereira FJ, Magalhães PC, Souza TC, Castro EM, Alves JD** (2010) Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aer nquima em raízes de milho 'Saracura'. *Pesq Agropec Bras* **45**: 450-456
- Planchet E, Jagadis-Gupta K, Sonoda M, Kaiser WM** (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* **41**: 732-743
- Proch zkov  D, Wilhelmova N**(2011) Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. *Nitric Oxide* **24**:61-65
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G** (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* **2**: 152-159
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**: 103-110

- Rumer S, Kapuganti JG, Kaiser WM** (2009) Oxidation of hydroxyamines to NO by plant cells. *Plant Signal Behav* **4**: 853-855
- Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC** (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol Plantarum* **41**: 387-394
- Sakihama Y, Nakamura S, Yamasaki H** (2002) Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol* **43**: 290-297
- Schneider J** (2011) Ocorrência e ação fitoprotetora de fungos arbusculares em solos contaminados com arsênio. PhD thesis. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi K, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Rakesh T** (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf* **72**: 1102-1110
- Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Basalah MO** (2011) Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* **248**:447-455
- Singh HP, Batish DR, Kaur G, Arora K, Kohli RK** (2008) Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environ Exp Bot* **63**: 158-167
- Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K** (2007) Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regul* **53**: 65-73
- Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP, Sharma N, Kohli RK** (2009) Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* **20**: 289-297
- Sirova J, Sedlarova M, Piterkova J, Luhova L, Petrivalsky M** (2011) The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Sci* **181**:560-572
- Stimler K, Berry JA, Montzka SA, Yakir D** (2011) Association between carbonyl sulfide uptake and 18 D during gas exchange in C3 and C4 leaves. *Plant Physiol* **157**: 509-517
- Stockwell PB, Corns WT** (1994) Environmental sensors based on atomic fluorescence. *Analyst* **119**: 1641-1645
- Stoeva N, Bineva T** (2003) Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *J Plant Physiol* **29**: 87-95
- Stohr C, Strube F, Marx G** (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**: 835-841

**Stummeyer J, Harazim B, Wippermann T** (1996) Speciation of arsenic in water samples by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry at trace levels using a post-column reaction system. *Anal Bioanal Chem* **354**: 344-351

**Ter Welle HF, Slater, EC** (1967) Uncoupling of respiratory-chain phosphorylation by arsenate. *Biochim Biophys* **143**: 1-17

**Tiryakioglu M, Eker S, Ozkutlur F, Husted S, Cakmak I** (2006) Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *J Trace Elem in Med and Biol* **20**: 181-189

**Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJM** (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol* **25**: 156-165

**Tu S, Ma LQ, MacDonald GE, Bondada B** (2004) Effects of arsenic species and phosphorus on arsenic absorption, arsenate reduction and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* L.. *Environ Exp Bot* **51**: 121-131

**Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GFE** (2006) Polyamines induced rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol* **47**: 346-354

**Ullrich-Eberius CI, Sanz A, Novacky J** (1989) Evaluation of arsenate and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *J Exp Bot* **40**: 119-128

**Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M** (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact* **160**: 1-40

**Wang C, Zhang SH, Li W, Wang PF, Li L** (2011) Nitric oxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Ecotoxicol Environ Saf* **74**: 67-73

**Wang H, Huang J, Bi YB** (2010) Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Sci* **179**: 281-288

**Wang PG, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T, Janczuk AJ** (2002) Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev* **102**: 1091-1134

**Wang X, Li J, Liu J, He W, Bi Y** (2010) Nitric oxide increases mitochondrial respiration in a cGMP-dependent manner in the callus from *Arabidopsis thaliana*. *Nitric Oxide* **23**: 242-250

**Wang YS, Yang GM** (2005) Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol* **46**: 1915-1923

**Wildt J, Kley D, Rockel A, Rockel P, Segschneider HJ** (1997) Emission of NO from several higher plant species. *J Geophys Res* **102**: 5919-5927

**Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Montagu MV, Inzé D, Camp WV** (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J* **16**: 4806-4816

**Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT** (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ* **31**: 622-631

**Wink DA, Mitchell JB** (1998) Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Bio Med* **25**: 434-456

**Xiong J, Fu GF, Tao LX, Zhu C** (2010) Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Arch Biochem Biophys* **497**:13-20

**Xu YC, Zhao BL** (2003) The main origin of endogenous NO in higher nonleguminous plants. *Plant Physiol Biochem* **41**: 833-838

**Xuan Y, Zhou S, Wang L, Cheng Y, Zhao L** (2010) Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of AtCaM3 in thermotolerance in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol* **153**: 1895-1806

**Yamasaki H, Cohen MF** (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci* **11**: 522-524

**Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL** (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* **21**: 381-406

**Yoshioka H, Mase K, Yoshioka M, Kobayashi M, Asai S** (2011) Regulatory mechanisms of nitric oxide and reactive oxygen species generation and their role in plant immunity. *Nitric Oxide* **25**:216-221

**Yu CC, Hung KT, Kao HC** (2005) Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH<sup>4+</sup> accumulation in rice leaves. *J Plant Physiol* **162**: 1319-1330

**Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP** (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol* **181**: 777-794

**Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA** (2010) Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 535-559

**Zhao L, Zhang SL, Tao JY, Pang R, Jin F, Guo YJ, Dong JH, YE P, Zhao HY, Zheng GH** (2008) Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) in vitro. *Int Immunopharmacol* **8**: 1059-1064

**Zheng SJ, Yang JL, He YF, Yu XH, Zhang L, You JF, Shen RF, Matsumoto, H** (2005) Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiol* **138**: 297-303

## CONCLUSÕES GERAIS

A tolerância da *S. intermedia* ao As pode estar relacionada à intensa atividade das enzimas antioxidantes POX, APX, GPX e SOD com o aumento da dose de As. Essas enzimas foram responsáveis pela queda expressiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porém os níveis de  $\cdot\text{O}^{2-}$  aumentaram com a dose de arsênio, demonstrando que a alta atividade da SOD não foi capaz de remover totalmente essa ERO. Já a CAT, parece não ter papel fundamental na remoção de EROs, já que sua atividade diminuiu com o aumento da dose de As.

Espécies reativas de oxigênio em excesso, principalmente o  $\cdot\text{O}^{2-}$ , que não foi totalmente eliminado pelo sistema antioxidativo, pode ter causado danos de membrana, levando a alterações estruturais da coifa da raiz quando essa foi exposta ao As.

A exposição das plantas ao As foi acompanhada do aumento da atividade das enzimas antioxidantes, indicando a participação ativa destas enzimas como parte da estratégia que reduz o estresse induzido pelo metalóide. Nas plantas expostas ao As em presença de SNP, essas atividades foram reduzidas, chegando bem próximos a valores encontrados em plantas controle, possivelmente, devido à ação direta do óxido nítrico (NO) na remoção dos metabólitos tóxicos, não requerendo, portanto, incremento na atividade das enzimas do sistema de proteção antioxidante celular.

A atividade da redutase do nitrato aumentou quando as plantas foram submetidas ao tratamento com As. E apresentou uma suave queda no tratamento somente com SNP ou de As na presença de SNP, indicando uma retroinibição da enzima quando se fornece NO exógeno.

A técnica empregando a microscopia de fluorescência permitiu a visualização e quantificação da emissão de fluorescência proveniente da maior concentração de NO em raízes expostas ao As e ao As+ SNP.