

FERNANDA VIDAL DE CAMPOS

**RESPOSTAS DO METABOLISMO
ANTIOXIDATIVO DE *Pistia stratiotes* L.
(ARACEAE) SUBMETIDA AO ARSENITO**

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
2014

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

T

C198r
2014
Campos, Fernanda Vidal de, 1989-
Respostas do metabolismo antioxidativo de *Pistia stratiotes* L.
(Araceae) submetida ao arsenito / Fernanda Vidal de Campos. - Viçosa, MG,
2014.
ix, 49f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.36-49.

1. *Pistia stratiotes*. 2. Fitorremediação. 3. Arsênio. 4. Testes de toxicidade. 5. Antioxidantes. 6. Stress oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 584.64

FERNANDA VIDAL DE CAMPOS

**RESPOSTAS DO METABOLISMO
ANTIOXIDATIVO DE *Pistia stratiotes* L.
(ARACEAE) SUBMETIDA AO ARSENITO**

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: 24 de janeiro de 2014.

Prof. Cleberson Ribeiro

Prof. Adriano Nunes Nesi

Prof. Juraci Alves de Oliveira

(Orientador)

Aos meus amados pais Dimas e Ariméia, como reconhecimento de todo incentivo e amor, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar mais esta conquista e por me conceder força e perseverança em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Dimas e Ariméia e meus irmãos Renata e Tiago, pelo amor, carinho, amizade e palavras de incentivo que foram cruciais para a conclusão desta etapa.

Ao Bruno por todo amor, companheirismo e por me fazer enxergar as coisas importantes da vida.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira pelos ensinamentos, apoio, amizade e por ser um exemplo de orientador.

Ao professor Cleberson Ribeiro pelas valiosas contribuições para realização deste trabalho.

Ao professor José Cambraia pela coorientação e ensinamentos.

Ao professor Adriano Nunes Nesi pela disponibilidade em analisar este material.

Aos amigos conquistados em Viçosa: Adinan, David, Rebeca e Amanda, pelos momentos de descontração e por tornarem esta etapa mais leve. E aos amigos que mesmo a distância sempre me apoiou.

Aos amigos do Laboratório, Luciana, Cristiane, Regiane, Flávio, Luhan e em especial ao Adinan pela amizade e por me ajudar em cada etapa deste trabalho e a Fernanda pelos bons momentos de risadas.

Às companheiras de república Lays, Marcela e em especial a Carla pelas conversas, companhia e por sempre estar tão disposta a ajudar.

A CAPES e Fapemig pela concessão da bolsa de estudos e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal por me proporcionar esta oportunidade.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálises (NMM) e em especial a Karla pela colaboração nas análises.

Aos funcionários Carlos e Beringh pelo auxílio.

BIOGRAFIA

Fernanda Vidal de Campos, filha de Dimas Valter de Campos e Ariméia Vidal de Campos, nasceu em 20 de fevereiro de 1989, em Barbacena, MG.

Em dezembro de 2011 graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF.

Em fevereiro de 2012 iniciou o Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa da dissertação em janeiro de 2014.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1- Obtenção, aclimatação e aplicação dos tratamentos	6
2.2- Determinação do teor de arsênio e fator de translocação (FT)	6
2.3- Sintomatologia visual das plantas expostas ao arsenito.....	7
2.4- Determinação da taxa de crescimento relativo (TCR)	7
2.5- Determinação da concentração de espécies reativas de oxigênio	7
2.6- Avaliação da integridade da membrana	
2.6.1- Determinação da peroxidação lipídica	8
2.6.2- Determinação do extravasamento de eletrólitos	9
2.7- Avaliação do sistema antioxidante enzimático	9
2.7.1- Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD)	10
2.7.2- Determinação da atividade da catalase (CAT)	10
2.7.3- Determinação da atividade das peroxidases (POX)	11
2.7.4- Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX)	11
2.8- Avaliação do metabolismo da glutathiona	
2.8.1- Determinação da concentração de glutathiona total (GSH +GSSG)	11
2.8.2- Determinação da atividade da sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS)	12
2.8.3- Determinação da atividade da redutase da glutathiona (GR)	12
2.8.4- Determinação da atividade da peroxidase da glutathiona (GPX)	13
2.8.5- Determinação da atividade da sulfotransferase da glutathiona (GST)	13
2.9- Delineamento experimental e análise estatística	14
3. RESULTADOS	15
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMO

CAMPOS, Fernanda Vidal de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2014. Respostas do metabolismo antioxidativo de *Pistia stratiotes* L. (Araceae) submetida ao arsenito. Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientador: José Cambraia.

Plantas de *Pistia stratiotes* foram submetidas a diferentes concentrações de arsenito (As^{III}) com a finalidade de avaliar a intensidade do estresse oxidativo gerado por este metaloide e as respostas antioxidantes envolvidas na tolerância desta espécie ao estresse. Após a aclimação (5 dias) em solução nutritiva de Clark $\frac{1}{4}$ de força iônica e pH 6,5, as plantas foram expostas a quatro tratamentos: controle (apenas solução nutritiva), 5, 10 e 20 μM de As^{III} , onde permaneceram por 24 horas para as análises bioquímicas e durante 4 dias para as análises de absorção de arsênio (As), sintomatologia visual e taxa de crescimento relativo (TCR). Plantas de *P. stratiotes* apresentaram altos teores de As, no entanto, a maior parte deste elemento ficou retida nas raízes, conferindo um baixo fator de translocação. A presença do As promoveu sintomas de toxidez e alterações nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, evidenciados por intensa clorose, perda radicular, redução da TCR, aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), danos de membrana, alterações na atividade de enzimas antioxidantes e no teor de glutathione total. Os resultados obtidos evidenciam que plantas de *P. stratiotes* expostas à concentração mais baixa de As^{III} (5 μM) são tolerantes ao metaloide, devido a atuação eficiente dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. No entanto, a exposição à concentração mais elevada de As^{III} , resultou em comprometimento dos mecanismos de defesa, principalmente nas raízes, em decorrência do elevado acúmulo de As neste órgão. Nesse sentido, o mecanismo de toxidez do As^{III} envolve a maior formação de ROS e, paralelamente, a inibição dos mecanismos antioxidantes, resultando na alta incidência de estresse oxidativo. Assim,

pode-se concluir que *P. stratiotes* é capaz de absorver e acumular altas concentrações de As^{III} , no entanto, sob concentrações mais elevadas deste poluente, o metabolismo da planta é consideravelmente afetado, interferindo na sua capacidade de tolerar o estresse e limitando o seu uso na fitorremediação de ambientes em que o As^{III} encontra-se em altas concentrações.

ABSTRACT

CAMPOS, Fernanda Vidal de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2014. The response of antioxidative metabolism of *Pistia stratiotes* L. (Araceae) subjected to arsenite. Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisor: José Cambraia.

Pistia stratiotes plants were subjected to different concentrations of arsenite (As^{III}) in order to assess the intensity of oxidative stress generated by this metalloid and antioxidant responses involved in tolerance in this species. After acclimatization (5 days) in Clark nutrient solution $\frac{1}{4}$ ionic strength and pH 6.5, the plants were exposed to four treatments: control (nutrient solution), 5, 10 and 20 μM of As^{III} , where remained for 24 hours to biochemical analyzes, and 4 days for arsenic (As) absorption analysis, visual symptoms and relative growth rate (RGR). Plants of *P. stratiotes* accumulated high concentrations of As, however, most of this element was retained in roots giving a low translocation factor. The presence of As promoted toxicity symptoms and changes in physiological and biochemical parameters, as evidenced by severe chlorosis, root loss, TCR reduction, reactive oxygen species (ROS) increase, membrane damages, changes in antioxidant enzymes activity and glutathione content. The results showed that plants of *P. stratiotes* exposed to lowest concentration of As^{III} (5 μM) are tolerant to the metalloid, due to efficient performance of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. However, exposure to higher As^{III} concentration resulted in impairment of defense mechanisms, particularly in roots, due to the high accumulation of As in this organ. In this sense, the mechanism of As^{III} toxicity involves increased ROS generation and, in parallel, inhibition of antioxidant mechanisms, resulting in high incidence of oxidative stress. Thus, it can be concluded that *P. stratiotes* is able to absorb and accumulate high concentrations of As^{III} , however, under higher concentrations of this pollutant, plant metabolism is greatly affected, impacting their ability to tolerate stress

and limiting their use in phytoremediation of environments where As^{III} found in high concentrations.

1- INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um metaloide presente naturalmente no ambiente e sua mobilização ocorre por meio de processos geológicos, tais como, intemperismo de rochas e atividades vulcânicas, bem como por meio de atividades antrópicas, incluindo a mineração, atividades agrícolas, processos industriais e queima de combustíveis fósseis (WHO, 2001; Zhao et al., 2010; Hughes et al., 2011).

O As é tóxico para animais, plantas e seres humanos (Wang et al., 2010), havendo grande risco para saúde pública nas regiões em que este metaloide encontra-se em altas concentrações, devido a possibilidade de entrada na cadeia alimentar. Estudos têm demonstrado que a ingestão de água contaminada e o consumo de alimentos irrigados com água contendo As, são as principais vias de contaminação por este metaloide (Kile et al., 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) com base em evidências toxicológicas associadas à exposição ao As, admite que a concentração máxima deste metaloide em água potável é de 0,01 mg/L (WHO, 2001). Entretanto, o uso crescente de espécies inorgânicas de As nas indústrias e atividades agrícolas (Ozturk et al., 2010), bem como a expansão da atividade mineradora, têm contribuído para aumento na quantidade deste contaminante na água e nos alimentos.

No Brasil, elevadas concentrações de As são encontradas na região do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, devido à histórica atividade de mineração nesta região, onde já foi detectada concentração de 2980 µg/L de As total na água, apresentando valor superior ao permitido para o consumo humano (Borba et al., 2004).

As formas químicas predominantes e mais tóxicas do As nos ecossistemas são o arsenato (As^{V}) e arsenito (As^{III}) (Rivas, 2010; Mathews et al., 2011; Wang et al., 2011),

as quais podem ser interconversíveis, dependendo do estado redox do ecossistema aquático (Ozturk et al., 2010).

Resultados experimentais indicam que o As^{III} é mais tóxico que o As^{V} (Carvalho et al., 2004), o que se deve à elevada afinidade deste metaloide por grupos sulfidrilas de biomoléculas, resultando em efeitos negativos na sua função (Zhao et al., 2010; Flora, 2011).

Embora o As não seja um metal redox, há muitos estudos que demonstram que a exposição de plantas a este metaloide resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como, ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), os quais causam sérios danos às estruturas celulares, principalmente, às biomoléculas (Garg & Singla, 2011; Hasanuzzaman & Fujita, 2012; Sharma et al., 2012b).

Os danos oxidativos desencadeados pelo aumento das ROS incluem peroxidação lipídica, inibição enzimática, quebras no DNA ou mutações que podem comprometer a viabilidade celular (Mishra et al., 2011; Sandalio et al., 2012). A peroxidação de ácidos graxos insaturados desencadeia alterações na permeabilidade e flexibilidade das membranas celulares, além de promover alterações nos mecanismos de tolerância das plantas (Singh et al., 2007; Nascimento et al., 2011).

Com a finalidade de proteger as células e estruturas subcelulares dos efeitos tóxicos das ROS, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Gunes et al., 2009; Mishra et al., 2011).

Os mecanismos antioxidantes enzimáticos das plantas compreende, principalmente, a ação das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e as peroxidases totais (POX). A SOD atua como a primeira linha de defesa na célula, dismutando o $\text{O}_2^{\cdot-}$ ao H_2O_2 , que é um composto menos reativo. O H_2O_2 por sua vez,

pode ser catalizado pela enzima CAT, que atua convertendo-o em H₂O e O₂, ou pela POX que é responsável pela modulação fina do H₂O₂, removendo-o quando este se encontra em baixas concentrações (Sharma et al., 2012a, b).

As POXs que utilizam a glutathione como doador de elétrons, são chamadas de peroxidases da glutathione (GPX), enquanto aquelas que utilizam o ascorbato como doador de elétrons são chamadas de peroxidase do ascorbato (APX) (Sharma et al., 2012b). A APX juntamente com a enzima redutase da glutathione (GR) atuam no Ciclo Ascorbato-Glutathione (Ciclo AsA-GSH) que constitui um mecanismo de defesa essencial para as plantas na eliminação de H₂O₂ no cloroplasto, local de ausência da enzima CAT, evitando assim danos às enzimas no Ciclo de Calvin (Tanaka et al., 1982; Sharma, 2012a). Além de atuar na eliminação das ROS, o Ciclo AsA-GSH mantém em níveis adequados o teor de AsA e GSH, ajustando assim, o potencial redox celular (Potters et al., 2010).

Diversas substâncias, como a glutathione, ascorbato, α -tocoferol, flavonóides, antocianinas, carotenoides e ácidos orgânicos, fazem parte do mecanismo antioxidante para a remoção das ROS (Gill & Tuteja, 2010; Sytar et al., 2013). A glutathione é considerada uma molécula chave para a sobrevivência das plantas, desempenhando funções de sinalização celular, proteção a grupos tios de enzimas e síntese de fitoquelatinas (Noctor et al., 2012; Jozefczak et al., 2012), além de ser essencial para a atividade das enzimas peroxidase da glutathione (GPX) e sulfotransferase da glutathione (GST), as quais atuam diretamente na remoção de substâncias tóxicas celulares (Gill & Tuteja, 2010; Ghelfi et al., 2011).

O As^{III} além de ser considerado a espécie de As mais tóxica, predomina como uma espécie molecular neutra, com baixa reatividade química, sendo sua remoção de

ambientes aquáticos muito mais difícil, necessitando de tratamentos mais específicos (Wang et al., 2011).

Uma técnica ecologicamente benéfica e de baixo custo que tem sido muito utilizada para a remoção de As em sistemas aquáticos é a fitorremediação. Esta técnica consiste na utilização de plantas para remover ou tornar o As menos tóxico no ambiente (Vithanage et al., 2012). Assim, para evitar riscos de contaminação ambiental, após o tratamento, estas plantas podem ser incineradas e posteriormente depositadas em locais seguros, como aterros sanitários.

O interesse no uso da técnica de fitorremediação tornou-se maior com a descoberta de plantas hiperacumuladoras, capazes de acumular, translocar e tolerar elevadas concentrações do elemento tóxico (Rahman & Hasegawa, 2011). Algumas plantas aquáticas têm demonstrando capacidade de acumular altas concentrações de As, quando expostas a ambientes contaminados por este metaloide, tais como a *Hydrilla verticillata* (Xue & Yan, 2011); *Eleocharis acicularis* (Ha et al., 2011); *Eichhornia crassipes* (Mishra et al., 2008; Giri & Patel, 2012); *Arundo donax* (Mirza et al., 2011); *Salvinia molesta* (Yanuwiadi & Polii, 2013); *Pistia stratiotes* (Farnese et al., 2013) e *Lemna minor* (Goswami et al., 2014; Rofkar et al., 2014). Sugerindo que estas espécies possam ser potencialmente úteis em programas de fitorremediação do As.

A espécie *Pistia stratiotes*, também chamada popularmente de alface d'água, é uma macrófita flutuante livre, que constitui a única espécie do gênero *Pistia*, pertencente a família Araceae (Rahman & Hasegawa, 2011). Muitos estudos têm demonstrando que esta espécie é potencialmente útil na acumulação de compostos tóxicos presentes na água. Segundo Lu et al. (2011), *P. stratiotes* é uma planta hiperacumuladora de Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, e Zn, sendo útil na fitorremediação destes elementos. Entretanto, o

papel desta espécie na fitorremediação de As não foi extensivamente estudado (Rahman & Hasegawa, 2011).

Um critério essencial avaliado na seleção de plantas para programas de fitorremediação, dentre outros critérios, é a tolerância da espécie vegetal ao poluente em questão. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel dos mecanismos de defesa enzimáticos e o papel da rota metabólica da glutathione na tolerância de *P. stratiotes* ao As^{III} , possibilitando o fornecimento de subsídios para possível indicação desta planta em programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por este metaloide.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Obtenção, aclimação e aplicação dos tratamentos

Macrófitas aquáticas da espécie *Pistia stratiotes* L. coletadas no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa, MG, com aproximadamente 5 g de massa fresca, foram lavadas por 1 minuto em água corrente e mantidas por 24 horas em água desmineralizada. A aclimação em condições experimentais foi feita com a transferência das plantas para recipientes de polietileno (10 plantas/recipiente) contendo 8 L de solução nutritiva de Clark ¼ força iônica (Clark, 1975), pH 6,5, e colocadas em sala de crescimento de plantas com condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), irradiância ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo luminoso de 16 horas, onde permaneceram por 5 dias. Após este período, as plantas mantidas em solução nutritiva foram expostas aos tratamentos contendo 0, 5, 10 e 20 μM de As^{III} , na forma de arsenito de sódio (NaAsO_2).

Para avaliação da sintomatologia de toxidez, da absorção do As e dos efeitos sobre a taxa de crescimento relativo, os tratamentos tiveram duração de 4 dias e, para as demais análises, 24 horas.

2.2- Determinação do teor de arsênio e fator de translocação (FT)

Ao final do período experimental de 4 dias as plantas foram coletadas, lavadas em água desionizada por 1 minuto e secas em estufa convencional a 80 °C. Seguiu-se a mineralização úmida com 3 mL de uma mistura nitro-perclórica 2:1, à temperatura de 100-120 °C, para evitar a volatilização do As, até a completa oxidação da matéria orgânica (Marin et al., 1993). Em seguida, as soluções foram diluídas em 10 mL de água desionizada e analisadas em espectrofotômetro de emissão em plasma (modelo ICP-OPTIMA 8300, Perkin Elmer).

O fator de translocação (FT) foi calculado através da equação: $FT = C_F/C_R$, em que: C_F = Concentração de As nas folhas, em $mg\ g^{-1}\ MS$; C_R = Concentração de As nas raízes, em $mg\ g^{-1}\ MS$.

2.3- Sintomatologia visual das plantas expostas ao arsenito

O registro fotográfico da sintomatologia visual de toxidez do As foi realizado ao final do período de tratamento utilizando-se câmara digital (Canon Powershot SX30IS).

2.4- Determinação da taxa de crescimento relativo (TCR)

A taxa de crescimento relativo das plantas foi calculada utilizando-se a equação proposta por Hunt (1978): $TCR = (\ln_{MS1} - \ln_{MS0}) \times 1000 / (t_1 - t_0)$ em que: TCR = taxa de crescimento relativo, em termos de massa seca (MS), no período experimental ($mg\ g^{-1}\ dia^{-1}$); \ln_{MS1} e \ln_{MS0} = logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente; $t_1 - t_0$ = duração do experimento (em dias).

2.5- Determinação da concentração de espécies reativas de oxigênio

Para determinação da concentração de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) amostras de 0,05 g de raízes e de folhas foram incubadas em um meio de extração constituído de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100,0 μM , β -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20,0 μM e tampão fosfato de sódio 20,0 mM, pH 7,8 (Mohammadi & Karr, 2001). A reação foi iniciada pela introdução de 100,0 μL de epinefrina 25,2 mM em ácido clorídrico 0,1 N, utilizando seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28 °C, sob agitação, por 5 minutos, seguida de leitura da absorvância em comprimento de onda de 480 nm, durante 5 minutos em espectrofotômetro UV/visível modelo Cary 100 (Varian, Austrália). A produção de $O_2^{\cdot-}$ foi avaliada pela determinação do adenocromo acumulado, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (Boveris et al., 2002).

Para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), amostras de 0,2 g de raízes e de folhas foram homogeneizadas em meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50,0 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1,0 mM, e centrifugadas a 10.000 xg , por 15 minutos, à temperatura de 4 °C (Kuo & Kao, 2003). Alíquotas de 50 μL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 100,0 μM , ácido sulfúrico 25,0 mM, laranja de xilenol 250,0 μM e sorbitol 100,0 mM (Gay & Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorvância determinada a 560 nm em espectrofotômetro UV/visível Hitachi, modelo U-5100. As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 .

2.6- Avaliação da integridade da membrana

2.6.1- Determinação da peroxidação lipídica

Amostras de 0,16 g de folhas e de raízes foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), seguido de filtração através de quatro camadas de gaze e centrifugação a 10.000 xg por 15 minutos, a 4 °C. A uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Em outra alíquota de mesmo volume foi adicionada 1,5 mL de solução de TCA 20% sem TBA. Os tubos contendo as amostras e o meio de reação foram fechados e incubados em banho-maria, à temperatura de 95 °C, por 2 horas. Em seguida, a reação foi paralisada em banho de gelo, por 10 minutos. Posteriormente foi centrifugada a 3.000 xg , por 10 minutos, a 4 °C. A absorvância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro UV/visível Hitachi, modelo U-5100, utilizando o comprimento de onda de 532 nm. A absorvância inespecífica foi determinada a 600 nm e 400 nm e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi obtida mediante utilização do

coeficiente de absorvidade molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hodges et al., 1999), sendo os resultados expressos em nmol g^{-1} de massa fresca.

2.6.2- Determinação do extravasamento de eletrólitos

A avaliação do extravasamento de eletrólitos foi realizada segundo adaptação das metodologias descritas por Vasquez-Tello et al. (1990) e Pimentel et al. (2002). Aproximadamente 0,2 g de raízes e folhas de *P. stratiotes* foram coletados, lavados por 3 vezes em água desionizada e depois transferidos para frascos de vidro contendo 10 mL de água purificada por osmose reversa, onde permaneceram imersos por 6 horas.

Após este período mediu-se a condutividade livre (*CL*, $\mu\text{S/cm}$), utilizando-se um condutivímetro de bancada (Tecnal, modelo Tec-4MP). Posteriormente, os mesmos frascos foram colocados em estufa a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora e após resfriamento foi obtida a condutividade total (*CT*, $\mu\text{S/cm}$). Para evitar erro nos resultados, o sensor do condutivímetro foi lavado entre cada leitura com água desionizada. Com os resultados obtidos, calculou-se a taxa de liberação de eletrólitos, dada em porcentagem, por meio da seguinte fórmula: $\text{TLE} = (\text{CL}/\text{CT}) \times 100$, em que TLE= Taxa de liberação de eletrólitos; CL = condutividade livre e CT = condutividade total.

2.7- Avaliação do sistema antioxidante enzimático

2.7.1- Obtenção dos extratos enzimáticos

Amostras de 0,3 g de folhas e de raízes foram maceradas utilizando nitrogênio líquido e 2,0 mL do meio de extração, que variou conforme a enzima. Para as enzimas CAT, POX e SOD o meio de extração foi constituído de tampão fosfato de potássio 0,10 M, pH 6,8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,10 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1,0 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Para a APX, tampão fosfato de potássio 50,0 mM, pH 7,0; ascorbato 1,0 mM e EDTA 1,0 mM (Nakano e Asada, 1981).

O extrato obtido na maceração foi centrifugado a 12.000 *xg*, por 15 minutos em temperatura de 4 °C e o sobrenadante foi utilizado na avaliação da atividade das enzimas, utilizando espectrofotômetro UV-visível modelo Cary 100 (Varian, Austrália).

2.7.2- Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático a 5 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50,0 mM, pH 7,8, contendo metionina 13,0 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75,0 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2,0 µM. A reação foi conduzida à temperatura de 25 °C, em uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e determinada a absorvância a 560 nm, da formazana azul produzida pela fotorredução do NBT. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolis & Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

2.7.3- Determinação da atividade da catalase (CAT, EC1.11.1.6)

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 50,0 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir & Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm, à temperatura de 25 °C. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e expresso em µmol de H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

2.7.4- Determinação da atividade das peroxidases (POX, EC1.11.1.7)

A atividade das peroxidases foi determinada pela adição de 200 µL do extrato enzimático bruto a 4,8 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25,0 mM, pH 6,8, pirogalol 20,0 mM e H₂O₂ 20,0 mM (Kar & Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento na absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm e temperatura de 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955) e expressa em µmol de H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

2.7.5- Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada pela adição de 200 µL do extrato enzimático bruto a 2,8 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50,0 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1,0 mM (Nakano & Asada, 1981, modificado por Koshiba, 1993). O decréscimo na absorvância a 290 nm e à temperatura de 25°C foi medido durante o primeiro minuto da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano & Asada, 1981) e expressa em µmol de ácido ascórbico (AA) min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

2.8- Avaliação do metabolismo da glutathiona

2.8.1- Determinação da concentração de glutathiona total (GSH + GSSG)

Amostras de 0,3 g de raízes e de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, seguido da adição de 2 mL de meio de homogeneização constituído de HCl 0,1 M contendo EDTA 1,0 mM (Anderson, 1985). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos, à temperatura de 4 °C. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram adicionados a 200 µL de tampão fosfato de sódio 125,0 mM, contendo EDTA 6,3 mM, pH 7,5, 500 µL de NADPH 0,3 mM e 100 µL de DTNB [ácido 5,5'- ditio-bis (2-

nitrobenzóico)] 6,0 mM. Após incubação a 30 °C, por 5 minutos, foram adicionados 10 µL de redutase da glutatona (50 U mL⁻¹) e a absorvância foi determinada a 412 nm durante 1 minuto, utilizando espectrofotômetro UV/visível modelo Cary 100 (Varian, Austrália). A concentração de glutatona foi determinada por meio de curva de calibração e os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ massa fresca.

2.8.2- Determinação da atividade da sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS, EC 6.3.2.2)

Amostras de 0,3 g de folhas e de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M e EDTA 5,0 mM, pH 8,0. O homogeneizado foi centrifugado a 30.000 *xg* por 10 minutos, à temperatura de 4 °C, e foram adicionados 100 µL do sobrenadante a 0,9 mL de um meio de reação contendo 10,0 µM de glutamato de sódio, 10,0 µM de L-aminobutirato, 2,0 µM de EDTA, 0,2 mg de BSA, 20,0 µM de MgCl₂, 5,0 µM do sal dissódico de ATP e 100,0 µM de tampão Tris-HCl, pH 8,2. A mistura foi incubada em banho-maria, a 37 °C, durante 30 min e, então, a reação foi paralisada pela adição de 100 µL de TCA 50 % (p/v) (Ruegsegger & Brunold, 1992). A mistura foi centrifugada a 10.000 *xg* por 10 minutos e o teor de fosfato inorgânico no sobrenadante foi determinado pelo método do fosfo-molibdato (Lindeman, 1958). O resultado foi expresso em nmol min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

2.8.3- Determinação da atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7)

Amostras de 0,3 g de folhas e de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de homogeneização constituído de tampão de fosfato de potássio 0,1 mM, pH 7,0, EDTA 1,0 mM, ditioneitol (DTT) 2,0 mM, PMSF 1,0 mM e PVPP 1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 *xg* por 15 minutos, a 4° C, e 100 µL do sobrenadante, considerado extrato enzimático, foram

adicionados a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1,0 mM, GSSG 1,0 mM e NADPH 0,1 mM (em tampão TRIS-HCl 0,5 mM, pH 7,5), segundo Carlberg & Mannervik (1985). O decréscimo na absorvância foi determinado no primeiro minuto de reação, em espectrofotômetro, a 340 nm e temperatura de 30 °C. A atividade enzimática foi calculada através do coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Foyer & Halliwell, 1976) e o resultado expresso em nmol min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

2.8.4- Determinação da atividade da peroxidase da glutathiona (GPX, EC 1.11.1.9)

Amostras de 0,3 g de folhas e raízes foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1,0 mM e MgCl₂ 10,0 mM (Nagalakshmi & Prasad, 2001). O homogeneizado foi centrifugado a 30.000 *xg* por 10 minutos, a 4° C, e 100 µL do sobrenadante foram adicionados a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50,0 mM, pH 7,0, EDTA 1,0 mM, NaCl 0,114 M, GSH 1,0 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutathiona (Nagalakshmi & Prasad, 2001). O decréscimo na absorvância a 340 nm e a temperatura de 30 °C, foi medido no primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Anderson & Davis, 2004) e o resultado expresso em nmol min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

2.8.5- Determinação da atividade da sulfotransferase da glutathiona (GST, EC 2.5.1.18)

Amostras de 0,3 g de folhas e raízes foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8, EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM, PMSF 0,1 mM e PVPP 5 % (p/v) (Habig et al., 1974). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 *xg* por 15

minutos, à temperatura de 4 °C, e 100 µL do sobrenadante foram adicionados a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, glutathiona reduzida 20,0 mM e 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1 M (Nagalakshmi & Prasad, 2001). O aumento na absorvância a 340 nm foi medido no primeiro minuto de reação à temperatura de 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em nmol min⁻¹g⁻¹ massa fresca.

2.9- Delineamento experimental e análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos no delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída de uma planta. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no programa SISVAR desenvolvido por Ferreira (1999).

3- RESULTADOS

3.1- Teor de As e fator de translocação (FT)

Nas raízes, o teor de As acumulado aumentou até a concentração de 10 μM de As^{III} . No entanto, plantas expostas à maior concentração do metaloide, apresentaram redução no acúmulo deste elemento, observando valores similares ao encontrado em plantas expostas à concentração de 5 μM . Nas folhas o teor de As aumentou com o incremento do metaloide na solução nutritiva, sendo este aumento de, aproximadamente, 77, 91 e 94 % nas doses de 5, 10 e 20 μM de As^{III} , respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Teor de arsênio em raízes e folhas de *P. stratiotes* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após quatro dias.

Tratamentos (μM de As^{III})	Teor de arsênio ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	
	Raízes	Folhas
0	4,65 \pm 0,48 c	2,81 \pm 0,36 d
5	656,55 \pm 5,72 b	12,45 \pm 0,32 c
10	1120,40 \pm 1,96 a	31,60 \pm 2,98 b
20	775,76 \pm 54,34 b	46,74 \pm 3,02 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Plantas de *P. stratiotes* foram capazes de absorver e acumular quantidades elevadas de As em seus tecidos. O teor deste metaloide foi maior nas raízes, indicando que esta planta transloca pouco As para a parte aérea apresentando, dessa maneira, baixo FT ($\text{FT} < 1$), entretanto, o valor de FT aumentou significativamente na maior concentração analisada (Tabela 2).

Tabela 2. Fator de translocação em plantas de *P. stratiotes* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} após quatro dias.

Tratamentos (μM de As ^{III})	Fator de translocação (FT)
0	-
5	0,018 \pm 0,0006 b
10	0,027 \pm 0,0045 b
20	0,060 \pm 0,0130 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.2- Sintomatologia visual

Após quatro dias de exposição ao As^{III}, plantas de *P. stratiotes* apresentaram sintomas visíveis de toxidez que variaram conforme a concentração do metaloide na solução nutritiva. Plantas submetidas ao tratamento contendo 5 μM de As^{III} não apresentaram sintomas visuais de toxidez, mantendo aspecto similar ao controle (Figura 1). No entanto, a exposição à concentração de 10 μM resultou no surgimento de manchas cloróticas, sendo estas mais pronunciadas nas margens das folhas externas à roseta (folhas mais velhas). A intensificação da clorose foi evidente em plantas expostas à concentração mais elevada de As^{III}, em que foi observado o amarelecimento por quase toda extensão das folhas mais velhas e o surgimento de manchas cloróticas também nas folhas internas, mais jovens (Figura 1).

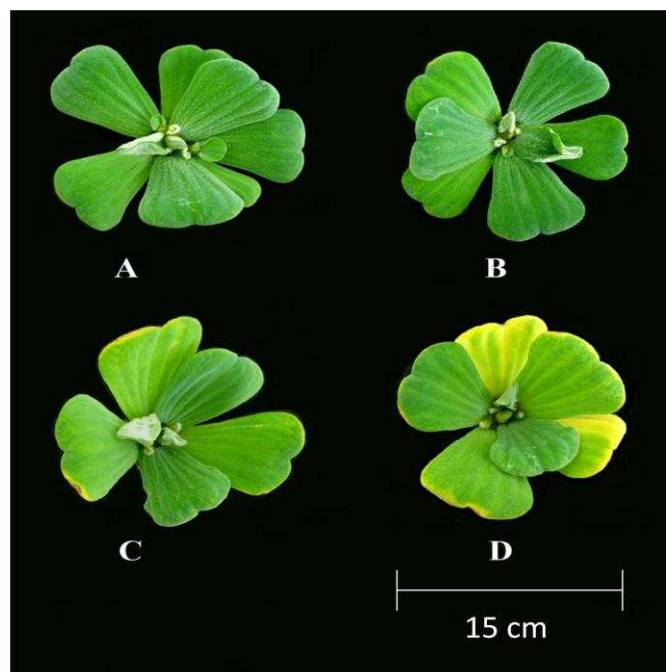


Figura 1. Sintomatologia visual de folhas de *P. stratiotes* expostas às diferentes concentrações de As^{III} , após quatro dias. Controle (A), $5 \mu\text{M}$ de As^{III} (B), $10 \mu\text{M}$ de As^{III} (C) e $20 \mu\text{M}$ de As^{III} (D).

Nas raízes os sintomas de toxidez foram evidenciados pela redução pronunciada do volume radicular, principalmente, em plantas expostas à concentração de $20 \mu\text{M}$ de As^{III} , em que observou-se também escurecimento deste órgão (Figura 2).

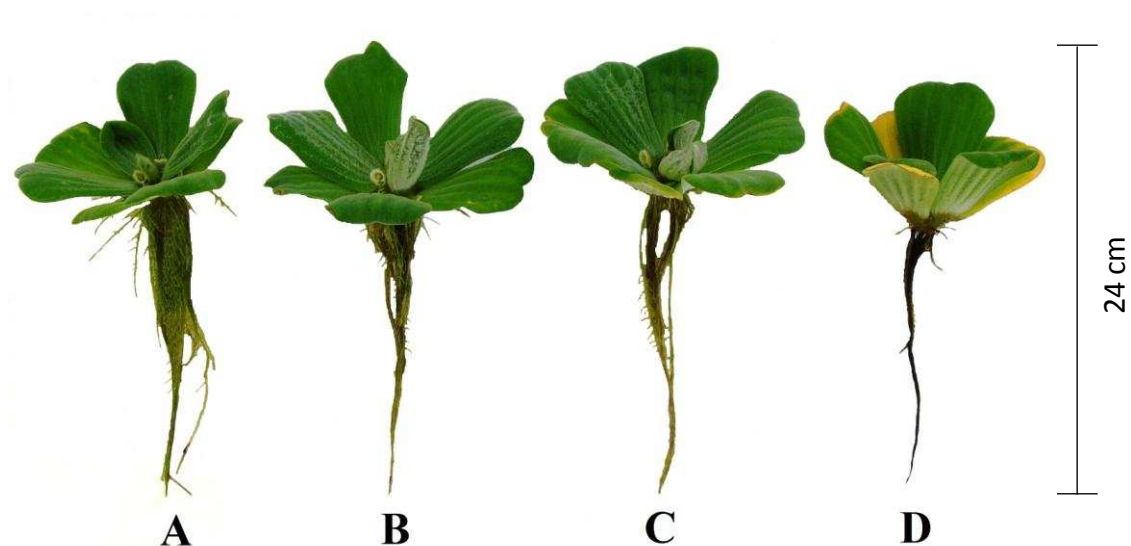


Figura 2. Sintomatologia visual das raízes de *P. stratiotes* expostas a diferentes concentrações de As^{III} , após quatro dias. Controle (A), $5 \mu\text{M}$ de As^{III} (B), $10 \mu\text{M}$ de As^{III} (C) e $20 \mu\text{M}$ de As^{III} (D).

3.3- Taxa de crescimento relativo (TCR)

Em plantas de *P. stratiotes* a exposição à concentração de 5 μM de As^{III} foi suficiente para ocasionar redução significativa na TCR, entretanto, esta redução foi mais pronunciada em plantas expostas às concentrações mais elevadas do metaloide. Na concentração de 10 μM de As^{III} observou-se redução de aproximadamente 50% na TCR e, a exposição à maior concentração do metaloide promoveu efeito negativo no crescimento da planta, em decorrência, principalmente, da queda elevada de raízes nesta concentração (Figura 3).

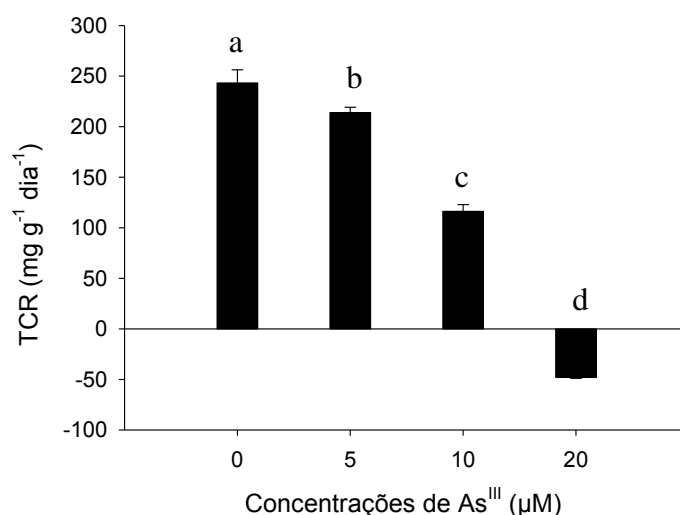


Figura 3. Taxa de crescimento relativo (TCR) em plantas de *P. stratiotes* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após quatro dias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.4- Teor de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A exposição de *P. stratiotes* ao As^{III} resultou em aumento significativo no teor de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nas raízes e nas folhas. Plantas submetidas às concentrações de 5, 10 e 20 μM de As^{III} , apresentaram incremento no teor de $\text{O}_2^{\cdot-}$ nas raízes em aproximadamente 24, 67 e 71 % e nas folhas em 58, 58,5 e 68 %, respectivamente (Figura 4A).

Paralelamente a geração de $O_2^{\cdot-}$, ocorreu aumento nos teores de H_2O_2 em raízes de plantas expostas ao As^{III} . No entanto, este aumento só foi observado nas concentrações de 10 e 20 μM , em que os incrementos nos níveis de H_2O_2 foram de aproximadamente 12 e 25 %, respectivamente. Nas folhas, entretanto, a presença do As^{III} resultou em reduções nas concentrações de H_2O_2 mas, ainda assim, os valores foram maiores do que aqueles observados nas raízes (Figura 4B).

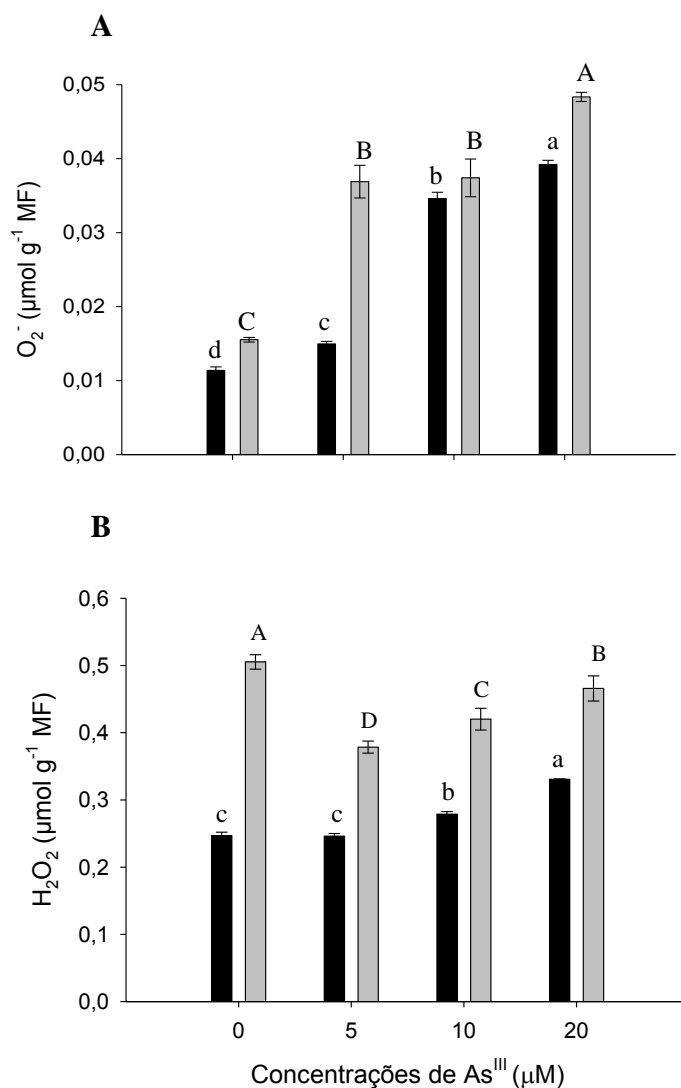


Figura 4. Teor de espécies reativas de oxigênio: ânion superóxido (A) e peróxido de hidrogênio (B) em raízes (■) e em folhas (□) de *P. stratiotes* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.5- Integridade da membrana

As plantas expostas à concentração de 5 μM de As^{III} mantiveram os indicadores de integridade de membranas semelhantes às plantas controle. Nas concentrações subsequentes, entretanto, as concentrações de malonaldeído (MDA) aumentaram significativamente, tanto nas raízes como nas folhas (Figura 5A).

O aumento na peroxidação lipídica, indicado pela concentração de MDA, se configurou em dano mensurável da integridade das membranas, avaliado por meio do extravasamento de eletrólitos, apenas na concentração de 20 μM de As^{III} (Figura 5B).

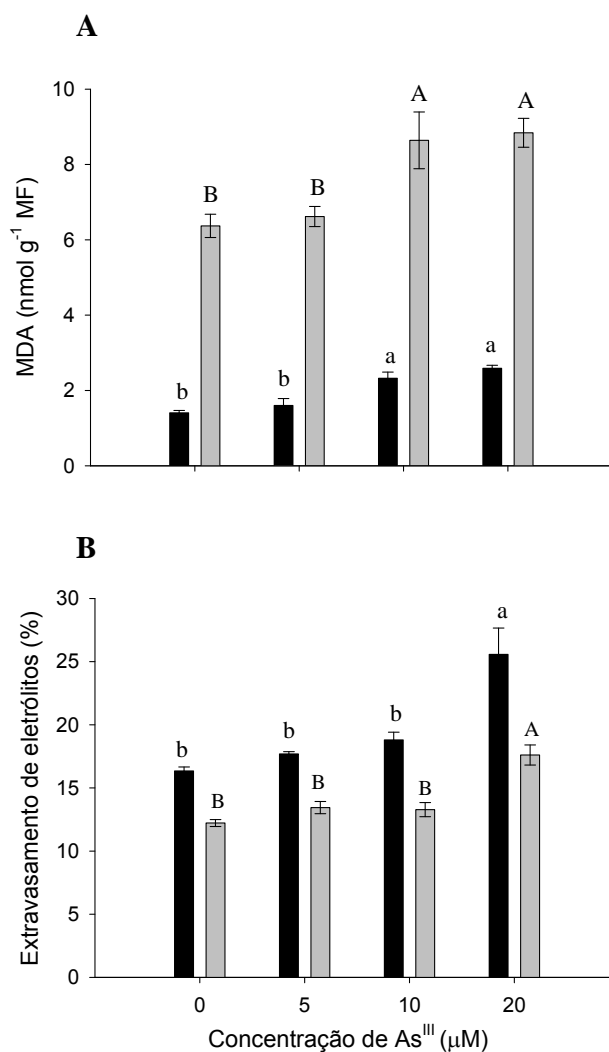


Figura 5. Concentração de malonaldeído (A) e extravasamento de eletrólitos (B) em raízes (■) e folhas (□) de *P. stratiotes* submetida às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.6- Atividade das enzimas antioxidantes: dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POX) e peroxidase do ascorbato (APX)

Nas raízes e nas folhas de *P. stratiotes*, a atividade da SOD aumentou a partir da concentração de 5 μM de As^{III} , apresentando valores similares aos encontrados em plantas expostas ao dobro desta concentração. Nas raízes de plantas expostas à concentração mais elevada do metaloide, a atividade enzimática foi cerca de duas vezes superior ao observado no controle, e nas folhas este incremento foi de aproximadamente quatro vezes. Além disso, observou-se maior atividade da SOD nas raízes (Figura 6A).

A atividade da CAT, em raízes, apresentou aumento de aproximadamente 63 % na concentração de 5 μM de As^{III} , no entanto, nas maiores concentrações do metaloide, a atividade desta enzima não variou em relação ao controle. Esses resultados diferem dos observados para folha, em que ocorreu aumento na atividade da CAT em todos os tratamentos, não ocorrendo, entretanto, variação significativa entre eles (Figura 6B).

A atividade da POX nas raízes apresentou resposta similar ao observado para a CAT. Nas folhas, entretanto, o incremento de As^{III} na solução nutritiva promoveu aumento na atividade desta enzima em aproximadamente três vezes ao observado no controle, nas concentrações de 5 e 10 μM de As^{III} , e em quatro vezes na maior concentração do metaloide (Figura 6C).

Em raízes de *P. stratiotes* a atividade da enzima APX aumentou com o incremento das concentrações de As^{III} na solução nutritiva. Nas folhas, o aumento na atividade desta enzima foi observado até a concentração de 10 μM de As^{III} , ocorrendo na maior concentração do metaloide atividade enzimática 22% menor ao observado no tratamento anterior (Figura 6D).

De maneira geral, as enzimas eliminadoras de H_2O_2 (CAT, POX e APX) apresentaram maior atividade enzimática nas folhas de *P. stratiotes* (Figura 6B, C e D).

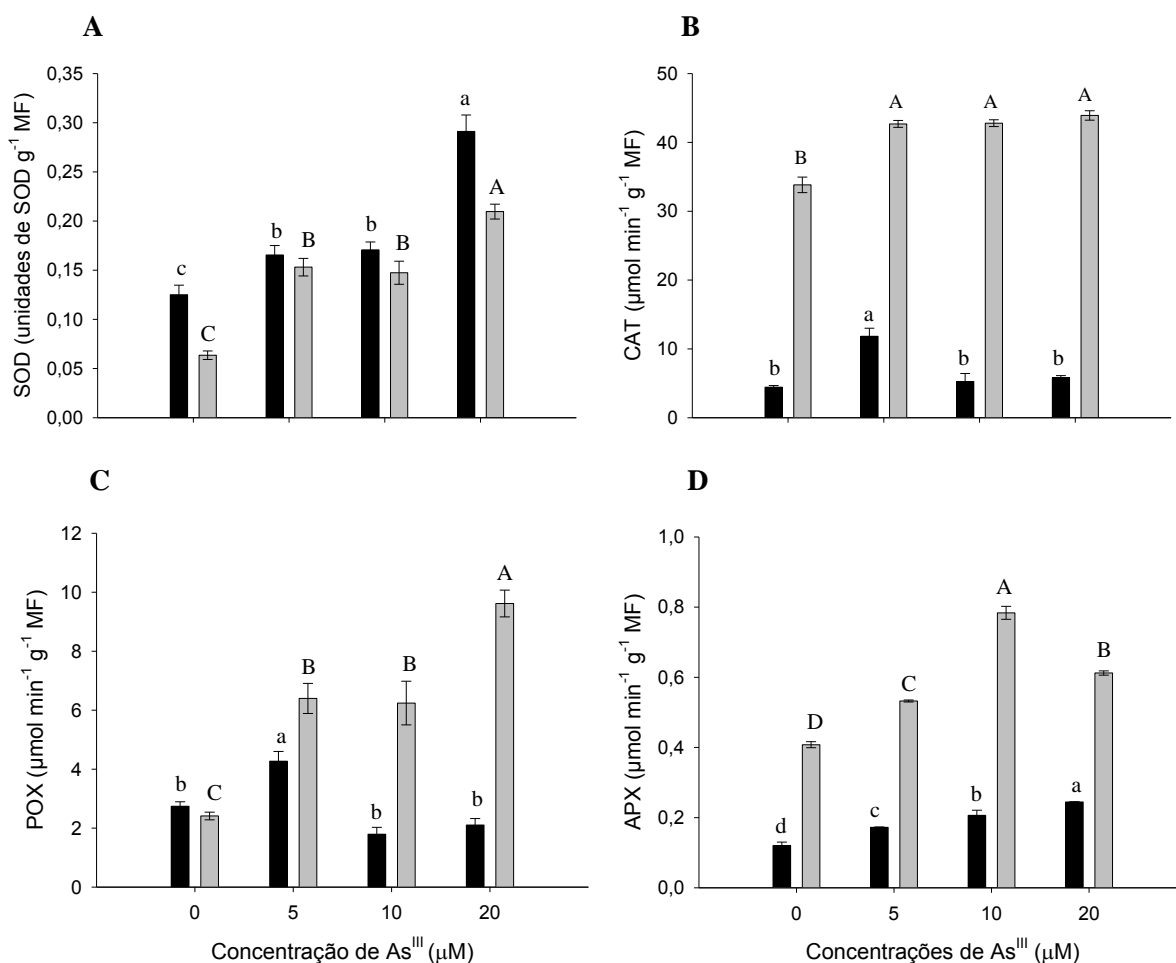


Figura 6. Atividade das enzimas antioxidantes: SOD: dismutase do superóxido (A), CAT: catalase (B), POX: peroxidases (C) e APX: peroxidase do ascorbato (D) em raízes (■) e folhas (□) de *P. stratiotes* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.7- Metabolismo da Glutaciona

3.7.1- Teor de Glutaciona total (GSH+GSSG)

A exposição ao As^{III} alterou significativamente os níveis de glutaciona total nas raízes e nas folhas de *P. stratiotes*. Nas raízes, incrementos de 37 e 55 % ocorreram nas concentrações de 5 e 10 μM de As^{III} e, nas folhas, esses aumentos foram de 33 e 60 % . No entanto, em plantas expostas à maior concentração do metaloide os teores de glutaciona totais apresentaram valores inferiores àqueles observados na concentração de

10 μM de As^{III} . Independente do tratamento, os teores de glutathiona total foram sempre maiores nas folhas (Figura 7).

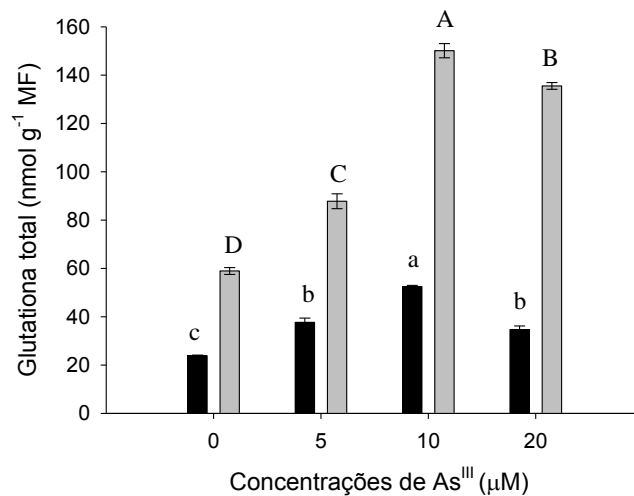


Figura 7. Teor de glutathiona total em raízes (■) e folhas (□) de *P. stratiotes* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.7.2- Atividade das enzimas: sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS), redutase da glutathiona (GR), peroxidase da glutathiona (GPX) e sulfotransferase da glutathiona (GST)

Nas raízes de *P. stratiotes* a atividade da enzima γ -GCS apresentou aumento de aproximadamente 11 e 13 %, nas concentrações de 10 e 20 μM de As^{III} , respectivamente. Nas folhas, entretanto, o incremento na atividade enzimática foi superior ao observado em raízes, sendo este de aproximadamente 21 % nas concentrações de 5 e 10 μM de As^{III} e, de 30 % na maior concentração do metaloide (Figura 8A).

A atividade da GR nas raízes aumentou aproximadamente 16 e 31 % nas concentrações de 5 e 10 μM de As^{III} , respectivamente. No entanto, na maior concentração do metaloide esse aumento não foi verificado, permanecendo com valores semelhantes ao controle. Nas folhas a atividade enzimática teve desempenho similar ao

observado nas raízes, com incremento na atividade da GR de aproximadamente 28 % nas concentrações de 5 e 10 μM e na maior concentração do metaloide foi observada atividade 40 % menor ao observado na concentração anterior (Figura 8B).

A exposição ao As^{III} resultou em incremento na atividade da enzima GPX em raízes, apresentando na maior concentração do metaloide o dobro da atividade observada no controle. Nas folhas, entretanto, observou-se aumento na atividade enzimática de aproximadamente 37 % na concentração de 5 μM de As^{III} e nas maiores concentrações analisadas, apesar de ter ocorrido incremento na atividade enzimática comparado ao controle, foi observada menor atividade da GPX em relação a concentração de 5 μM (Figura 8C).

A atividade da GST em raízes aumentou em plantas expostas à concentração de 5 μM As^{III} , sendo este aumento de aproximadamente 40 %. Entretanto, nas maiores concentrações do metaloide observou-se atividade enzimática similar ao controle. Nas folhas a atividade da GST aumentou, aproximadamente, 13 e 26 % nas doses de 5 e 10 μM , respectivamente, mas similar ao encontrado para raízes, a atividade enzimática não variou significativamente ao controle, na maior concentração no metaloide (Figura 8D).

De modo geral, a atividade das enzimas envolvidas no metalolismo da glutathione foi superior em folhas de *P. stratiotes* (Figura 8).

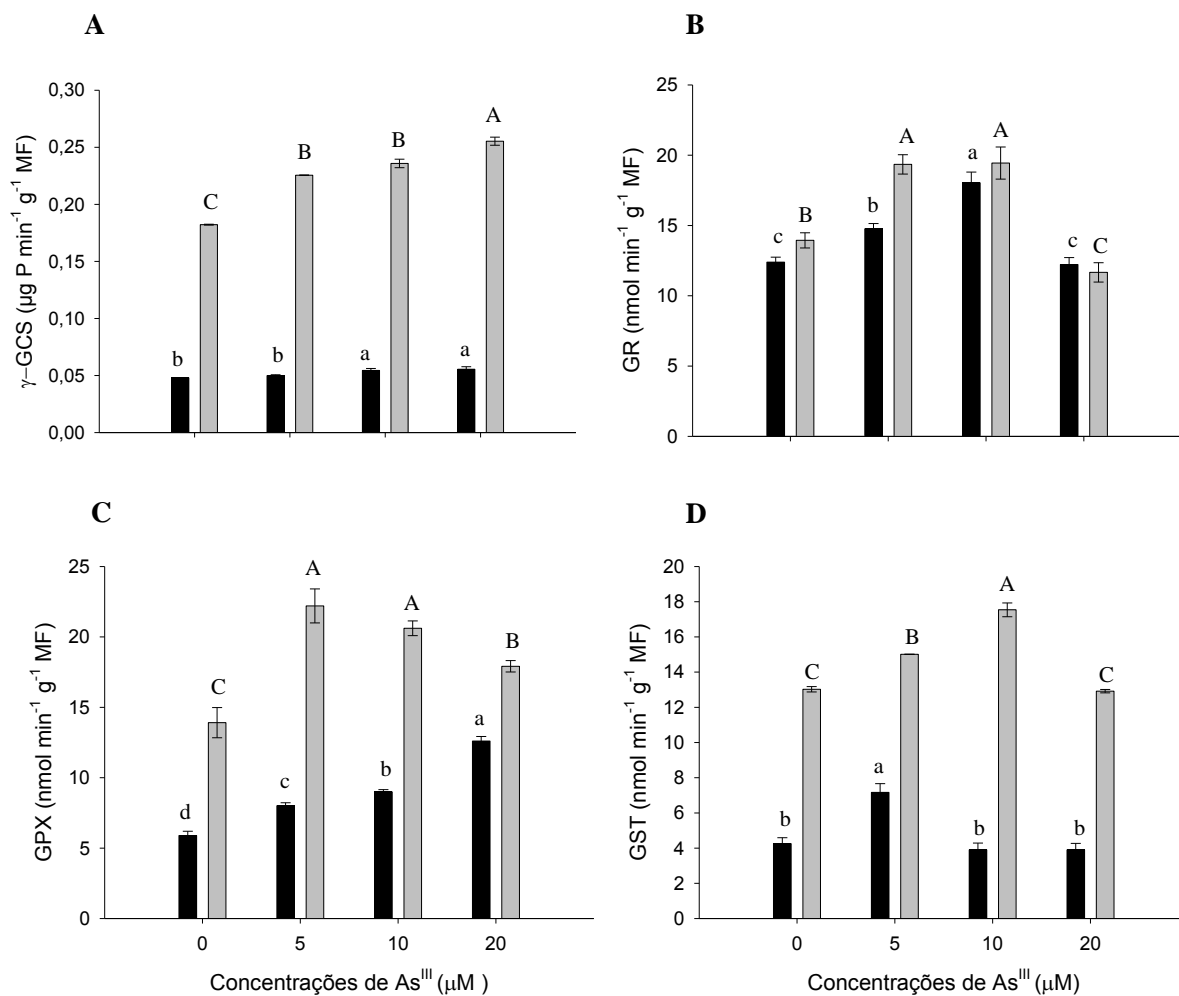


Figura 8. Atividade das enzimas γ -GCS: sintetase da γ -glutamilcisteína (A), GR: redutase da glutathiona (B), GPX: peroxidase da glutathiona (C) e GST: sulfotransferase da glutathiona (D) em raízes (■) e folhas (□) de *P. stratiotes* submetidas às diferentes concentrações de As^{III}, durante 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4- DISCUSSÃO

Embora o arsênio (As) seja altamente tóxico para as plantas, algumas espécies, apresentam capacidade de absorver, acumular e tolerar altas concentrações desse metaloide. Tais plantas são conhecidas como hiperacumuladoras e são potencialmente úteis em programas de fitorremediação. São consideradas plantas hiperacumuladoras de As aquelas que conseguem acumular concentrações deste metaloide acima de 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS (Machado-Estrada et al., 2013). Plantas de *Pistia stratiotes* acumularam, nas raízes, concentrações superiores a este valor indicando que esta espécie é capaz de remover concentrações elevadas de As do ambiente.

Geralmente, o acúmulo de As nas plantas aumenta com a exposição às concentrações crescentes deste metaloide. Em plantas de *P.stratiotes* expostas a maior concentração de As^{III} verificou-se baixo acúmulo deste elemento nas raízes, conforme também observado em *Oryza sativa* L. (Shri et al., 2009), *Wolffia globosa* (Zhang et al., 2012) e *Lactuca sativa* L. (Gusman et al., 2013). Os menores teores de As podem estar relacionados com a presença de mecanismos de exclusão do As^{III} pelas proteínas transmembranas aquaporinas, representando um mecanismo de grande importância para desintoxicação destas plantas (Zhao et al., 2010). No entanto, mesmo com menor acúmulo de As na maior concentração analisada, raízes de *P. stratiotes* apresentaram danos mais intensos nesta concentração. Segundo Gusman et al. (2013), possivelmente, o mecanismo de exclusão do As^{III} não ocorre imediatamente, não sendo suficiente para evitar danos fisiológicos. Além disso, o baixo acúmulo de As em raízes de *P. stratiotes* expostas à maior concentração de As^{III} pode ser determinado por danos intensos na membrana das células, interferindo na funcionalidade dos transportadores, impedindo assim, os mecanismos normais de absorção da célula ao longo do tempo (Shri et al., 2009).

A retenção do As^{III} nas raízes caracteriza-se como um mecanismo de tolerância das plantas a este metaloide, pois o mesmo apresenta elevada afinidade por grupos sulfidrilas, formando complexos com fitoquelatinas (PC`s) e estes complexos são sequestrados para o vacúolo das raízes evitando que este elemento fique livre na célula e possa desencadear danos (Hossain et al.,2012). Além disso, a retenção de As nas raízes pode ser um mecanismo de proteção, visando à redução de efeitos deletérios do metaloide no aparato fotossintético (Gomes et al., 2012).

A exposição ao As desencadeiam alterações nas características morfológicas e fisiológicas das plantas (Pereira et al., 2011). Segundo Fazelian et al. (2012), o As pode ocasionar distúrbios na síntese de clorofila, bem como, promover a degradação deste pigmento resultando na alta incidência de clorose em folhas de plantas expostas a este metaloide. Além de *P. stratiotes*, este sintoma de toxidez foi observado também em plantas de cevada (Shaibur et al., 2009), arroz (Shaibur & Kawai, 2011) e camomila (Fazelian et al., 2012).

Além de danos nos tecidos foliares, o desenvolvimento radicular de *P. stratiotes* foi fortemente afetado na presença do As^{III} . Segundo Farnese et al. (2014) quando esta espécie é exposta às concentrações tóxicas de As, forma-se um meristema de abscisão no ponto de inserção da raiz na haste, responsável por promover a perda das raízes. Os danos ocorridos nas raízes, juntamente, com a perda expressiva deste órgão, podem dificultar a absorção de nutrientes pela planta e contribuir para a redução no seu crescimento. Como observado em *P. stratiotes* a perda pronunciada de raízes resulta em TCR negativa, corroborando com resultados obtidos em agrião exposto à concentração elevada de As^{III} (Ozturk et al., 2010).

O estresse ocasionado pelo As perturba a homeostase redox das células, ocasionando a rápida formação de ROS, tais como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , que ocasionam danos às

proteínas, ácidos nucleicos, clorofila e lipídeos de membrana (Shah et al., 2001; Blokhina et al., 2003; Sharma & Dubey 2007; Mishra et al., 2011).

O $O_2^{\cdot-}$ é a primeira ROS a ser formada na célula, podendo diretamente ou por meio de mecanismos enzimáticos gerarem outras ROS (Sharma et al., 2012b). Como observado em *P. stratiotes*, o incremento de As na solução nutritiva resultou em aumento na produção de $O_2^{\cdot-}$, sendo este resultado observado também em *Oryza sativa* (Mishra et al., 2011; Tripathi et al., 2012) e *Hydrilla verticillata* (Srivastava et al., 2011). Assim, para remover o $O_2^{\cdot-}$, plantas expostas ao As geralmente apresentam aumento na atividade da SOD e maior expressão de suas isoformas (Hartley-Whitaker et al., 2001; Mascher et al., 2002; Mishra et al., 2011).

A SOD pertence a um grupo de metaloenzimas que catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 (Sharma et al., 2012a). Assim, o aumento na atividade dessa enzima durante o estresse por As, deve resultar, também, no incremento da atividade de enzimas eliminadoras do H_2O_2 (Mishra et al., 2011). Embora as concentrações de As nas folhas de *P. stratiotes* tenham atingido valores menores que nas raízes, esse acúmulo foi suficiente para induzir o aumento na atividade das enzimas CAT e POX, superando a eliminação do H_2O_2 observados nas plantas controle. Segundo Poschenrieder et al. (2013), em algumas plantas, a exposição às concentrações baixas de agentes tóxicos apresenta efeito estimulante sobre o vegetal, sendo esta resposta chamada hormesi. Assim, mantido em níveis reduzidos, o H_2O_2 pode atuar como mensageiro secundário nas respostas das plantas aos estresses devido a sua longa duração e permeabilidade através das membranas (Quan et al., 2008; Mittler et al., 2011).

Nas raízes de *P. stratiotes*, por outro lado, ocorreu aumento nos teores de H_2O_2 nas plantas expostas ao As, o que foi decorrente, em parte, da maior atividade da SOD e

redução na atividade das enzimas CAT e POX. Segundo Sobolev & Begonia (2008) a capacidade antioxidante das células é prejudicada devido à ação deletéria do As nas estruturas e funcionalidades das enzimas, associado ao fato de que o próprio H₂O₂ pode causar inativação por meio da oxidação dos grupos tióis (Gill & Tuteja, 2010).

Apesar das altas concentrações de As em raízes de *P. stratiotes*, a atividade da enzima APX neste órgão apresentou incrementos, indicando maior tolerância à toxicidade do As em relação as demais enzimas antioxidantes. Tal resultado também foi observado em raízes de agrião expostas ao As (Namdjoyan & Kermanian, 2013). Além disso, a APX é uma enzima regulada por sinais redox e aumento nos níveis de H₂O₂ (Sharma et al., 2012a). Neste sentido, a maior inibição enzimática nas raízes de *P. stratiotes* em decorrência da exposição ao As^{III} e consequentemente o aumento nos níveis de H₂O₂ pode ter contribuído para o incremento na atividade da APX neste órgão.

A enzima APX apresenta papel essencial na eliminação de H₂O₂ através do Ciclo Ascorbato-Glutationa, utilizando neste processo duas moléculas de ascorbato (AsA) como doadoras de elétrons (Sharma et al., 2012a). No entanto, sob condições de estresse o nível de AsA pode variar de acordo com a taxa de biossíntese desta molécula e sua demanda antioxidante (Chaves et al., 2002). Além disso, durante o estresse por As^{III} a regeneração do AsA pode ser potencialmente prejudicada (Mishra et al., 2011). Segundo Sharma & Dubey (2004), as isoformas da APX cloroplastídicas são mais sensíveis à escassez de AsA que as demais, sendo responsável pela menor atividade desta enzima nas folhas de plantas estressadas.

Assim, durante o estresse as enzimas antioxidantes atuam para eliminar o excesso de ROS produzidas e manter o equilíbrio redox das células. No entanto, se estes mecanismos de defesa não forem suficientes, as plantas passam a apresentar o estresse oxidativo.

Um dos parâmetros mais usados para determinar o grau de estresse oxidativo em plantas é a mensuração da peroxidação lipídica. Segundo Sytar et al. (2013), o processo de peroxidação lipídica está relacionado, principalmente, à baixa eficiência das enzimas antioxidantes. Neste sentido, a maior produção de ROS e paralelamente à inibição de algumas enzimas antioxidantes observada em raízes e folhas de *P. stratiotes* expostas às concentrações elevadas de As^{III}, dificulta a eliminação do excesso de ROS, ocasionando danos severos às membranas celulares. Como resultado da peroxidação lipídica, ocorre alteração na fluidez da membrana e perda do conteúdo celular, desencadeando o extravasamento de eletrólitos.

Associada às enzimas antioxidantes a glutathione é considerada um importante componente na defesa das plantas ao estresse, atuando diretamente na eliminação das ROS e, também, permitindo a atuação de outros antioxidantes (Gill & Tuteja, 2010). Em *P. stratiotes* a exposição ao As^{III} promoveu aumento nos níveis de glutathione total, conforme observado em outras espécies vegetais (Hartley-Whitaker et al., 2001; Khan et al., 2009; Srivastava et al., 2009). Sob condições de estresse é elevada a demanda por glutathione para a biossíntese de fitoquelatinas, conjugação direta com agentes tóxicos, através da atividade da enzima GST, regeneração do ascorbato, na eliminação direta das ROS e na atuação da enzima antioxidante, GPX (Pietrine et al., 2003; Anjum et al., 2010, 2011; Josefczak et al., 2012, Noctor et al., 2012). Na maior concentração de As^{III}, entretanto, observou-se redução nos teores de glutathione total em *P. stratiotes*, observando-se, também, este resultado em plantas de *Oryza sativa* L. (Ahsan et al., 2008), *Nephrolepis exaltata* (Sakai et al., 2010), *Phaseolus aureus* (Malik et al., 2012) e no líquen *Hypogymnia physodes* (Mrak et al., 2010). Esta redução, possivelmente, ocorreu devido ao consumo desta molécula no combate ao estresse, sem a sua devida reposição.

Segundo Noctor et al. (2012), o consumo de glutathione resulta em taxas aceleradas de síntese deste antioxidante em resposta ao estresse. O aumento na síntese desta molécula está relacionada com a maior atividade da enzima sintetase da γ -glutamylcysteine (γ -GCS), envolvida na primeira etapa de formação da glutathione (GSH) (Frendo et al., 2013). Esta enzima é controlada por um mecanismo de retroalimentação (Aravind & Prasad, 2005), de modo que os menores níveis de glutathione observado em plantas de *P. stratiotes* expostas à concentração mais elevada de As^{III} , pode ter sido determinante no incremento da atividade da γ -GCS.

A glutathione é o tiol de baixo peso molecular mais abundante nas células constituindo um tampão redox que mantém o ambiente intracelular redutor (Anjum et al., 2012). A manutenção deste estado reduzido é mantida pela ação da enzima GR que promove a redução da GSSG em GSH. No entanto, como observado em *P. stratiotes*, a exposição às concentrações elevadas de As^{III} comprometeram a atividade desta enzima. Muitos estudos já demonstraram que estresses abióticos, incluindo o estresse por metais pesados e metaloides afetam a atividade da GR em plantas (Anjum et al., 2010, 2011a, b; Gill & Tuteja, 2010). O As^{III} pode afetar a atividade da GR diretamente ao interagir com grupos sulfidrilas desta enzima, levando a sua inativação (Kertulis-Tartar et al., 2009).

A GR fornece GSH para as enzimas GPX e GST (Foyer & Noctor, 2005; Hossain et al., 2010; 2011; 2012). Desta forma, a redução apresentada na atividade da GR em *P. stratiotes* submetidas às concentrações elevadas de As^{III} , pode ter determinado a menor atividade das enzimas GPX e GST. Nas raízes, entretanto, a atividade da GPX foi menos afetada pela redução na atividade da GR, provavelmente, por utilizar outro eficiente agente de redução, a tioredoxina, em substituição à GSH (Herbette et al., 2002; Iqbal et al., 2006, Noctor et al., 2011). Além disso, o aumento na

atividade da GPX nas raízes, juntamente com a enzima APX, pode ter ocorrido para compensar a redução na atividade das enzimas eliminadoras de H₂O₂, CAT e POX. Segundo Fatima & Ahmad (2005), o aumento compensatório na atividade de determinadas enzimas antioxidantes pode ser resultante da indução da transcrição de seus genes, provavelmente mediada pelos próprios radicais livres.

A GST por sua vez, é uma enzima GSH-depedente que catalisam a conjugação da GSH com compostos tóxicos, formando derivados que podem ser eliminados a partir da célula, armazenados no vacúolo ou catabolizados (Dixon & Edwards, 2010). Neste sentido, os aumentos na atividade desta enzima nas menores concentrações de As^{III}, ocorreram para complexar o metaloide e assim desintoxicar a planta. No entanto, folhas e raízes de *P. stratiotes* apresentaram redução na atividade da GST quando expostas às maiores concentrações de As^{III}. Resultados similares foram observados também em *Prosopis sp.* (Mokgalaka-Matlala et al., 2009), *Thypha latifolia* (Lyubenova & Schröder, 2011) e *Phaseolus aureus* (Malik et al., 2012). Tal resultado sugere que a exposição às concentrações elevadas de As podem gerar disfunções metabólicas severas nas células, culminando na falha dos mecanismos de desintoxicação.

Assim, as plantas parecem apresentar respostas antioxidantes coordenadas para tolerar o estresse. Neste sentido, plantas que submetidas ao estresse por As, conseguem manter a atuação eficiente dos sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos são consideradas tolerantes e, podem ser potencialmente úteis na descontaminação de ambientes contaminados por este metaloide.

De maneira geral, a exposição de *P. stratiotes* à concentração de 5 µM de As^{III} permitiu a atuação eficiente dos mecanismos antioxidantes, culminando na sua tolerância ao metaloide. No entanto, a exposição às concentrações mais elevadas de As^{III} promoveu comprometimento nos seus mecanismos de defesa e,

consequentemente, na sobrevivência destas plantas. Assim, estes resultados sugerem que *P. stratiotes* possa ser útil na fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados com concentrações de As^{III} próximas a $5 \mu\text{M}$ (aproximadamente $0,35 \text{ mg/L}$).

5- CONCLUSÕES

A espécie *P. stratiotes* foi capaz de acumular concentrações elevadas de As, no entanto, a presença deste metaloide promoveu alterações significativas nos mecanismos de defesa, que variaram conforme a concentração do As na solução nutritiva. Quando expostas à concentração de 5 μM de As^{III} a planta apresentou baixa redução no crescimento e revelou mecanismos antioxidantes eficientes em resposta ao estresse. Entretanto nas maiores concentrações, principalmente, a de 20 μM de As^{III} , ficou explícito um mecanismo de toxidez elevada, caracterizado pela redução na atividade de algumas enzimas antioxidantes, maior geração de ROS e conseqüentemente maiores danos de membrana.

Os resultados observados neste estudo sugerem que as folhas de *P. stratiotes* é o órgão mais sensível da planta, apresentando maior geração de ROS e maior formação de malonaldeído. Neste sentido, com intuito de proteger este órgão, e principalmente, o aparato fotossintético, esta planta parece investir mais em respostas antioxidantes nas folhas, apresentando maior atividade enzimática e maior teor de glutathiona. Em raízes, os mecanismos antioxidantes apresentaram maiores danos, possivelmente devido ao maior acúmulo de As neste órgão, promovendo diretamente a inibição de enzimas importantes na defesa da planta.

Assim, o As^{III} apresentou como principal mecanismo de toxidez para *P. stratiotes* o aumento na produção de ROS e paralelamente, a inibição na atividade de enzimas antioxidantes importantes ao metabolismo celular. No entanto, estudos que revelem outros mecanismos de toxidez e a cascata sinalizatória envolvida na resposta ao As, são de grande relevância na elucidação dos mecanismos de sensibilidade e tolerância a este metaloide.

De maneira geral, o uso de *P.stratiotes* em programas de fitorremediação de As^{III} , deve ser limitado a regiões em que este contaminante se encontre em concentrações próximas a 5 μM (aproximadamente 0,35 mg/L). Porém, estudos adicionais são necessários para avaliar as respostas antioxidantes destas plantas em longo prazo.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahsan N, Lee DG, Alam I, Kim PJ, Lee JJ, Ahn YO, Lee H (2008) Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics* **8**:3561-3576.

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* **113**:548-555.

Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiology* **109**:1247-1257.

Anderson JV, Davis DJ (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiologia Plantarum* **120**:421-433.

Anjum NA, Umar S, Chan MT (2010) Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. Springer.

Anjum NA, Umar S, Ahmad A (2011a) Oxidative Stress in Plants: Causes, Consequences and Tolerance. IK International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.

Anjum NA, Umar S, Iqbal M, Khan NA (2011b) Cadmium causes oxidative stress in mung bean by affecting antioxidant enzyme systems and ascorbate-glutathione cycle metabolism. *Russian Journal Plant Physiology* **58**:92-99.

Anjum NA, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte AC, Pereira E, Prasad MNV (2012) Modulation of glutathione and its related enzymes in plants responses to toxic metals and metalloids: a review. *Environmental and Experimental Botany* **75**:307-324.

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

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* **44**:276-287.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**:179-194.

Borba RP, Figueiredo BR, Cavalcanti JA (2004) Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). *Revista Escola de Minas* **57**:0370-4467.

Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L (2002) Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods in Enzymology* **349**:280-287.

Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Method Enzymology* **113**:484-495.

Carvalho LM, Nascimento PC, Bohrer D, Scharf M, Silva MR (2004) Especificação analítica de compostos de arsênio empregando métodos voltamétricos e polarográficos: Uma revisão comparativa de suas principais vantagens e aplicações. *Química Nova* **27**:261-269.

Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* **2**:755-764.

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osorio ML, Pinheiro C (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* **89**:907-916.

Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **23**: 458-460.

Dixon DP, Skipsey M, Edwards R (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**:338-350.

Farnese FS, Oliveira JA, Gusman GS, Leão GA, Ribeiro C, Siman LI, Cambraia J (2013) Plant responses to arsenic: the role of nitric oxide. *Water Air Soil Pollut* **224**:1660.

Farnese FS, Oliveira JA, Lima FS, Leão GA, Gusman GS, Silva LC (2014) Evaluation of the potential of *Pistia stratiotes* L. (*water lettuce*) for bioindication and phytoremediation of aquatic environments contaminated with arsenic. *Brazilian Journal of Botany* (In press).

Fatima RA, Ahmad M (2005) Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment* **346**:256-273

Fazelian N, Asrar Z, Kalantari KM (2012) Effects of arsenic on the growth and oxidative stress in *Matricaria recutita* L. *Genetics and Plant Physiology* **2**:73-81.

Ferreira DF (1999) SISVAR - Sistema de análises estatísticas. Lavras-UFLA.

Flora, SJS (2011) Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine* **51**:257-281.

Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**:21-25.

Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**:1866-1875.

Frendo P, Baldacci-Cresp F, Benyamina SM, Puppo A (2013) Glutathione and plant response to the biotic environment. *Free Radical Biology and Medicine* **65**:724-730.

Garg N, Singla P (2011) Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environmental Chemistry Letters* **9**:303-321.

Gay C, Gebicki JM (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xyleneol orange hydroperoxide assay. *Analytical biochemistry* **284**:217-220.

Ghelfi A, Gaziola SA, Cia MC, Chabregas SM, Falco MC, Kuser-Falcão PR, Azevedo RA (2011) Cloning, expression, molecular modelling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. *Annals of Applied Biology* **159**:267-280.

Giannopolis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases. *Plant Physiology* **59**:309-314.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**:909-930.

Giri, AK, Patel RK (2012) Phytoaccumulation Potential and Toxicity of Arsenic Ions by *Eichhornia Crassipes* in Hydroponic System. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* **3**:137.

Gomes MP, Carvalho M, Marques TCLLSM, Duarte DM, Nogueira COG, Soares AM, Garcia QS (2012) Arsenic-sensitivity in *Anadenanthera Peregrina* due to arsenic-induced lipid peroxidation. *International Journal of Applied Science and Technology* **2**:2.

Goswami C, Majumder A, Misra AK, Bandyopadhyay K (2014) Arsenic uptake by *Lemna minor* in hydroponic system. *International Journal of Phytoremediation* (In press).

Gunes A, Pilbeam DJ, Inal A (2009) Effect of arsenic-phosphorous interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. *Plant Soil* **314**:211-220.

Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS, Cambraia J (2013) Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 1-9.

Ha NTH, Sakakibara M, Sano S (2011) Accumulation of indium and other heavy metals by *Eleocharis acicularis*: an option for phytoremediation and phytomining. *Bioresource Technology* **102**:2228-34.

Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (1974) Glutathione-S-transferase. The first step in mercapturic and formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**:7130-7139.

Hartley–Whitaker J, Ainsworth G, Meharg A (2001). Copper and arsenic induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. cloned with differential sensitivity. *Plant Cell Environmental* **24**:713-722.

Hasanuzzaman M, Fujita M (2012) Heavy metals in the environment: current status, toxic effects on plants and possible phytoremediation. *Phytotechnologies: remediation of environmental contaminants*. Taylor and Francis/CRC Press, Boca Raton, p.7–73.

Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* **84**:450-455.

Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P (2002) Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry* **269**:2414-2420.

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**:604-611.

Hossain MA, Hasanuzzaman M, Fujita M (2010) Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **16**:259-272.

Hossain MA, Hasanuzzaman M, Fujita M (2011) Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Frontiers of Agriculture in China* **5**:1-14.

Hossain MA, Hossain MD, Rohman MM, Silva JAT, Fujita M (2012) Onion major compounds (flavonoids, organosulfurs) and highly expressed glutathione-related enzymes: possible physiological interaction, gene cloning and abiotic stress response. *Onion Consumption and Health*, C. B. Aguirre and L. M. Jaramillo, Eds., Nova Science

Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ (2011) Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicological Sciences* **123**:305-332.

Hunt R (1978) *Plant growth analysis*. McGraw-Hill Book, New York, p. 74.

Iqbal A, Yabuta Y, Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S (2006) Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* **273**:5589-5597.

Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A (2012) Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences* **13**:3145-3175.

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* **57**:315-319.

Kertulis-Tartar GM, Rathinasabapathi B, Ma LQ (2009) Characterization of glutathione reductase and catalase in the fronds of two *Pteris* ferns upon arsenic exposure. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**:960-965.

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

Kile ML, Houseman EA, Breton CV, Smith T, Quamruzzaman O, Rahman M, Mahiuddin G, Christiani DC (2007) Dietary arsenic exposure in Bangladesh. *Environmental Health Perspectives* **115**:889-893.

Koshiba T (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiology* **34**:713-721.

Kuo MC, Kao CH (2003) Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biology Plantarum* **46**:149-152.

Lindeman W (1958) Observations on the behavior of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light, Proc, 2nd. Conference on the Peaceful Uses Atomic Energy **24**:8-15.

Lu Q, Zhenli LH, Donald AG, Peter JS, Xiaoe Y (2011) Uptake and distribution of metals by water lettuce (*Pistia stratiotes* L). *Environmental Science and Pollution Research International* **18**:978-986.

Lyubenova L, Schröder P (2011) Plants for waste water treatment—Effects of heavy metals on the detoxification system of *Typha latifolia*. *Bioresource Technology* **102**:996-1004.

Machado-Estrada B, Calderón J, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Zavala JS (2013) Accumulation of arsenic, lead, copper, and zinc, and synthesis of phytochelatins by indigenous plants of a mining impacted area. *Environmental Science and Pollution Research* **20**:3946-3955.

Malik JA, Goel S, Kaur N, Sharma S, Singh I, Nayyar H (2012) Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants

by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* **77**:242-248.

Marin AR, Pezeshki SR, Masscheleyn PH, Choi HS (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. *Journal Plant Nutrition* **16**:865-880.

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

Mathews S, Rathinasabapathi B, Ma LQ (2011) Uptake and translocation of arsenite by *Pteris vittata* L.: Effects of glycerol, antimonite and silver. *Environmental Pollution* **159**:3490-3495.

Mirza N, Pervez A, Mahmood Q, Shah MM, Shafqat MN (2011) Ecological restoration of arsenic contaminated soil by *Arundo donax* L. *Ecological Engineering* **37**:1949-56.

Mishra V, Upadhyay A, Pathak V, Tripathi B (2008) Phytoremediation of mercury and arsenic from tropical opencast coalmine effluent through naturally occurring aquatic macrophytes. *Water, Air, and Soil Pollution* **192**:303-314.

Mishra S, Jha AB, Dubey RS (2011) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma* **248**:565-577.

Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Van Breusegem F (2011) ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science* **16**:300-309.

Mohammadi M, Karr AL (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *Journal Plant Physiology* **158**:1023-1029.

Mokgalaka-Matlala NS, Flores-Tavizon E, Castillo-Michel H, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2009) Arsenic tolerance in mesquite (*Prosopis sp.*): low molecular weight thiols synthesis and glutathione activity in response to arsenic. *Plant Physiology Biochemistry* **47**:822-826.

Mrak T, Jeran Z, Batic F, Sanita` di Toppi L (2010) Arsenic accumulation and thiol status in lichens exposed to As(V) in controlled conditions. *Biometals* **23**:207-219.

Nagalakshmi N, Prasad MNV (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science* **160**:291-299.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* **22**:867-880.

Namdjoyan S, Kermanian H (2013) Exogenous nitric oxide (as sodium nitroprusside) ameliorates arsenic-induced oxidative stress in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) plants. *Scientia Horticulturae* **161**:350-356.

Nascimento KJT, Oliveira JA, Cambraia J, Oliva MA (2011) Alterações do sistema de defesa antioxidativo em plântulas de *Stizolobium aterrimum* e *Canavalia ensiformis* expostas ao arsênio. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* **6**:37-42.

Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH (2011) Glutathione. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* **9**.

Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environmental* **35**:454-84.

Ozturk F, Duman F, Leblebici Z, Temizgul R (2010) Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environmental and Experimental Botany* **79**:167-174.

Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim PR, Moreira MA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **11**:137-143.

Pereira FJ, Castro EM, Oliveira C, Pires MF, Pasqual M (2011) Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. *Planta Daninha* **29**:259-267.

Pietrini F, Iannelli MA, Pasqualini S, Massacci A (2003) Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis*. *Plant Physiology* **133**:829-837.

Pimentel C, Sarr B, Diouf O, Abboud ACS, Macauley HR (2002) Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo. *Revista Universo Rural* **22**:07-14.

Poschenrieder C, Cabot C, Martos S, Gallego B, Barceló J (2013) Do toxic íons induce hormesis in plants? *Plant Science* **212**:15-25.

Potters G, Horemans N, Jansen MAK (2010) The cellular redox state in plant stress biology-a charging concept. *Plant Physiology Biochemistry* **48**:292-300.

Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**:2-18.

Rahman MA, Hasegawa H (2011) Aquatic arsenic: Phytoremediation using floating macrophytes. *Chemosphere* **83**:633-646.

Rivas BL, Aguirre MC (2010) Removal of As(III) and As(V) by Tin(II) compounds. *Water Research* **44**:5730-5739.

Rodrigues ASL, Malafaia G (2008) Efeitos da exposição ao arsênio na saúde humana. *Revista Saúde.com* **4**:148-159.

Rofkar JR, Dwyer DF, Bobak DM (2014) Uptake and Toxicity of Arsenic, Copper, and Silicon in *Azolla caroliniana* and *Lemna minor*. *International Journal of Phytoremediation* **16**:155-166.

Ruegsegger A, Brunold C (1992) Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiology* **99**:428-433.

Sakai Y, Toshihiro W, Jun W, Takeshi S, Takuro S, Mitsuru O (2010) Influence of arsenic stress on synthesis and localization of low molecular weight thiols in *Pteris vittata*. *Environmental Pollution* **158**:3663-3669.

Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Gupta DK, Archilla A, Romero-Puertas MC, Del Río LA (2012) Reactive oxygen species and nitric oxide in plants under cadmium stress: from toxicity to signalling. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Springer, Heidelberg, pp. 199-215.

Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* **61**:1135-1144.

Shaibur MR, Kitajima N, Huq SI, Kawai S (2009) Arsenic–iron interaction: Effect of additional iron on arsenic-induced chlorosis in barley grown in water culture. *Soil Science and Plant Nutrition* **55**:739-746.

Shaibur MR, Kawai S (2011) Arsenic toxicity in Akita-Komachi Rice in presence of Fe^{3+} citrate. *Advances in Environmental Biology* **5**:1411-1422.

Sharma P, Dubey RS (2004) Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science* **167**:541-550.

Sharma P, Dubey RS (2007) Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminium. *Plant Cell Reports* **26**:2027-2038.

Sharma I (2012) a Arsenic induced oxidative stress in plants. *Section Botany* **67**:447-453.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) b Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**.

Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Tuli R (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **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 Regulation* **53**:65-73.

Sobolev D, Begonia M (2008) Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **5**:450-456.

Srivastava S, Srivastava AK, Suprasanna P, D'souza SF (2009) Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **60**:3419-3431.

Srivastava S, Suprasanna P, D'Souza SF (2011) Redox state and energetic equilibrium determine the magnitude of stress in *Hydrilla verticillata* upon exposure to arsenate. *Protoplasma* **248**:805-815.

Sytar O, Kumar A, Latowski D, Kuczynska P, Strzalka K, Prasad MNV (2013) Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**:985-999.

Tanaka K, Mitsuhashi H, Kondo N, Sugahara K (1982) Further evidence for inactivation of fructose-1,6-bisphosphate at the beginning of SO₂ fumigation: increase in fructose-1,6-bisphosphate and decrease in fructose-6-phosphate in SO₂ fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiology* **23**:1467-1470.

Tripathi P, Mishra A, Dwivedi S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Singh RP, Tripathi RD (2012) Differential response of oxidative stress and thiol metabolism in contrasting rice genotypes for arsenic tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **79**:189-198.

Vasquez-Tello A, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Silva JBV (1990) Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *Journal Experimental Botany* **41**: 827-832.

Vithanage M, Dabrowska BB, Mukherjee AB, Sandhi A, Bhattacharya P (2012) Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environmental Chemistry Letters* **10**:217-224.

Wang X, Ma LQ, Rathinasabapathi B, Liu YG, Zeng GM (2010) Uptake and translocation of arsenite and arsenate by *Pteris vittata* L.: Effects of silicon, boron and mercury. *Environmental and Experimental Botany* **68**:222-229.

Wang X, Ma LQ, Rathinasabapathi B, Cai Y, Liu YG, Zeng GM (2011) Mechanisms of efficient arsenite uptake by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental Science and Technology* **45**:9719-9725.

WHO (2001) Arsenic and arsenic compounds. Environmental health criteria 224. World Health Organization WHO, 180 p.

Xue PY, Yan CZ (2011) Arsenic accumulation and translocation in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Chemosphere* **85**:1176-81.

Yanuwiadi B, Polii B (2013) Phytoremediation of arsenic from geothermal power plant waste water using *Monochoria vaginalis*, *Salvinia molesta* and *Colocasia esculenta*. International Journal of Biosciences **3**:104-111.

Zhang X, Uroic MK, Xie WY, Zhu YG, Chen BD, McGrath SP, Zhao FJ (2012) Phytochelatins play a key role in arsenic accumulation and tolerance in the aquatic macrophyte *Wolffia globosa*. Environmental Pollution **165**:18-24.

Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA (2010) Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. Annual Review of Plant Biology **61**:535-559.