

REGIANE APARECIDA CANATTO

**TOXICIDADE DO ARSÊNIO: RESPOSTAS BIOQUÍMICAS,
FISIOLÓGICAS E ESTRUTURAIS EM *Landoltia punctata* (G.Mey.)
Les & D.J. (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

C213t
2013

Canatto, Regiane Aparecida, 1987-

Toxicidade do arsênio: respostas bioquímicas, fisiológicas e estruturais em *Landoltia punctata* (G.Mey) Lês & D.J. (Lemnaceae) / Regiane Aparecida Canatto. – Viçosa, MG, 2013.

viii, 31f. : il. ; 29cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 27-31

1. Plantas - Metabolismo. 2. Microscopia. 3. Arsênio.
4. Fitorremediação. 5. Stress oxidativo. 6. Antioxidantes.
- I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.
- II. Título.

CDD 22. ed. 572.42

REGIANE APARECIDA CANATTO

**TOXICIDADE DO ARSÊNIO: RESPOSTAS BIOQUÍMICAS,
FISIOLÓGICAS E ESTRUTURAIS EM *Landoltia punctata* (G.Mey.)
Les & D.J. (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: 7 março de 2013.

Prof.^a Luzimar Campos da Silva

Prof. Cleberson Ribeiro
(Co- orientador)

Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Sônia, meu pai Oscar e meu irmão Bruno pelo apoio, carinho e conselhos nos momentos difíceis.

Ao meu namorado Bruno pelo amor, paciência, ajuda, conselhos, carinho, dedicação, companheirismo, enfim, por tudo o que representou nessa etapa de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa- UFV e ao Departamento de Biologia Vegetal- Programa de Fisiologia Vegetal- por proporcionarem condições para o desenvolvimento desse trabalho e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao professor Juraci pela orientação, ajuda e amizade.

Ao co-orientador Cleberson Ribeiro pela ajuda na realização do trabalho.

A todos os meus professores.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) que permitiu realizar as análises de microscopia de varredura, em especial a Karla que se disponibilizou a ajudar.

Aos amigos que fiz em Viçosa Ana Carla, Camila, Carlos, Medina, Laíse, Leidy, Marcela, Paula, Priscila, Henrique.

Aos companheiros de laboratório Adinan, Fernanda Vidal, Fernanda Farnese, Neidi, Flávio, Luhan e especialmente à Cristiane, pela ajuda na realização de meus trabalhos, além das risadas e horas de descontração.

Às amigas de república Vanessa e Gisele pela amizade, ajuda e conversas.

Aos funcionários Carlos e Beringh pela ajuda.

E a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

Regiane Aparecida Canatto, filha de Sônia Maria Lopes Canatto e Oscar Canatto Sobrinho, nasceu em 07 de junho de 1987, na cidade de Mirandópolis, SP.

Em janeiro de 2011 graduou-se em Ciências Biológicas, licenciatura, pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- UFMS, Três Lagoas, MS.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
3.1. Obtenção, aclimação das plantas e aplicação dos tratamentos.....	5
3.2. Determinação da concentração de arsênio nas plantas	6
3.3. Avaliação dos agentes oxidantes em plantas de <i>Landoltia punctata</i> expostas ao As	6
3.3.1. Determinação quantitativa de peróxido de hidrogênio	7
3.3.2. Determinação quantitativa do ânion superóxido	7
3.4. Determinação da peroxidação de lipídios	8
3.5. Avaliação das atividades de enzimas antioxidantes em plantas de <i>Landoltia punctata</i> expostas ao As	8
3.5.1. Obtenção dos extratos enzimáticos brutos.....	8
3.5.2. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)	9
3.5.3. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	10
3.5.4. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7).....	10
3.5.5. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)	10
3.5.6. Determinação da atividade da peroxidase da glutatona (GPX, EC 1.11.1.9).....	11
3.5.7. Determinação da atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.6.4.2)	11
3.6. Extração e determinação dos teores de antocianinas	12
3.7. Determinação dos teores de compostos tiolados.....	12
3.7.1. Extração de tiois	12
3.7.2. Determinação do teor de tiois totais	12
3.7.3. Determinação do teor de tiois não-proteicos	13
3.7.4. Determinação do teor de tiois proteicos	13
3.8. Análise de raízes de <i>Landoltia punctata</i> , por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e microanálise, por energia dispersiva de raios-X (EDS).....	13
3.9. Delineamento experimental	14
4. RESULTADOS.....	14
4.1 Caracterização morfológica de <i>Landoltia punctata</i>	14
4.2. Concentração de arsênio em <i>Landoltia punctata</i>	15
4.3. Concentração de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido em <i>Landoltia punctata</i> exposta ao As	16
4.4. Efeito do As sobre a peroxidação de lipídios de membranas.....	16
4.5. Efeito de As sobre a atividade das enzimas antioxidantes.....	17
4.6. Efeito do As sobre o teor de antocianina em <i>Landoltia punctata</i>	19
4.7. Efeito do As sobre os teores de compostos tiolados	19
4.8. Micromorfologia de raízes de <i>Landoltia punctata</i> , por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e microanálise, por energia dispersiva de raios-X.....	20
4.8.1. Avaliação dos danos em raízes de <i>Landoltia punctata</i> por microscopia eletrônica de varredura.....	20
4.8.2. Microanálise por energia dispersiva de raios-X	21
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	26
7. BIBLIOGRAFIA.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ápices radiculares de *Landoltia punctata* em microscopia eletrônica de varredura. A- Tratamento controle. B- Tratamento com 3,0 mg L⁻¹ de As.

Figura 2 Foto mostrando a região do ápice da raiz onde foi feito o EDS (em verde).

Figura 3 Teor relativo dos elementos: fósforo (P), enxofre (S) e arsênio (As) em ápices radiculares de *Landoltia punctata* após tratamento com 3,0 mg L⁻¹ de As por 24 horas. Valores foram obtidos por análise de microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração de As em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Tabela 2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Tabela 3 Concentração de malonaldeído em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Tabela 4 Atividades das enzimas SOD, CAT, POX, APX, GPX e GR em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Tabela 5 Concentração de antocianina em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Tabela 6 Concentração de tiois solúveis totais, tiois não-proteicos e tiois proteicos em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

RESUMO

CANATTO, Regiane Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Toxicidade do arsênio: Respostas bioquímicas, fisiológicas e estruturais em *Landoltia punctata* (G.Mey.) Les & D.J. (Lemnaceae).** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Co-orientador: Cleberson Ribeiro

Plantas de *Landoltia punctata* (G.Mey.) Les & D.J. (Lemnaceae) foram expostas por 24 horas às concentrações crescentes de arsênio (As), com o objetivo de avaliar as alterações bioquímicas, fisiológicas e ultraestruturais. As plantas apresentaram concentrações de As maiores do que $1,0 \text{ mg g}^{-1}$ MS, podendo ser consideradas hiperacumuladoras. O maior aumento na concentração de MDA ocorreu no tratamento com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de As. Houve redução na concentração de ânion na maior concentração de As, podendo ser o resultado da maior atividade da dismutase do superóxido (SOD). A maior atividade da SOD pode ter contribuído para o aumento nos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas plantas expostas à maior concentração de As. Houve redução na atividade das enzimas catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato e da glutathione nas plantas expostas às concentrações mais altas de As. Observou-se aumento na atividade da glutathione redutase com o aumento na concentração de As. A concentração de antocianina foi maior em plantas expostas ao As. A exposição das plantas ao As resultou em aumento nos teores de tiois solúveis totais e proteicos, o que não foi observado em relação aos teores de tiois não-proteicos. A análise por microscopia eletrônica de varredura evidenciou danos estruturais radiculares, principalmente na região da coifa. Na análise das camadas mais externas do ápice radicular exposto ao As por microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raio-X (EDS) foi observado aumento no teor relativo de As, diminuição no de enxofre e manutenção no teor de fósforo. Conclui-se que a exposição de *L. punctata* ao As resultou em rápida absorção e acúmulo desse metaloide pelas plantas, com diversos danos diretos ou indiretos, ocasionados pelo aumento da concentração de intermediários reativos de oxigênio, os quais não puderam ser revertidos pela ação das enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

CANATTO, Regiane Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2013. **Toxicity of arsenic: Biochemical, physiological and structural responses in *Landoltia punctata* (G.Mey.) Les & DJ (Lemnaceae).** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-adviser: Cleberson Ribeiro

Plants of *Landoltia punctata* (G.Mey.) Les & DJ (Lemnaceae) were exposed to increasing concentrations of arsenic (As) for 24 hours to evaluate the occurrence of biochemical, physiological and ultrastructural changes. The plants showed As concentrations greater than 1.0 mg g⁻¹ DM and, therefore, can be considered hyperaccumulators of this element. The highest concentration of MDA occurred in the treatment with 3.0 mg L⁻¹ of As. There was reduction in the anion concentration at the highest concentration of As, which may be caused by the increased activity of superoxide dismutase (SOD). The highest activity of SOD may have increased the levels of hydrogen peroxide (H₂O₂) in plants exposed to the highest As concentration. There was reduction in the activity of catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase and glutathione in plants exposed to the highest As concentrations. The activity of glutathione reductase increased with the increase in As concentration. Concentration of anthocyanin was higher in plants exposed to As. Exposure of plants to As resulted in increased levels of total soluble thiols and protein thiols, which was not observed for non-protein thiols. Analysis by scanning electron microscopy showed structural root damage, especially in the root cap region. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive X-Ray Spectrometry (EDS) of outer layers of the root apex exposed to As showed increase in the relative content of As, decrease in sulfur and maintenance of phosphorus content. The results showed that exposure of *L. punctata* to As led to rapid absorption and accumulation of this metalloid by plants, with several direct or indirect damages caused by the increased concentration of reactive oxygen intermediates, which could not be reversed by the action of antioxidant enzymes.

1. INTRODUÇÃO

As atividades industrial, agrícola e de mineração têm resultado em contaminação do ambiente por diversos poluentes, entre eles os metais pesados, que afetam a qualidade da água e do solo (Apeti et al., 2012; Iavazzo et al., 2012; Kirschbaum et al., 2012). Dentre os diversos contaminantes inorgânicos, destaca-se o arsênio (As), considerado o mais tóxico aos seres humanos, segundo a Lista de Prioridade de Substâncias Perigosas da Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR, 2011).

O As é um metalóide encontrado em diversas formas orgânicas e inorgânicas, sendo o arsenato (As^{V}) e arsenito (As^{III}) as formas mais danosas em termos biológicos (Tripathi et al., 2007). O As^{V} é a forma predominante em ambientes aeróbicos, enquanto o As^{III} predomina em ambientes anaeróbicos (Zhao et al., 2010). A interconversão entre essas duas formas químicas ocorre em função de processos bióticos e abióticos, sendo fortemente influenciada pelo potencial redox e pH do meio (Zhao et al., 2010).

A contaminação dos ambientes terrestres e aquáticos com As ocorre em vários países, como Bangladesh (George et al., 2012), China (Bai et al., 2012), Iran (Keshavarzi et al., 2012), Índia (Hoque et al., 2012) e Vietnã (Phuong et al., 2012). No Brasil, a região correspondente ao quadrilátero ferrífero, no estado de Minas Gerais, apresenta elevados níveis desse elemento, devido principalmente à extensiva atividade de mineração de ouro, que libera grandes quantidades desse poluente no ambiente (Matschullat et al., 2007; Varcjao et al., 2011).

O aumento da concentração de As, de origem natural ou antrópica, nos sedimentos, solos e nos cursos d'água, ocasiona maior exposição humana e maiores riscos à saúde (Larios et al., 2012), podendo causar câncer hematológico (Sonali et al., 2011), do pulmão, da bexiga (Su et al., 2011) e da próstata (Singh et al., 2011), lesões nos vasos sanguíneos (Shi et al., 2010) e doenças cardiovasculares (Das et al., 2012).

Em plantas, o As pode ser absorvido por meio de diferentes sistemas de transportes. O As^{V} é absorvido através de transportadores de fosfato, uma vez que esses compostos são quimicamente semelhantes. O As^{III} é absorvido através das aquaporinas, predominantemente na forma neutra $\text{As}(\text{OH})_3$.

A exposição a concentrações tóxicas de As acarretam várias alterações fisiológicas e estruturais em plantas, como a redução do crescimento e biomassa (Liu et al., 2012), diminuição do conteúdo de clorofila e de compostos fenólicos (Sanchez-Viveros et al., 2011) e a inibição do crescimento radicular (Singh et al., 2007).

Diversas espécies de plantas aquáticas são capazes de sobreviver em ambientes contaminados com As, como *Lemna gibba* (Mkandawire e Durel, 2005), *Azolla* sp. (Sood et al., 2012) e *Ceratophyllum demersum* L. (Khang et al., 2012). Nessas condições, as plantas, geralmente, desenvolvem mecanismos de tolerância, principalmente aqueles relacionados à defesa antioxidante.

A exposição das plantas ao agente tóxico ocasiona a geração de intermediários reativos de oxigênio (ROI), os quais promovem danos às estruturas celulares. Nesse caso, a remoção desses oxidantes garante a esses indivíduos maior tolerância a ambientes contaminados (Bhaduri e Fulekar, 2012).

Os ROI são constantemente produzidos pelos organismos como subproduto do metabolismo aeróbico. Os intermediários mais frequentes ao metabolismo celular são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Moller e Sweetlove, 2010). O equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROI pode ser alterado por vários fatores de estresse biótico e abiótico, como ataques de patógenos e exposição a metais pesados (Karuppanapandian et al., 2011). O aumento na concentração celular desses oxidantes pode causar inativação de enzimas,

danos às membranas e organelas celulares, degradação de pigmentos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, o que pode, inclusive, resultar em morte celular (Gill e Tuteja, 2010).

O aumento na atividade antioxidante em resposta ao aumento de ROI é parte importante dos mecanismos de tolerância das plantas ao estresse causado pelos agentes tóxicos. Os mecanismos de defesa antioxidantes das plantas podem ser enzimáticos, como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase (POX), a peroxidase do ascorbato (APX), a peroxidase da glutathione (GPX) e a redutase da glutathione (GR), e não-enzimáticos, como as antocianinas e os tiois (Maheshwari e Dubey, 2009; Boguszevska et al., 2010; Ershova et al., 2011).

A dismutase do superóxido constitui a primeira linha de defesa contra ROI, dismutando o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e oxigênio molecular. Existem diferentes isoformas dessa enzima, que diferem entre si, principalmente, pelo tipo de metal presente no centro ativo, sendo estas encontradas em diferentes compartimentos celulares como mitocôndrias, cloroplastos, glioxissomo, peroxissomo, apoplasto e citosol (Alscher et al., 2002).

A catalase é uma enzima tetrâmera que contém um grupo heme em sua estrutura e atua nos peroxissomos, degradando o H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Gill e Tuteja, 2010).

A peroxidase atua degradando o H_2O_2 , pela reação com uma molécula redutora que irá caracterizar o tipo de peroxidase. A peroxidase do ascorbato utiliza o ascorbato como doador de elétrons na eliminação do H_2O_2 (Gill e Tuteja, 2010), já a peroxidase da glutathione utiliza a glutathione reduzida como substrato da reação. Além da eliminação do H_2O_2 , a GPX elimina hidroperóxidos orgânicos e hidroperóxidos (Noctor et al., 2002). A GR reduz a glutathione oxidada, utilizando o NAD(P)H como doador de elétrons, e restabelece a glutathione reduzida que será utilizada pela GPX (Apel e Hirt, 2004).

Entre os antioxidantes não enzimáticos, as antocianinas e os tiois possuem significativa participação como mecanismos de tolerância a poluentes. As antocianinas, pigmentos do grupo dos flavonoides, estão relacionadas à tolerância a metais pesados (Dai et al., 2012). Dentre os tiois, a glutatona participa do ciclo ascorbato-glutationa, e quando na forma reduzida, é capaz de atuar na proteção das plantas contra os ROI (Skladanka et al., 2012). Adicionalmente, a glutatona é substrato na síntese de fitoquelatinas, responsáveis pela quelação e transporte de metais pesados para o vacúolo (Yadav, 2010).

Face ao exposto, observa-se a necessidade de ampliação dos conhecimentos sobre os mecanismos de tolerância de plantas aquáticas ao As. Em virtude disso, plantas de *Landoltia punctata* foram estudadas visando analisar os mecanismos envolvidos na tolerância dessa espécie a esse metaloide.

Landoltia punctata (G.Mey.) Les & D.J. (Lemnaceae) é uma angiosperma aquática, monocotiledônea, de pequeno porte. Estudos revelaram que essa espécie tem a capacidade de absorver, acumular e tolerar metais pesados (Lahive et al., 2011; 2012) mas pouco se sabe sobre os mecanismos relacionados à tolerância dessa espécie ao As.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar as alterações bioquímicas, fisiológicas e estruturais em plantas de *L. punctata* expostas ao arsênio.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração de As absorvido por plantas de *L. punctata* submetidas a diferentes concentrações de As;
- Avaliar a geração de agentes oxidantes resultantes da exposição de plantas de *L. punctata* ao As, pela determinação quantitativa de peróxido de hidrogênio e do ânion superóxido, assim como os danos decorrentes da peroxidação de lipídios em plantas de *L. punctata* expostas ao As.
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes em *L. punctata* expostas ao As.
- Determinar, quantitativamente, a produção de compostos tiolados e antocianinas em plantas de *L. punctata* expostas a níveis tóxicos de As.
- Avaliar os danos estruturais em ápices de raízes de *L. punctata* exposta ao As, por microscopia eletrônica de varredura.
- Determinar, por meio de microanálise por energia dispersiva de raios-X, a proporção relativa dos elementos químicos fósforo, enxofre e arsênio, em ápices de raízes de *L. punctata* expostas ao As.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção, aclimação das plantas e aplicação dos tratamentos.

Plantas da espécie *Landoltia punctata* (G.Mey.) Les & D.J. (Lemnaceae) VIC 39.497 foram coletadas no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa e aclimatadas, por três dias, em recipientes de polietileno (0,35 x 0,30 x 0,17 m), contendo 3,0 L de solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), pH 6,5, em sala de crescimento de plantas do Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG,

com temperatura e luminosidade controlada (25 ± 2 °C), sob irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após o período de aclimação, aproximadamente 1 g de plantas, foram transferidas para recipientes de vidro contendo 0,5 L da solução nutritiva contendo 0,0 (controle); 0,5; 1,0; 1,5 e 3,0 mg L^{-1} de As, na forma de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições e, após 24 horas de exposição aos tratamentos as plantas foram removidas e lavadas com água destilada. O material vegetal foi coletado e utilizado para as análises microscópicas e quantificação do teor de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e antocianinas. Amostras do material vegetal também foram armazenadas a -80 °C, e utilizadas posteriormente para as análises enzimáticas e quantificação da concentração de malonaldeído e de compostos tiolados.

3.2. Determinação da concentração de arsênio nas plantas

Cerca de 0,1 g de massa seca de plantas inteiras obtidas por secagem em estufa à 70 °C foram submetidas à mineralização úmida. Ao material vegetal foram adicionados 1,5 mL de solução nitro-perclórica (2:1) à temperatura de 100-120 °C, para evitar a volatilização do As, até a completa digestão da matéria orgânica. Em seguida, as soluções foram diluídas pela adição de 10 mL de água desionizada e, então, analisadas através de espectrofotometria de absorção em plasma (modelo OPTIMA 8300, Perkin Elmer).

3.3. Avaliação dos agentes oxidantes em plantas de *Landoltia punctata* expostas ao As

As análises espectrofotométricas de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, foram realizadas em espectrofotômetro UV/visível (Varian, modelo Caru 100, Austrália).

3.3.1. Determinação quantitativa de peróxido de hidrogênio

Amostras de 0,3 g de plantas inteiras, trituradas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, seguido de centrifugação a 10.000 $\times g$, por 15 minutos à 4 °C (Kuo e Kao, 2003).

Alíquotas de 50 μ L do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 μ M, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μ M e sorbitol 100 mM, em volume final de 2,0 mL (Gay e Gebicki, 2000). A solução foi mantida no escuro por 30 minutos e, em seguida foi determinado a absorvância a 560 nm em espectrofotômetro. A quantificação de H_2O_2 foi realizada com base em curva de calibração, utilizando concentrações padronizadas de H_2O_2 . Brancos para os reagentes e os extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra.

3.3.2. Determinação quantitativa do ânion superóxido

Aproximadamente, 50 mg de massa fresca de plantas inteiras, foram cortadas em pequenos segmentos e colocadas em tubos tipo “penicilina”, e adicionados 2,0 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (Na_2EDTA) 100 μ M, β -nicotinamida adenina nucleótido reduzida (NADH) 20 μ M e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001), sendo, os tubos, hermeticamente fechados. A reação teve início com a introdução de 100 μ L de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, utilizando-se seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28 °C, sob agitação, por 5 minutos, seguido da remoção dos segmentos vegetais. A partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura da absorvância, em espectrofotômetro, a 480 nm, durante 5 minutos. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem material vegetal. A produção de ânion superóxido foi avaliada pela quantidade de adenocromo acumulado

(Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Boveris, 1984).

3.4. Determinação da peroxidação de lipídios

Amostras de 0,16 g de plantas inteiras foram trituradas em N_2 líquido e homogeneizadas em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), seguido de filtração através de quatro camadas de gaze e centrifugação a 10.000 $\times g$ por 15 minutos, a 4 °C. A uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada 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, a 95 °C, por 2 h. Em seguida, a reação foi paralisada em banho de gelo, por 10 min, e centrifugada a 3.000 $\times g$, por 10 min, a 4°C. Para a medição da absorvância, em espectrofotômetro (Varian, modelo Caru 100, Austrália), do sobrenadante foi utilizado o comprimento de onda de 532 nm. A absorvância inespecífica foi determinada a 600 e 440 nm e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi obtido mediante utilização do coeficiente de absorvidade molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hodges, 1999), sendo os resultados expressos em nmol g^{-1} de massa fresca.

3.5. Avaliação das atividades de enzimas antioxidantes em plantas de *Landoltia punctata* expostas ao As

3.5.1. 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 glutathione (GPX) e da redutase da glutathione (GR) foram obtidos pela maceração de 0,3 g de plantas inteiras em nitrogênio líquido, seguido da adição de 2,0 mL de meio de homogeneização e centrifugado a 12.000 $\times g$, por 15 minutos, 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 $MgCl_2$ 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). As análises das atividades enzimáticas foram feitas em espectrofotômetro (Varian, modelo Caru 100, Austrália).

3.5.2. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 μ L do extrato enzimático bruto a 4,95 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 μ M, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μ M. A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância, em espectrofotômetro, a 560 nm. Um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco, sendo subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolis 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). Os dados foram expressos em U SOD $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.5.3. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 0,2 mL 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_2O_2 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido, em espectrofotômetro, a 240 nm, a 25 °C. 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 expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.5.4. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 0,2 mL 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). A produção de purpurogalina foi determinada, por espectrofotômetro, pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C. 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 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.5.5. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada pela adição de 0,2 mL do extrato enzimático bruto a 2,8 mL de meio de reação constituído de ascorbato 0,8 mM e H_2O_2 1,0 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0. Observou-se o decréscimo na absorvância a 290 nm em espectrofotômetro, 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 Assada, 1981) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.5.6. Determinação da atividade da peroxidase da glutathione (GPX, EC 1.11.1.9)

A atividade da peroxidase da glutathione foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto 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, glutathione reduzida (GSH) 1 mM, NADPH 0,2 mM, H_2O_2 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutathione (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorvância foi determinado no primeiro minuto de reação, em espectrofotômetro, a 340 nm, à temperatura de 30 °C. 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 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.5.7. Determinação da atividade da redutase da glutathione (GR, EC 1.6.4.2)

A atividade da redutase da glutathione foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, glutathione oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM (em tampão Tris-HCl 0,5 mM, pH 7,5) (Carlberg e Mannervik, 1985). O decréscimo na absorvância foi determinado no primeiro minuto de reação, em espectrofotômetro, a 340 nm, à temperatura de 30 °C. 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.

3.6. Extração e determinação dos teores de antocianinas

Amostras contendo 1 g de massa fresca (MF) de plantas inteiras foram maceradas em 15 mL de metanol acidificado, pH 3,0, e mantidas em geladeira por 14 horas. Após filtração, a concentração de antocianinas foi estimada com base em perlagonidina 3-glicosídeo, com leitura da absorvância a 512 nm em espectrofotômetro (Kamperidou e Vasilakakis, 2006), utilizando-se o coeficiente de absortividade molar de $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1} \text{ MF}$.

3.7. Determinação dos teores de compostos tiolados

3.7.1. Extração de tiois

Amostras de 0,3 g de plantas inteiras foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionados 2,0 mL do meio de extração constituído de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 1 mM e ácido ascórbico 1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos, a 4 °C (Meuwly e Rauser, 1992) e o sobrenadante utilizado para a determinação dos teores de tiois solúveis totais, tiois não-proteicos e tiois proteicos.

3.7.2. Determinação do teor de tiois totais

Alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante, obtido conforme o item 3.7.1., foram adicionadas a 0,3 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,2, 0,02 mL do reagente de Ellman (ácido 5,5- ditio-bis (2- nitrobenzóico)) 0,01 M e 1,58 mL de metanol. Após 15 minutos de reação, à 37 °C, foi determinada, em espectrofotômetro (Varian, modelo Caru 100, Austrália), a absorvância no comprimento de onda de 412 nm. Utilizou-se o

coeficiente de extinção molar de $13100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

3.7.3. Determinação do teor de tiois não-proteicos

Alíquotas de 1,0 mL do sobrenadante, obtido conforme o item 3.7.1., foram adicionadas a 0,2 mL de TCA 50% (p/v), e 0,8 mL de água destilada. Após uma hora em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 15 minutos. Às alíquotas de 0,4 mL do sobrenadante foram adicionadas 0,8 mL de tampão fosfato de potássio 0,4 M, pH 8,9 e 0,02 mL do reagente de Ellman (ácido 5,5- ditio-bis (2-nitrobenzóico) 0,01 M. Após 5 minutos, em temperatura ambiente, foi determinada, em espectrofotômetro (Varian, modelo Caru 100, Austrália), a absorvância no comprimento de onda de 412 nm. Utilizou-se coeficiente de extinção molar de 13100 M cm^{-1} e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

3.7.4. Determinação do teor de tiois proteicos

O teor de tiois proteicos foi calculado pela diferença entre o teor de tiois solúveis totais e tiois não-proteico, e os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$.

3.8. Análise de raízes de *Landoltia punctata*, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e microanálise, por energia dispersiva de raios-X (EDS)

Após exposição a 0 e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de As, as plantas de *L. punctata* foram coletadas e lavadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M , pH 7,2 e, logo após, fixada em solução de glutaraldeído 2,5%, preparada em tampão fosfato de potássio 0,1 M , pH 7,2, por 2 horas. Seguiu-se a lavagem, por duas vezes, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2, e

desidratação em série etílica (30, 50, 70, 80, 95 e 100%). Após a secagem com CO₂, em secador de ponto crítico (modelo CPD 030, Balzers, Liechtenstein) apenas os ápices radiculares foram removidos e utilizados nas análises. Os ápices radiculares foram afixados em fita dupla face em suporte de alumínio (stubs), e submetidos à deposição metálica com ouro, em metalizador (modelo FDU 010, Bal Tec, Balzers, Liechtenstein), para as análises de microscopia eletrônica de varredura, e cobertas com carbono, em evaporador de carbono (Modelo Q150T, Quorum) para as análises de EDS. As fotografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430VP, Cambridge, Inglaterra), localizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV. As análises dos elementos arsênio (As), enxofre (S) e fósforo (P) por EDS foram determinadas na região da coifa.

3.9. Delineamento experimental

Todos os experimentos foram conduzidos no delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os resultados foram submetidos ao teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2008).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização morfológica de *Landoltia punctata*

A exposição das plantas ao arsênio resultou em alterações morfológicas tanto de folhas quanto de raízes.

A medida que aumentou a concentração de arsênio na solução, foi possível observar uma separação das folhas, que normalmente ficam agrupadas em um número

médio de 6 folhas por plantas. Nos tratamentos com 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ de As, as folhas se encontravam em um número de 1 ou 2 por plantas, enquanto nos tratamentos com 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de As essa separação foi pouco evidenciada.

Foi possível observar uma redução no tamanho das raízes nos tratamentos com as concentrações de 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ de As, o que não foi evidenciado nos tratamentos com as menores concentrações de As.

4.2. Concentração de arsênio em *Landoltia punctata*

A concentração de arsênio (As) na planta aumentou com a disponibilidade crescente desse elemento na solução nutritiva. Observou-se, entretanto, a absorção de As tende a saturação nas concentrações mais altas desse elemento. A exposição das plantas à concentração de 1,0 mg L⁻¹ de As resultou num incremento de 41% na concentração do elemento na planta em comparação à concentração de 0,5 mg L⁻¹, enquanto que na concentração de 3,0 mg L⁻¹ esse incremento foi de, apenas, 75%, mesmo com o aumento de seis vezes na disponibilidade de As (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração de As em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Concentração de As (mg g ⁻¹ MS)
0,0	0,000 ±0,00 d
0,5	0,655 ±0,07 c
1,0	0,924 ±0,09 b
1,5	1,030 ±0,06 b
3,0	1,150 ±0,12 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.3. Concentração de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido em *Landoltia punctata* exposta ao As

A exposição das plantas ao As resultou em aumento significativo no teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apenas no tratamento com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de As, com incremento de 34% em relação ao controle. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa em comparação às plantas controle (Tabela 2).

O teor de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) nas plantas tratadas com As foi significativamente maior do que das plantas controle, com os maiores valores sendo detectados nos tratamentos com $1,0$ e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de As. Na maior concentração de As foi observado decréscimo no teor de $\text{O}_2^{\bullet-}$, mas ainda assim, manteve-se em valores maiores do que aqueles obtidos nas plantas controle (Tabela 2).

Tabela 2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Concentração de As (mg L^{-1})	H_2O_2 ($\text{nmol g}^{-1} \text{ MF}$)	$\text{O}_2^{\bullet-}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$)
0,0	$31,0 \pm 2,3 \text{ b}$	$0,173 \pm 0,009 \text{ d}$
0,5	$30,2 \pm 1,7 \text{ b}$	$0,225 \pm 0,008 \text{ c}$
1,0	$30,3 \pm 1,8 \text{ b}$	$0,320 \pm 0,017 \text{ a}$
1,5	$30,3 \pm 2,0 \text{ b}$	$0,320 \pm 0,004 \text{ a}$
3,0	$41,5 \pm 3,1 \text{ a}$	$0,245 \pm 0,012 \text{ b}$

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.4. Efeito do As sobre a peroxidação de lipídios de membranas

A concentração de malonaldeído (MDA) em plantas tratadas com As foi significativamente maior que nas plantas controle. Nos tratamentos com $0,5$; $1,0$ e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de As foram estatisticamente semelhantes entre si, com acréscimo médio de 27% em

relação ao controle. O maior teor de MDA foi observado no tratamento com 3 mg L⁻¹ de As, com acréscimo de 42% em relação ao controle (Tabela 3).

Tabela 3 Concentração de malonaldeído em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	MDA (nmol g ⁻¹ MF)
0,0	4,97 ±0,52 c
0,5	6,21 ±0,49 b
1,0	6,34 ±0,83 b
1,5	6,41 ±0,72 b
3,0	7,09 ±0,55 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.5. Efeito de As sobre a atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da SOD aumentou com a concentração crescente de As, com valores de 41,7% e 137,5% maiores do que o controle, nas concentrações de 0,5 e 3,0 mg L⁻¹ de As, respectivamente (Tabela 4).

A exposição das plantas ao As na concentração de 0,5 mg L⁻¹ não provocou alteração da atividade da CAT. Nas demais concentrações, no entanto, verificou-se decréscimo aproximado de 10% da atividade enzimática, sem que houvesse diferença entre os tratamentos a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹ de As (Tabela 4).

A atividade da POX aumentou quando as plantas foram expostas às concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de As, com acréscimo médio de 34,5% em relação ao controle. Nas demais concentrações de As, no entanto, observou-se decréscimo nessa atividade, permanecendo os valores próximos àqueles obtidos nas plantas controle (Tabela 4).

Acréscimo na atividade da APX foi observado apenas no tratamento com 0,5 mg L⁻¹ de As. Com aumento na concentração de As verificou-se redução gradativa na atividade dessa enzima, atingindo, nos tratamentos com 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ de As, valores estatisticamente inferiores àqueles observados nas plantas controle (Tabela 4).

Os resultados evidenciaram aumento na atividade da GPX nos tratamentos com 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de As. Logo após, ocorreu decréscimo na atividade dessa enzima, ficando esta, estatisticamente igual ao controle (Tabela 4).

O estresse ocasionado pela exposição das plantas ao As promoveu acréscimo na atividade da GR. A concentração de 0,5 mg L⁻¹ de As foi menor que nas demais concentrações. Observou-se que a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹ de As não ocorreu diferenças significativas, sendo estas estatisticamente maiores que o controle (Tabela 4).

Tabela 4 Atividades das enzimas SOD, CAT, POX, APX, GPX e GR em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

As (mg L ⁻¹)	SOD	CAT	POX	APX	GPX	GR
	U SOD min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína	μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína				
0,0	2,4 ±0,34 d	115,5 ±1,82 a	16,5 ±1,05 b	0,79 ±0,13 c	1,50 ±0,15 b	0,43 ±0,04 c
0,5	3,4 ±0,68 c	121,8 ±14,3 a	22,7 ±2,85 a	1,41 ±0,20 a	1,85 ±0,27 a	0,55 ±0,03 b
1,0	4,7 ±0,76 b	105,4 ±4,76 b	21,7 ±1,43 a	0,88 ±0,15 b	1,86 ±0,25 a	0,72 ±0,07 a
1,5	4,7 ±0,63 b	102,3 ±7,24 b	18,1 ±1,15 b	0,73 ±0,10 d	1,66 ±0,11 b	0,74 ±0,04 a
3,0	5,7 ±0,71 a	107,9 ±7,35 b	16,6 ±0,67 b	0,61 ±0,13 e	1,68 ±0,04 b	0,78 ±0,08 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.6. Efeito do As sobre o teor de antocianina em *Landoltia punctata*

As plantas expostas ao As tiveram alteração no teor de antocianina, com incrementos de 17% nos tratamentos com 0,5, 1,0 e 1,5 mg L⁻¹ de As e de 24% na maior concentração de As, em comparação com o controle (Tabela 5).

Tabela 5 Concentração de antocianina em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Antocianina (µg g ⁻¹ MF)
0,0	41,2 ±0,04 c
0,5	48,3 ±0,01 b
1,0	48,0 ±0,07 b
1,5	48,2 ±0,04 b
3,0	51,0 ±0,06 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.7. Efeito do As sobre os teores de compostos tiolados

A exposição das plantas ao As resultou em aumento nos teores de tiois solúveis totais e tiois proteicos em todos os tratamentos, em relação ao controle. Entretanto, o aumento na disponibilidade de As em solução não promoveu variação significativa nos teores desses tiois, permanecendo sem diferenças significativas entre os tratamentos com As (Tabela 6).

Não houve diferença significativa nos teores de tiois não-proteicos entre os tratamentos (Tabela 6).

Tabela 6 Concentração de tiois solúveis totais, tiois não-proteicos e tiois proteicos em plantas de *Landoltia punctata* submetidas a diferentes concentrações de As durante 24 horas.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Tiois totais ($\mu\text{mol}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF)	Tiois não-proteico ($\mu\text{mol}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF)	Tiois proteico ($\mu\text{mol}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF)
0,0	3,92 $\pm$ 0,20 b	2,62 $\pm$ 0,37 a	1,43 $\pm$ 0,20 b
0,5	5,59 $\pm$ 0,86 a	2,66 $\pm$ 0,19 a	2,54 $\pm$ 0,86 a
1,0	5,45 $\pm$ 0,92 a	2,66 $\pm$ 0,18 a	2,96 $\pm$ 0,92 a
1,5	5,49 $\pm$ 1,18 a	2,73 $\pm$ 0,09 a	2,69 $\pm$ 1,18 a
3,0	5,46 $\pm$ 1,91 a	2,52 $\pm$ 0,13 a	2,78 $\pm$ 1,91 a

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.8. Micromorfologia de raízes de *Landoltia punctata*, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e microanálise, por energia dispersiva de raios-X

4.8.1. Avaliação dos danos em raízes de *Landoltia punctata* por microscopia eletrônica de varredura

No experimento realizado foi possível observar o efeito tóxico do As sobre a micromorfologia de ápices radiculares em *L. punctata*, com a desestruturação, escamação e erosão das células superficiais da coifa em maior grau do que na protoderme. Além da formação de sulcos evidenciados na região da protoderme (Figura 1).

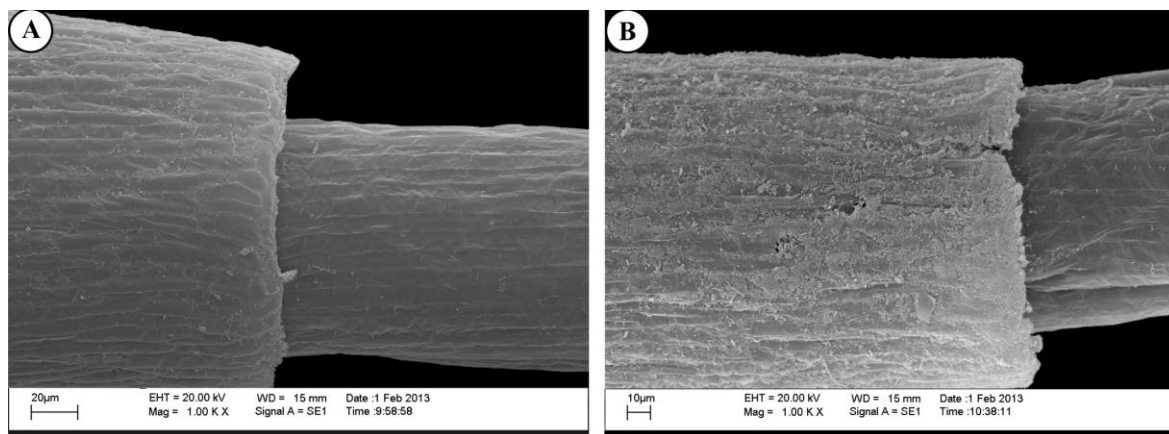


Figura 1 Ápices radiculares de *Landoltia punctata* em microscopia eletrônica de varredura. A- Tratamento controle. B- Tratamento com 3,0 mg L⁻¹ de As.

4.8.2. Microanálise por energia dispersiva de raios-X

Após exposição das plantas ao As, observou-se incremento no teor relativo de As em raízes. Não foi observada diferença nos teores de P no tratamento em relação ao controle. Houve redução do teor relativo de enxofre em plantas tratadas com As (Figura 3).

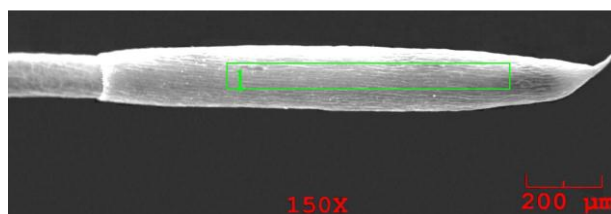


Figura 2 Foto mostrando a região do ápice da raiz onde foi feito o EDS (em verde).

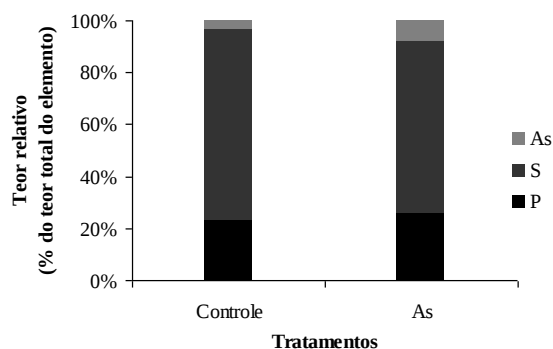


Figura 3 Teor relativo dos elementos: fósforo (P), enxofre (S) e arsênio (As) em ápices radiculares de *Landoltia punctata* após tratamento com 3,0 mg L⁻¹ de As por 24 horas. Valores foram obtidos por análise de microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS).

5. DISCUSSÃO

A espécie *Landoltia punctata*, família Lemnaceae, foi capaz de absorver rapidamente o As em solução e acumulá-lo em elevadas concentrações. É observado que nessa família, as plantas possuem capacidade para acumular elevadas concentrações de arsênio (As) em seus tecidos caracterizando tolerância à ação tóxica desse poluente (Mkandawire e Durel, 2005; Duman et al., 2010). Considerando apenas a bioacumulação, *L. punctata* poderia ser considerada hiperacumuladora de As, uma vez que foi capaz de acumular mais de 1000 mg kg⁻¹ MS, conforme sugerido por McGrath e Zhao (2003).

Para ser considerada hiperacumuladora, além da capacidade para acumular, a espécie tem que possuir mecanismos que as permitam tolerar os potenciais danos celulares. Nesse aspecto, verificou-se que *L. punctata* não se enquadra como hiperacumuladora, pois apresentou vários danos diretos e indiretos, ocasionados pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio, inoperância dos sistemas de defesa enzimáticos, aumento na peroxidação de lipídios, além de alterações na micromorfologia das raízes. Pesquisas desenvolvidas por Zhang et al. (2009), com a espécie *Wolffia globosa*, evidenciaram a

mesma relação entre o acúmulo de As e a incapacidade de atenuar as injúrias causadas pelas altas concentrações internas.

Dentre as enzimas avaliadas, a dismutase do superóxido (SOD) apresentou acréscimo na atividade na maior concentração de As utilizada, o que foi relacionado, também, ao decréscimo na concentração do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) nesse tratamento. Essa enzima dismuta o $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular atuando na primeira linha de defesa contra esse elemento, buscando manter constantes seus níveis celulares, evitando assim, diversos danos aos componentes das células (Alscher et al., 2002). Dessa forma, o aumento observado na concentração de H_2O_2 pode ter sido resultado da maior participação da SOD na remoção de $O_2^{\bullet-}$.

Apesar de ter sido observado decréscimo nos teores de $O_2^{\bullet-}$ no tratamento com a maior concentração de As, este permaneceu maior que o controle, podendo ter atuado junto com o H_2O_2 no aumento da peroxidação lipídica, quantificado em termos de teores de MDA. Os teores de MDA são utilizados como índice da peroxidação lipídica sob condições de estresse (Alfadul e Al-Fredan, 2013).

O aumento nos teores de MDA em resposta a exposição das plantas a metais pesados é evidenciada por vários autores, mostrando que esse resultado está relacionado com o aumento de ROI (Song et al., 2011; Prado et al., 2012; Alfadul e Al-Fredan, 2013), o que pode causar danos às membranas e organelas celulares, degradação de pigmentos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, podendo, inclusive, resultar em morte celular (Gill e Tuteja, 2010).

As enzimas CAT, POX, APX e GPX tiveram a atividade afetada pela ação tóxica do As nos tratamentos com as maiores concentrações. Entretanto, nos tratamentos com as menores concentrações de As observou-se efetividade da participação dessas enzimas na atenuação dos danos celulares. Em estudos realizados com *Lemna minor* observou-se que a

atividade das enzimas SOD, CAT e APX foi estimulada nas concentrações mais baixas de As, ocorrendo decréscimo na atividade dessas enzimas nas concentrações mais elevadas desse elemento (Duman et al., 2010).

A GR é responsável pela redução da glutathione oxidada, utilizando o NADP(H) como doador de elétrons. Essa glutathione reduzida formada é utilizada pela GPX como doador de elétrons no processo de remoção de H_2O_2 (Apel e Hirt, 2004), além de ser fundamental para o ciclo ascorbato-glutathione, relacionado com o mecanismo de tolerância das plantas contra ROI (Skladanka et al., 2012). Sendo assim, esta enzima pode ter contribuído para a manutenção de níveis mais baixos de H_2O_2 nos tratamentos com as menores concentrações de As.

Como parte dos mecanismos não-enzimáticos de tolerância ao As, as antocianinas demonstraram efetiva participação como atenuante de ação tóxica desse elemento em plantas de *L. punctata*, pois o incremento na concentração de As em solução foi acompanhado de aumento na concentração desses pigmentos. As antocianinas são pigmentos pertencentes ao grupo do flavonóides que apresentam potencial antioxidante, sendo capazes de remover H_2O_2 (Gould et al., 2002), atuando junto com outros mecanismos antioxidantes para a manutenção das funções fisiológicas normais das células (Dai et al., 2012). Além disso, o aumento da concentração de antocianinas pode estar relacionado a deficiência de fósforo que as plantas expostas ao As podem apresentar. Uma vez que As e fósforo competem pelo mesmo transportador, uma maior absorção de arsênio acarretaria menor absorção de fósforo (Fayiga, et al., 2008). Yin et al. (2012) constataram que na limitação de fósforo, as plantas superexpressam genes envolvidos na biossíntese de antocianinas. Estudos futuros deverão ser feitos para se avaliar a relação entre aumento da concentração de antocianinas e a redução da concentração de fósforo.

Os compostos tiólicos não-proteicos, como a glutatona e as fitoquelatinas, representam importante fração dos componentes bioquímicos relacionados à tolerância das plantas expostas ao As e metais pesados (Skladanka et al., 2012). A glutatona participa do ciclo ascorbato-glutaiona e, quando em sua forma reduzida, atua na proteção das plantas contra os danos causados pelos ROI (Skladanka et al., 2012), enquanto as fitoquelatinas atuam na quelação do As e transporte até o vacúolo (Yadav, 2010).

Em diversos trabalhos têm sido demonstrado o aumento nos teores de tiois não-proteicos em plantas expostas ao As (Srivastava et al., 2009; Requejo e Tena, 2012). Em plantas de *L. punctata*, entretanto, esse fato não foi observado, o que pode ser decorrência de outros mecanismos de tolerância que não envolvam esses compostos, conforme verificado em *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. expostas ao As (Lokhande, et al., 2011).

Os compostos tiólicos proteicos parecem não exercer influência direta sobre a resposta de plantas a metais pesados, podendo este exercerem funções indiretas como componentes de enzimas, como as do sistema antioxidante.

As alterações estruturais e ultraestruturais resultantes da ação tóxica do As em diversos processos metabólicos são observadas nas raízes de *L. punctata*. Essas incluem desestruturação celular, principalmente na região da coifa das raízes.

Em diversos trabalhos têm sido demonstrado alterações anatômicas em raízes de plantas expostas a níveis tóxicos de As. Essas alterações incluem principalmente um alto nível de desestruturação e morte celular que pode estar associada com o estresse oxidativo provocado pelo As (Singh, 2007; Silva, 2008; Barbosa, 2009).

A análise em microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raio-X (EDS) permitiu a estimativa dos teores dos elementos As, fósforo (P) e enxofre (S) nas camadas mais externas dos ápices radiculares. O incremento nos teores relativos de As em ápices radiculares indicam sua deposição nas camadas mais externas das raízes de *L.*

punctata tratadas com As. Uma vez que o As e o P competem pelo mesmo sítio de absorção (Fayiga, et al., 2008), espera-se que um aumento no teor relativo de As poderia acarretar uma redução no teor relativo de P, o que não foi observado no experimento. Isso poderia ser devido ao fato de que o As não afetou a absorção de P ou o tempo de exposição das plantas ao tratamento foi insuficiente para promover alterações nos teores de P. A redução nos teores relativos de S nas camadas mais externas dos ápices radiculares de plantas tratadas com As pode estar relacionado a rápida absorção desse elemento para a sua incorporação na constituição de compostos tiólicos.

6. CONCLUSÃO

A espécie *L. punctata* foi capaz de absorver e acumular elevadas concentrações de As, o que acarretou aumento na concentração de intermediários reativos de oxigênio (ROI). Esse aumento proporcionou danos diretos e indiretos em plantas como redução da atividade de enzimas do sistema antioxidante, aumento na peroxidação de lipídios, além de alterações na micromorfologia das raízes.

Houve aumento nas concentrações de antioxidantes não enzimáticos (antocianinas e tióis protéicos), podendo, esses mecanismos, atuar aliviando os danos causados pelo As.

A exposição ao As acarretou aumento nos teores relativos de As, redução no de enxofre e manutenção nos de fósforo em ápices radiculares de *L. punctata*.

7. BIBLIOGRAFIA

- Agency for Toxic Substances & Disease Registry** (2011) Priority list of hazardous substances. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>>. Acesso em 6 de agosto de 2012
- Alfadul SMS, Al-Fredan MAA** (2013) Effects of Cd, Cu, Pb, and Zn combinations on *Phragmites australis* metabolism, metal Accumulation and distribution. *Arabian Journal for Science and Engineering* **38** 11-19
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1331-1341
- Anderson JV, Davis DG** (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
- 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
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399
- Apeti DA, Whitall DR, Pait AS, Dieppa A, Zitello AG, Lauenstein GG** (2012) Characterization of land-based sources of pollution in Jobos Bay, Puerto Rico: status of heavy metal concentration in bed sediment. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**: 811-830
- Bai JH, Xiao R, Zhang, KJ, Gao HF** (2012) Arsenic and heavy metal pollution in wetland soils from tidal freshwater and salt marshes before and after the flow-sediment regulation regime in the Yellow River Delta, China. *Journal of Hydrology* **450**: 244-253
- Barbosa AP** (2009) Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade Federal de Viçosa
- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287
- Bhaduri AM, Fulekar MH** (2012) Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* **11**: 55-69
- Boguszewska D, Grudkowska M, Zagdanska B** (2010) Drought-responsive antioxidant enzymes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research* **53**: 373-382
- Boveris A** (1984) Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods in Enzymology* **105**: 429-435
- Carlberg I, Mannervik B** (1985) Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* **113**: 484-495
- Chance B, Maehley AC** (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology New York* **2**: 764-755
- Clark RB** (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal Agricultural Food Chemistry* **23**: 458-460

- Das N, Paul S, Chatterjee D, Banerjee N, Majumder NS, Sarma N, Sau TJ Basu S, Banerjee S, Majumder P, Bandyopadhyay AK, States JC, Giri AK** (2012) Arsenic exposure through drinking water increases the risk of liver and cardiovascular diseases in the population of West Bengal, India. *BMC Public Health* **12**: 639
- Dai LP, Dong XJ, Ma HH** (2012) Antioxidative and chelating properties of anthocyanins in *Azolla imbricata* induced by cadmium. *Polish Journal of Environmental Studies* **21**: 837-844
- Duman F, Ozturk F, Aydin Z** (2010) Biological responses of duckweed (*Lemna minor* L.) exposed to the inorganic arsenic species As(III) and As(V): effects of concentration and duration of exposure. *Ecotoxicology* **19**: 983-993
- Ershova NA, Popova NV, Berdnikova OS** (2011) Production of reactive oxygen species and antioxidant enzymes of pea and soybean plants under hypoxia and high CO₂ concentration in medium. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**: 982-990
- Fayiga AO, Ma LQ, Rathinasabapathi B** (2008) Effects of nutrients on arsenic accumulation by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental and Experimental Botany* **62**: 231-237
- Ferreira DF** (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium (Lavras)* **6**: 36-41
- 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
- Gay C, Gebicki JM** (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xynlenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry* **284**: 217-220
- George CM, Graziano JH, Mey JL, van Geen A** (2012) Impact on arsenic exposure of a growing proportion of untested wells in Bangladesh. *Environmental Health* **11**: 7
- 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
- Gould KS, McKelvie J, Markham KR** (2002) Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell and Environment* **25**: 1261-1269
- Havir EA, Mchale NA** (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* **84**: 450-455
- 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
- Hoque MA, McArthur JM, Sikdar PK** (2012) The palaeosol model of arsenic pollution of groundwater tested along a 32 km traverse across West Bengal, India. *Science of the Total Environment* **431**: 157-165
- Iavazzo P, Ducci D, Adamo P, Trifuoggi M, Migliozi A, Boni M** (2012) Impact of past mining activity on the quality of water and soil in the High Moulouya Valley (Morocco). *Water Air and Soil Pollution* **223**: 573-589

- Kamperidou I, Vasilakakis M** (2006) Effect of propagation material on some quality attributes of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, var. Selva). *Scientia Horticulturae* **107**: 137-142
- Kar M, Mishra D** (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* **57**: 315-319
- Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K, Kim W** (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* **5**: 709-725
- Keshavarzi B, Moore F, Rastmanesh F, Kermani M** (2012) Arsenic in the Muteh gold mining district, Isfahan, Iran. *Environmental Earth Sciences* **67**: 959-970
- Khang HV, Hatayama M, Inoue C** (2012) Arsenic accumulation by aquatic macrophyte coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) exposed to arsenite, and the effect of iron on the uptake of arsenite and arsenate. *Environmental and Experimental Botany* **83**: 47-52
- Kirschbaum A, Murray J, Lopez E, Equiza A, Arnosio M, Boaventura G** (2012) The environmental impact of *Aguilar mine* on the heavy metal concentrations of the Ya coraite River, Jujuy Province, NW Argentina. *Environmental Earth Sciences* **65**: 493-504
- 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) Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum* **46**: 149-152
- Lahive E, O'Callaghan MJA, Jansen MAK, O'Halloran J** (2011) Uptake and partitioning of zinc in Lemnaceae. *Ecotoxicology* **20**: 1992-2002
- Lahive E, O'Halloran J, Jansen MAK** (2012) Frond development gradients are a determinant of the impact of zinc on photosynthesis in three species of Lemnaceae. *Aquatic Botany* **101**: 55-63
- Larios R, Fernandez-Martinez R, Silva V, Loredó J, Rucandio I** (2012) Arsenic contamination and speciation in surrounding waters of three old cinnabar mines. *Journal of Environmental Monitoring* **14**: 531-542
- Lokhande VH, Srivastava S, Patade VY, Dwivedi S, Tripathi RD, Nikam TD, Suprasanna P** (2011) Investigation of arsenic accumulation and tolerance potential of *Sesuvium portulacastrum* (L.) L.. *Chemosphere* **82**: 529-534
- Liu Q, Zheng C, Hu CX, Tan Q, Sun XC, Su JJ** (2012) Effects of high concentrations of soil arsenic on the growth of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and rape (*Brassica napus*). *Plant Soil and Environment* **58**: 22-27
- Maheshwari R, Dubey RS** (2009) Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **59**: 37-49
- Matschullat J, Birmann K, Borba RP, Ciminelli V, Deschamps EM, Figueiredo BR, Gabrio T, HaBler S, Hilscher A, Jungha I, de Oliveira N, RaBbach K, Schmidt H, Schwenk M, de Oliveira Vilhena MJ, Weidner U** (2007) Long-term environmental impact of arsenic-dispersion in Minas Gerais, Brazil. *Arsenic in Soil and Groundwater Environment* **9**: 365-382
- McGrath SP, Zhao FJ** (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 277-282

- Meuwly P, Rauser WE** (1992) Alteration of thiol pool in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Physiology* **99**: 8-15
- Misra HP, Fridovich I** (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *The Journal of Biological Chemistry* **246**: 6886-6890
- Mkandawire M, Durel EG** (2005) Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Science of the total Environment* **336**: 81-89
- Mohammadi M, Karr AL** (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *Journal Plant Physiology* **158**: 1023-1029
- Moller IM, Sweetlove LJ** (2010) ROS signalling – specificity is required. *Trends in Plant Science* **15**: 370-374
- 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
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH** (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1283-1304
- 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
- Phuong NM, Kang YM, Sakurai K, Sugihara M, Kien CN, Bang ND, Ngoc HM** (2012) Arsenic contamination in groundwater and its possible sources in Hanam, Vietnam. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**: 4501-4515
- Prado C, Pagano E, Prado F, Rosa M** (2012) Detoxification of Cr(VI) in *Salvinia minima* is related to seasonal-induced changes of thiols, phenolics and antioxidative enzymes. *Journal of Hazardous Materials* **239**: 355-361
- Requejo R, Tena M** (2012) Influence of glutathione chemical effectors in the response of maize to arsenic exposure. *Journal of Plant Physiology* **169**: 649-656
- Sanchez-Viveros G, Ferrera-Cerrato R, Alarcon A** (2011) Short-term effects of arsenate-induced toxicity on growth, chlorophyll and carotenoid contents, and total content of phenolic compounds of *Azolla filiculoides*. *Water Air and Soil Pollution* **217**: 455-462
- Shi YF, Wei YD, QU SS, Wang Y, Li YL, Li RG** (2010) Arsenic induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells through mitochondrial pathways. *Cardiovascular Toxicology* **10**: 153-160
- Silva KLF** (2008) Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio. Tese (Doutorado em Botânica)- Universidade Federal de Viçosa
- Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K** (2007) Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation* **53**: 65-73

- Singh KP, Kumari R, Treas J, DuMond JW** (2011) Chronic exposure to arsenic causes increased cell survival, DNA damage, and increased expression of mitochondrial transcription factor A (mtTFA) in human prostate epithelial cells. *Chemical Research Toxicology* **24**: 340-349
- Skladanka J, Adam V, Zitka O, Krystofova O, Beklova M, Kizek R, Havlicek Z, Slama P, Nawrath A** (2012) Investigation into the effect of molds in grasses on their content of low molecular mass thiols **9**: 3789-3805
- Srivastava M, Ma LQ, Rathinasabapathi B, Srivastava P** (2009) Effects of selenium on arsenic uptake in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L.. *Bioresource Technology* **100**: 1115-1121
- Sonali P, Tulika C, Ajanta H, Debasis B, Utpal C, Madhusnata D** (2011) Association of genotoxic effects of arsenic with haematological malignancy in West Bengal. *Human and Experimental Toxicology* **30**: 165-170
- Song A, Li P, Li ZJ, Fan FL, Nikolic M, Liang YC** (2011) The alleviation of zinc toxicity by silicon is related to zinc transport and antioxidative reactions in rice. *Plant and Soil* **344**: 319-333
- Sood A, Uniyal PL, Prasanna R, Ahluwalia AS** (2012) Phytoremediation potential of aquatic macrophyte, *Azolla*. *AMBIO* **41**: 122-137
- Su CC, Lu JL, Tsai KY, Lian IB** (2011) Reduction in arsenic intake from water has different impacts on lung cancer and bladder cancer in an arseniasis endemic area in Taiwan. *Cancer Causes and Control* **22**: 101-108
- 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 in Biotechnology* **25**: 158-165
- Varcjao EVV, Bellato, CR, Fontes MPF, Mello JWV** (2011) Arsenic and trace metals in river water and sediments from the southeast portion of the Iron Quadrangle, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment* **171**: 631-642
- Yadav SK** (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* **76**: 167-179
- Yin YL, Borges G, Sakuta M, Crozier A, Ashihara H** (2012) Effect of phosphate deficiency on the content and biosynthesis of anthocyanins and the expression of related genes in suspension-cultured grape (*Vitis* sp.) cells. *Plant Physiology and Biochemistry* **55**: 77-84
- Zhang X, Zhao FJ, Huang Q, Williams PN, Sun GX, Zhu YG** (2009) Arsenic uptake and speciation in the rootless duckweed *Wolffia globosa*. *New Phytologist* **182**: 421-428
- 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