

HELOÍSA MONTEIRO DE ANDRADE

ÓXIDO NÍTRICO E TOLERÂNCIA AO ARSÊNIO EM AGUAPÉ

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural,
para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

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

T

A553o
2011

Andrade, Heloísa Monteiro de, 1982-
Óxido nítrico e tolerância ao arsênio em aguapé / Heloísa
Monteiro de Andrade. – Viçosa, MG, 2011.
vii, 30f. : il (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 26-30

1. *Eichhornia crassipes*. 2. Óxido nítrico. 3. Arsênio –
Testes de toxicidade. 4. Arsênio. 5. Testes de toxicidade.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 584.86

HELOÍSA MONTEIRO DE ANDRADE

ÓXIDO NÍTRICO E TOLERÂNCIA AO ARSÊNIO EM AGUAPÉ

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural,
para obtenção do título de
Magister Scientiae.

Aprovada: 16 de fevereiro de 2011

Prof. João Marcos de Araújo

Prof^a. Luzimar Campos da Silva

Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro concedido. Agradeço também à Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia geral, pela oportunidade de realização deste trabalho. Meus agradecimentos se estendem também ao Professor Juraci Alves de Oliveira, pela orientação e, aos demais professores, funcionários e amigos que me auxiliaram durante as etapas do trabalho.

BIOGRAFIA

Heloísa Monteiro de Andrade, filha de Maria Lúcia Monteiro de Andrade e Francisco Eduardo Nóbrega de Andrade, nasceu em 16 de junho de 1982, na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

Em dezembro de 2007 graduou-se em Ciências Biológicas, licenciatura, pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras Santa Marcelina, na cidade de Muriaé, MG.

Iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2008 e, em fevereiro de 2011 submeteu-se à defesa de dissertação.

CONTEÚDO

Página

| | |
|--|-----|
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Revisão de literatura | 3 |
| 3. Hipótese | 6 |
| 4. Objetivos | 6 |
| 5. Material e métodos | 7 |
| 5.1. Obtenção, aclimação e exposição das plantas ao arsenato e ao nitroprussiato de sódio (SNP)..... | 7 |
| 5.2. Determinação da concentração interna de arsênio | 7 |
| 5.3. Determinação do Fator de Translocação (FT) | 7 |
| 5.4. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio | 8 |
| 5.5. Determinação da concentração de ânion superóxido..... | 8 |
| 5.6. Avaliação da peroxidação de lipídeos | 9 |
| 5.7. Detecção da integridade da membrana plasmática em células de raiz | 9 |
| 5.8. Determinação de atividades enzimáticas | 9 |
| 5.8.1. Determinação da atividade da dismutase do superóxido | 10 |
| 5.8.2. Determinação da atividade da catalase | 10 |
| 5.8.3. Determinação da atividade das peroxidases | 10 |
| 5.9. Delineamento experimental e análise estatística | 11 |
| 6. Resultados..... | 12 |
| 6.1. Sintomatologia visual | 12 |
| 6.2. Acúmulo de arsênio na raiz e parte aérea | 13 |
| 6.3. Fator de Translocação | 14 |
| 6.4. Efeito do arsênio e do óxido nítrico na concentração de intermediários reativos de oxigênio | 15 |
| 6.5. Acúmulo de malonaldeído | 16 |
| 6.6. Efeito do arsênio e do óxido nítrico na integridade da membrana plasmática em células de raiz | 17 |
| 6.7. Efeito do arsênio e do óxido nítrico na atividade de enzimas antioxidativas | 18 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 7. Discussão | 21 |
| 8. Conclusão | 25 |
| 9. Referências bibliográficas | 26 |

RESUMO

ANDRADE, Heloísa Monteiro de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2011. **Óxido nítrico e tolerância ao arsênio em aguapé.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Co-orientador: José Lino Neto.

Plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) foram submetidas a níveis tóxicos de arsênio (As) com o objetivo de induzir o estresse oxidativo e avaliar o papel do óxido nítrico (NO), fornecido via nitroprussiato de sódio (SNP), como agente atenuante desse estresse. As plantas foram tratadas com 20 μM de As, com ou sem SNP, na concentração de 100 μM , adicionados à solução nutritiva, durante 24 horas. A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e malonaldeído (MDA) foram determinadas, além da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e a concentração interna de As. A integridade de membrana da raiz foi inferida através de coloração utilizando-se solução de Azul de Evans. A presença do SNP em conjunto com o As resultou em maiores concentrações desse metaloide nas raízes e maior translocação para as folhas. Apesar disso, a concentração de H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e MDA foi menor em comparação com as plantas tratadas apenas com As, assim como a atividade das enzimas SOD e POX. Porém, a CAT apresentou maior atividade nas etapas iniciais de tratamento. O papel protetor do NO diminuiu os danos oxidativos induzidos por As, o que também ficou evidente a partir da coloração para a detecção da integridade da membrana plasmática. Assim, verificou-se que o NO, fornecido pelo SNP, ameniza a toxidez em raízes de aguapé induzida pelo As.

ABSTRACT

ANDRADE, Heloísa Monteiro de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Nitric oxide and tolerance to arsenic in water hyacinth.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-adviser: José Lino Neto.

Water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) were subjected to toxic levels of arsenic (As) in order to induce oxidative stress and assess the role of nitric oxide (NO), provided by the sodium nitroprusside (SNP), as agent for mitigating this stress. The plants were treated with As 20 μM , with or without SNP at a concentration of 100 μM , added to the nutrient solution for 24 hours. The concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and malonaldehyde (MDA) were determined, as well as the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) and the internal concentration of As. The membrane integrity of the root was inferred by staining using Evans Blue solution. The presence of SNP with As, resulted in higher concentrations of this metalloid on the roots and increased translocation to the leaves. Nevertheless, the concentration of H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ and the MDA was lower in comparison with plants treated only with As, as well as the activity of SOD and POX. However, CAT was most active in the early stages of treatment. The protective role of NO decreased the oxidative damage induced by As, which was also evident from the staining for detection of plasma membrane integrity. Thus, the NO, provided by the SNP, alleviates toxicity induced in roots of water hyacinth by As.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são, frequentemente, expostas a condições de estresses bióticos e abióticos e, para minimizar ou remediar, elas apresentam modificações em nível estrutural, bioquímico e de expressão gênica. Para tanto, o vegetal detecta precocemente a condição desfavorável e ativa cascatas de sinalização que levarão às respostas adequadas. Várias vias de sinalização de estresse já foram descritas na literatura, como as vias mediadas por cálcio (Berridge *et al.*, 2003) e as mediadas por cGMP (Meier *et al.*, 2009). Recentemente, estudos têm demonstrado o papel do óxido nítrico (NO) como mediador em várias vias de sinalização envolvidas na resistência a doenças, na morte celular, na senescência, no desenvolvimento da raiz, na germinação, nas respostas hormonais, no crescimento, na floração e nas respostas a estresses bióticos. Em relação à resposta a estresses abióticos, além do papel sinalizador, o NO possui poder antioxidante, como constatado em plântulas de arroz (Sing *et al.*, 2009) submetidas a diversos estresses, dentre eles, o arsênio (As).

O As é um metaloide encontrado naturalmente no ambiente, porém, devido a diversas atividades antrópicas, como a mineração, por exemplo, tem ocorrido acúmulo e consequente contaminação do solo e de águas superficiais e subterrâneas. A ingestão de água contaminada por As é a forma mais comum de exposição do homem à toxicidade desse elemento, que pode causar vários distúrbios fisiológicos e, em alguns casos, levar à morte (Dopp *et al.*, 2004). Atualmente, o desenvolvimento de tecnologias que possam remediar os ambientes contaminados tem sido utilizadas, dentre as quais, a fitorremediação, em que plantas possam atuar como fitorremediadoras. Algumas plantas aquáticas, como *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé), possuem capacidade de tolerância a diversos poluentes, como o As e, dessa forma, poderiam atuar como fitorremediadoras (Guimarães *et al.*, 2006; Agunbiade *et al.*, 2009).

Os mecanismos pelos quais as plantas toleram o As ainda não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que os sistemas antioxidativos, enzimáticos e não-enzimáticos, são de grande importância, uma vez que o principal dano causado pelo As é devido à geração de intermediários reativos de oxigênio (ROI's), com grande potencial de dano celular.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel do NO como agente atenuante dos efeitos tóxicos causados pelo As. Apesar de intensos estudos em relação

ao papel sinalizador do NO, ainda não se sabe exatamente as vias pelas quais o mesmo participa por ser uma molécula extremamente reativa e de curto tempo de vida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, com propriedades hidrofóbicas, que está implicado em diversos processos fisiológicos em animais e plantas. Seu papel biológico foi inicialmente demonstrado no mecanismo de relaxamento vascular e, desde então, várias pesquisas tem surgido em relação a esta molécula (Besson-Bard *et al.*, 2008).

O NO pode ser sintetizado, principalmente, pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS) que, apesar de ser bem caracterizada em animais, em plantas ainda não foi comprovada sua existência, porém a sua atividade tem sido detectada em vários tecidos vegetais (Guo *et al.*, 2003; Corpas *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2006; Leach *et al.*, 2010). Outra enzima envolvida na síntese de NO é a redutase do nitrato (NR) que possui função primordial de converter nitrato a nitrito para a assimilação de nitrogênio, mas pode também converter nitrito a NO, numa via dependente de NADPH, em resposta a estresse abiótico (Wang *et al.*, 2010).

Os efeitos diretos do NO, os quais requerem baixas concentrações, envolvem a interação com outros ligantes, sendo este mecanismo responsável pela ação fisiológica deste composto. Dentre os efeitos diretos, destaca-se a ligação com o grupamento heme, formando um complexo nitrosil-metálico, processo pelo qual a guanilil ciclase é ativada gerando cGMP. Apesar de relatado o aumento na concentração de cGMP em resposta a doadores de NO em plantas, a guanilil ciclase ainda não foi identificada (Durner *et al.*, 1998; Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007; Wang *et al.*, 2010).

Efeitos indiretos, decorrentes da interação de altas concentrações de NO com oxigênio (O₂) e ânion superóxido (O₂⁻), resultam na produção de compostos intermediários, altamente reativos, como o ânion peroxinitrito (ONOO⁻), que se difundem a distâncias consideráveis na célula e reagem com os grupos tióis de proteínas e radicais poliinsaturados de lipídeos da membrana (Wink e Mitchell, 1998). O peroxinitrito pode, ainda, gerar o dióxido de nitrogênio (NO₂) e o radical hidroxil (OH[•]) (Miranda *et al.*, 2000; Radi *et al.*, 2000; Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007).

O NO ou os compostos intermediários produzidos podem, ainda, interagir com o grupamento tiol da cisteína, num processo chamado de S-nitrosilação. Este é um importante mecanismo para a dinâmica e a regulação pós-traducional de muitas proteínas, tanto *in vitro* e *in vivo* (Stamler *et al.*, 2001; Lindermayr e Durner, 2009), tais como a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), metionina adenosiltransferase

(MAT) e metacaspase 9 (Bethke *et al.*, 2004; Lindermayr *et al.*, 2005; Besson-Bard *et al.*, 2008).

Os principais efeitos do NO, atualmente estudados, estão relacionados ao papel exercido como agente de sinalização celular, que parecem coexistir com as vias envolvendo íons cálcio, ADP ribose cíclica (cADPR) e proteínas quinases.

Em vegetais, provavelmente, ocorre mecanismo de sinalização similar àquele dos animais, em que o cADPR pode ser produzido imediatamente após a geração de cGMP, o que estimula a liberação de cálcio, numa cascata NO-cADPR-Ca²⁺. Além disso, o NO pode ativar vias de sinalização por MAPK (proteína quinase mitógeno ativada), o que resulta na alteração da expressão gênica (Pagnussat *et al.*, 2004). Com isso, ele participa de vários processos fisiológicos em plantas, tais como crescimento, desenvolvimento, fechamento estomático, floração, morte celular programada, dentre outros (Neill *et al.*, 2008).

As plantas estão constantemente expostas a estresses causados por fatores abióticos como luz, temperatura, água, salinidade e poluição, os quais causam desequilíbrio na célula entre a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI's) e a sua desintoxicação. Em contraste com o oxigênio molecular, os ROI's podem causar danos a macromoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), levando à destruição oxidativa da célula (Karenlampi *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2006; Barreiros *et al.*, 2006). Para evitar os danos celulares, as plantas possuem mecanismos de respostas rápidos que incluem as defesas antioxidantes enzimáticas (catalase, dismutase do superóxido e peroxidases) e não enzimáticas (glutationa, ascorbato e carotenóides) (Halliwell, 2006). Entretanto, a percepção do estresse e o desencadeamento das respostas celulares requerem a participação de agentes sinalizadores, onde o NO tem atuado nas respostas a estresses causados por cobre (Yu *et al.*, 2005), alumínio (Wang e Yang, 2005), cádmio (Sing *et al.*, 2008; Valentovicová *et al.*, 2010) e arsênio (Singh *et al.*, 2009).

Apesar dos mecanismos pelos quais as plantas percebem e respondem ao NO estejam pouco elucidados, diversos resultados sugerem que este radical esteja envolvido no aumento das respostas antioxidativas em algumas espécies de plantas, resultando na redução de danos celulares causados por ROI's. Além disso, o NO parece mediar e ativar a expressão de genes de enzimas antioxidativas, alterando a expressão gênica por interação direta com fatores de transcrição por S-nitrosilação, ou então, ativando a rota de sinalização que irá afetar os fatores de transcrição no final da rota (Neill *et al.*, 2003; Grün, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que o NO fornecido de forma exógena, através de moléculas doadoras como o nitroprussiato de sódio (SNP), apresentam efeitos atenuantes de estresse causado por diversos agentes químicos (Yu *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008, 2009). O SNP, $(\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O})$, é uma molécula inorgânica que não atravessa as membranas celulares, mas é capaz de liberar NO, que por sua vez, entra nas células onde atua. A liberação de NO, neste caso, é acompanhada pela liberação de cianeto, o que pode levar à toxicidade celular. Além disso, pode haver ainda a produção de peroxinitrito e peróxido de hidrogênio, dependendo da dose aplicada (Wang *et al.*, 2002). Apesar disso, dentre as moléculas doadoras de NO, o SNP tem demonstrado os melhores resultados (Murgia *et al.*, 2004).

3. HIPÓTESE

A espécie vegetal *Eichhornia crassipes*, apresentará respostas mediadas pelo óxido nítrico, com redução nos teores de substâncias oxidantes e aumento significativo nos mecanismos de tolerância, após tratamento com arsênio.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais:

Avaliar a participação do óxido nítrico como agente atenuante das alterações bioquímicas relacionadas à tolerância de *Eichhornia crassipes* ao arsênio.

4.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o papel sinalizador do óxido nítrico, os oxidantes e os mecanismos antioxidantes em raízes de *Eichhornia crassipes* expostas ao arsênio.

2. Caracterizar, mediante análise histoquímica, a ação atenuante do NO em raízes de *Eichhornia crassipes*, após exposição ao arsênio.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção, aclimação e exposição das plantas ao arsenato e ao nitroprussiato de sódio (SNP)

Plantas aquáticas de aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms), obtidas na estação de piscicultura da Universidade Federal de Viçosa, foram aclimatadas por seis dias em recipientes de polietileno (0,35 x 0,30 x 0,17 m), contendo 10 L de solução nutritiva de Clark (1975), pH 6,5, em sala de crescimento de plantas, com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C, $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sob fotoperíodo de 16 horas, sendo a solução nutritiva trocada a cada três dias.

Após o período de aclimação, amostras com aproximadamente 10 g de plantas, receberam diferentes tratamentos: (a) solução nutritiva, como controle; (b) solução nutritiva com nitroprussiato de sódio (SNP) (100 μM); (c) solução nutritiva com arsênio (As), na forma de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 μM); (d) As (20 μM) com SNP (100 μM). Após 0, 4, 12 e 24 horas do início dos tratamentos foi feita a avaliação visual dos danos, com registro fotográfico, seguido da remoção dos ápices das raízes lavados por 30 s em água corrente e desionizada, seguido de armazenamento a -80°C , antes das análises bioquímicas.

5.2. Determinação da concentração interna de arsênio

As plantas, separadas em raízes e parte aérea, a cada período de exposição, foram secas em estufa e, então submetidas à mineralização úmida com 3 mL de mistura nítrico-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). Amostras mineralizadas foram diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, analisadas por espectrofotometria de absorção atômica (Modelo AA-6701F, Shimadzu Corporation, Japão) com geração de hidreto, para determinação dos teores de As.

5.3. Determinação do Fator de Translocação (FT)

O fator de translocação (FT) foi calculado através da seguinte equação: $\text{FT} = C_{\text{PA}}/C_{\text{R}}$, em que: C_{PA} = concentração de As na parte aérea, em mg g^{-1} MS; C_{R} = concentração de As na raiz, em mg g^{-1} MS (Zhao *et al.*, 2009), em cada período de exposição.

5.4. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

Amostras de 200 mg de ápices radiculares foram trituradas em nitrogênio líquido, em seguida homogeneizadas em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração através de 4 camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 xg, por 15 min, a 4°C, coletando-se o sobrenadante (Kuo e Kao, 2003).

Alíquotas de 50 µl do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de FeNH₄(SO₄) 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorvância determinada a 560 nm. Brancos para as cores dos reagentes e dos extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. As concentrações de H₂O₂ nas amostras foram estimadas com base em curva de calibração.

5.5. Determinação da concentração de ânion superóxido

Foram coletados de 50 mg de ápices radiculares sem a coifa, com aproximadamente 1 cm e então, cortados em pequenos segmentos e incubados em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (Na₂EDTA) 100 µM, β-nicotinamida adenina nucleótido reduzida (NADH) 20 µM e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). Os tubos, tipo “penicilina”, foram hermeticamente fechados e a reação iniciada pela introdução de 100 µL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, usando-se seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 min, os segmentos radiculares foram removidos e, a partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura da absorvância 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 determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 4,0 x 10³ M⁻¹ (Boveris, 1984).

5.6. Avaliação da peroxidação de lipídeos

A avaliação da peroxidação de lipídeos foi feita pela quantificação de malonaldeído (MDA). Para isto, amostras de 200 mg de tecidos da raiz foi homogeneizada com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) e centrifugado a 10.000 xg por 20 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20%. A mistura foi incubada em água fervente por 30 minutos e a reação interrompida pela colocação dos tubos de reação em um banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg durante 5 min, e a absorvância do sobrenadante lida a 532 nm e corrigida para a não-específica absorvância a 600 nm. A quantidade de complexo MDA-TBA (pigmento vermelho) foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath e Packer, 1968).

5.7. Detecção da integridade da membrana plasmática em células de raiz

A integridade da membrana plasmática em células da raiz foi detectada através de coloração utilizando Azul de Evans, sendo que, as mais danificadas, o corante penetra corando-as de azul intenso.

As raízes sem coifa, foram incubadas em 10 mL de solução Azul de Evans (0,025%, p/v, em CaCl_2 100 μM , pH 5,6) por 30 min. Em seguida, foram lavadas de três a quatro vezes, com um volume suficiente de água destilada e observadas sob um Estereoscópio Trinocular (modelo SZH10, Olympus), equipado com um sistema de imagem digital (Yamamoto *et al.*, 2001).

5.8. Determinação de atividades enzimáticas

Amostras de 300 mg de raiz foram maceradas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato bruto na determinação da atividade das enzimas.

As atividades enzimáticas foram expressas com base nos teores de proteínas determinados pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se BSA como padrão.

5.8.1. 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 bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo *et al.*, 1993). A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual tempo, serviu de branco e foi subtraída da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

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

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e McHale, 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson *et al.*, 1995) e expresso em µM de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

5.8.3. Determinação da atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 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 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 mM cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μM de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

5.9. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 4 tratamentos e 3 repetições, sendo que cada unidade experimental consistiu de 2 plantas por vaso. Os dados foram coletados em 4 tempos (0, 4, 12, 24 horas) e analisados através de regressão utilizando o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da Universidade Federal de Viçosa (SAEG) da Fundação Arthur Bernardes, versão 9.0.

6. RESULTADOS

6.1. Sintomatologia visual

A observação das plantas de aguapé submetidas ao As revelou que os sintomas da toxidez tornaram-se visíveis a partir de 12 horas de exposição, com início de clorose marginal que progrediu na lâmina foliar ao longo do tempo. Ao final de 24 horas de exposição, as plantas apresentaram sintomas severos de toxidez, semelhantes a déficit hídrico, com murcha e seca em quase todas as folhas (Figura 1).

As plantas expostas ao As, em conjunto com SNP, também apresentaram sintomas de toxidez a partir de 12 horas de exposição, assim como aquelas expostas ao As, porém, ao final de 24 horas de tratamento, os sintomas foram menos severos, de forma que poucas folhas apresentaram aspecto de murcha e seca, enquanto as demais apenas apresentavam início de clorose.

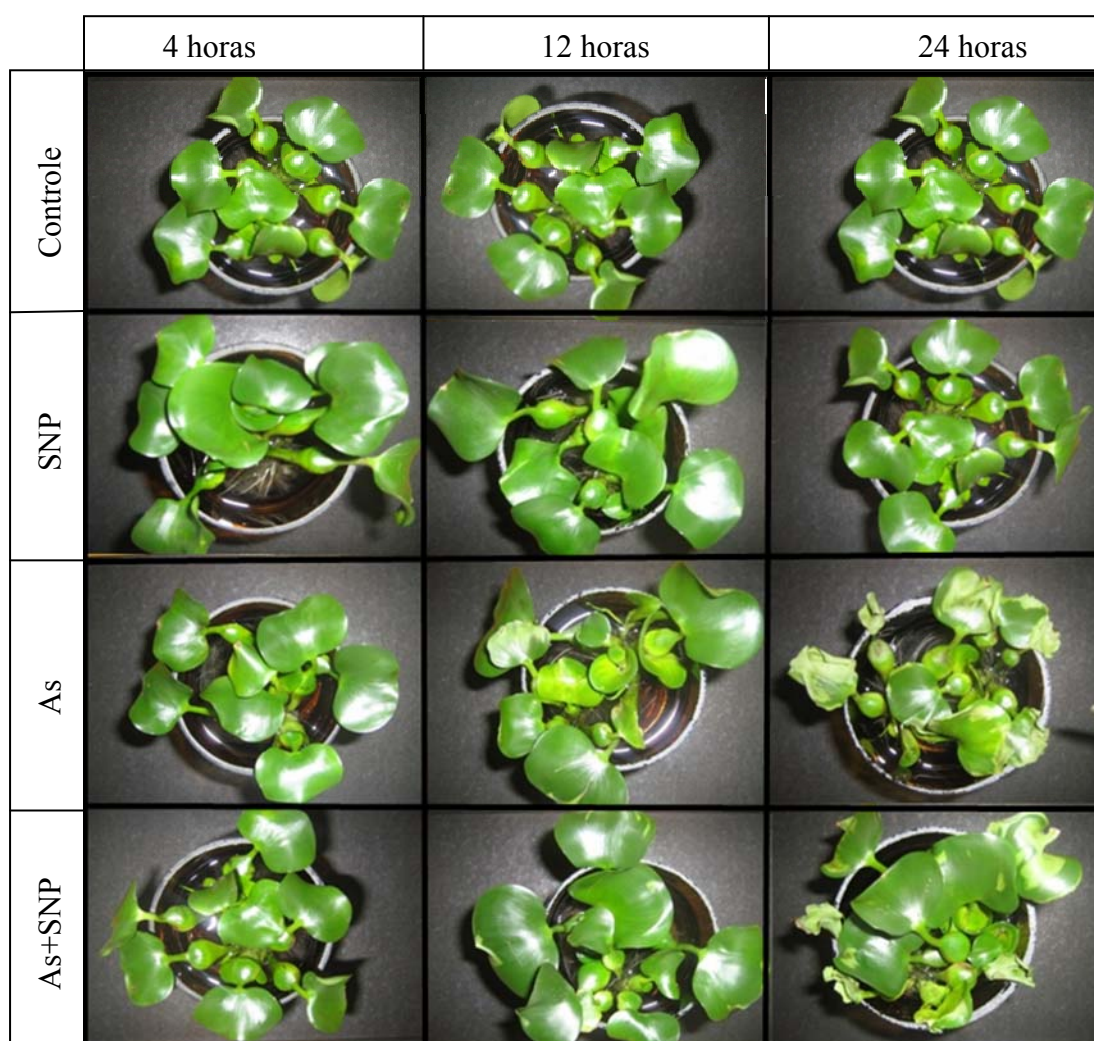


Figura 1: Sintomatologia visual de plantas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms submetidas a diferentes tratamentos.

6.2. Acúmulo de As na raiz e parte aérea

O aguapé absorve o As de forma rápida, de tal forma que, em 4 horas de exposição, foi possível detectar significativa concentração interna de As.

A concentração de As foi maior nas raízes (Figura 2A), mas com rápida translocação para as folhas (Figura 2B). Em ambos os casos, raízes e folhas, observou-se tendência à estabilização do acúmulo de As após 16 horas de exposição.

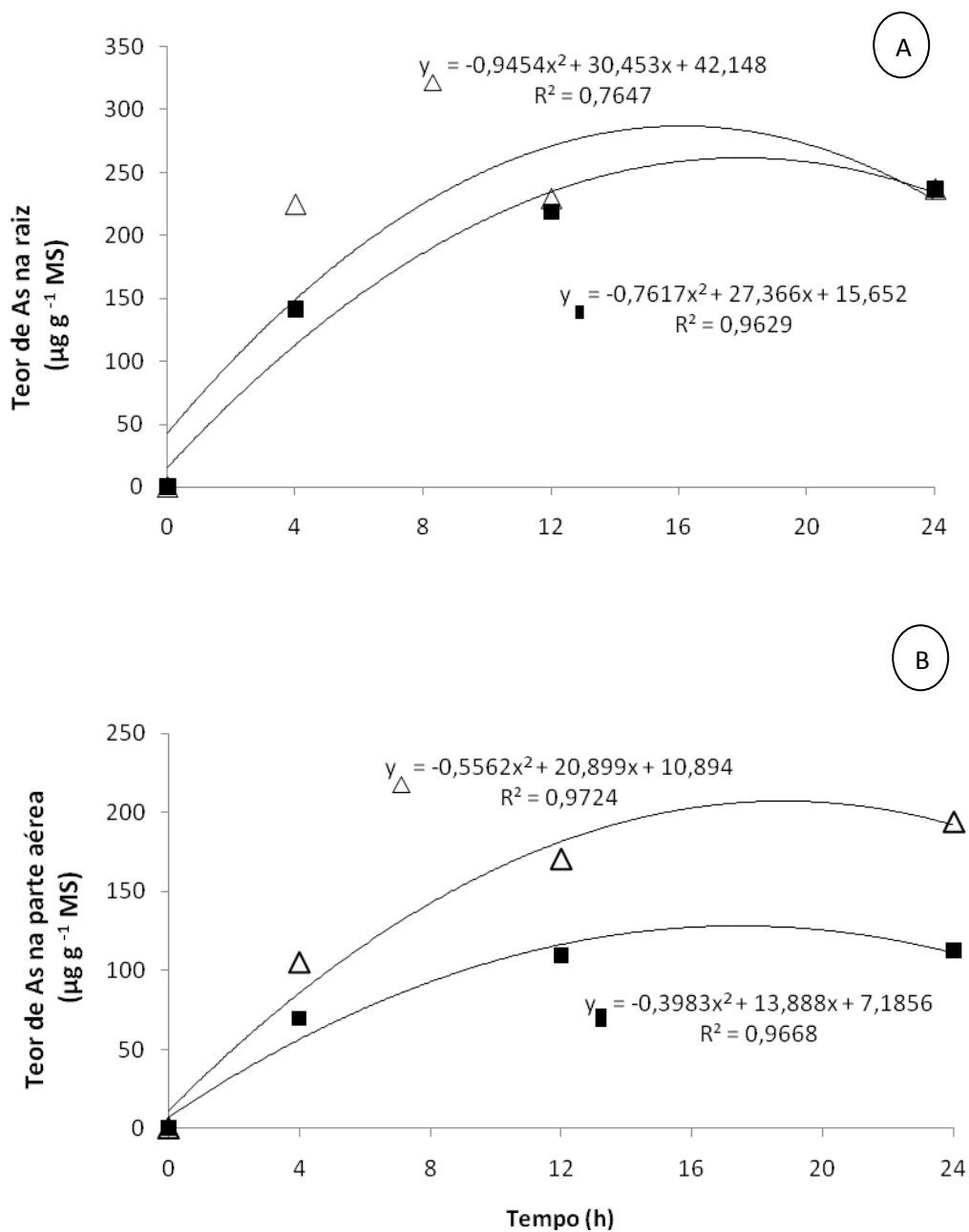


Figura 2 – Concentração de As na raiz (A) e na parte aérea (B) de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms expostas aos tratamentos com As (■) e As+SNP (△).

A presença do SNP em solução, juntamente com o As, resultou em maiores concentrações de As nas raízes e nas folhas. Ao longo do tempo de exposição, a presença do SNP possibilitou aumento significativo na translocação do As absorvido para as folhas, alcançando concentração 73,9% maior do que aquela observada em plantas expostas apenas ao As, após o final de 24 horas de exposição.

6.3. Fator de Translocação

Nas plantas expostas apenas ao As verificou-se que o Fator de Translocação (FT) manteve-se praticamente estável ao longo do tempo, ao passo que, no tratamento As+SNP houve incremento do FT ao longo do tempo, indicando maior translocação desse elemento das raízes para as folhas (Figura 3).

Com o decorrer do tempo de exposição, observou-se que as diferenças entre os tratamentos com As se tornaram mais acentuadas, atingindo ao final de 24 horas, valores de FT nas plantas expostas ao As+SNP cerca de 100% maiores do que nas plantas expostas ao As.

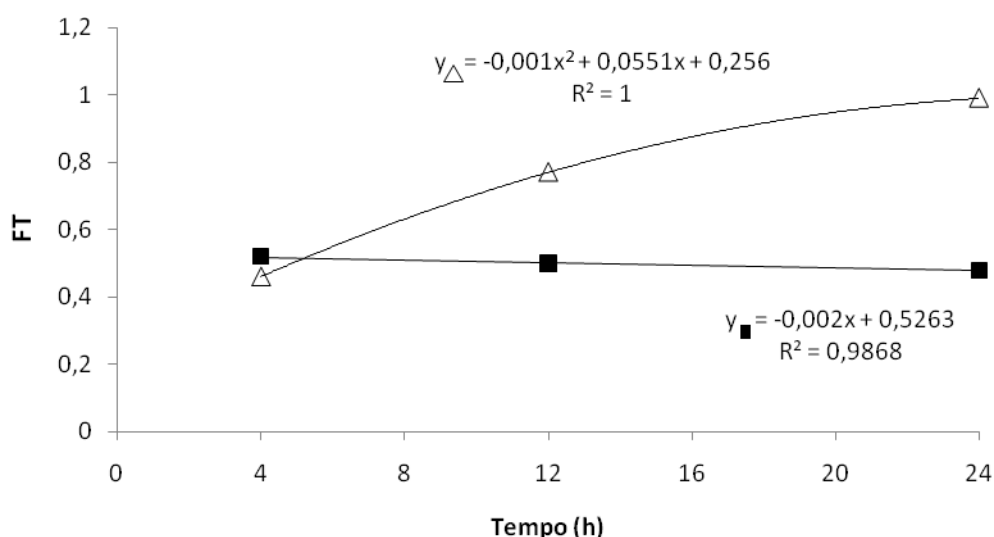


Figura 3 – Fator de Translocação (FT) de plantas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms expostas aos tratamentos com As (■) e As+SNP (Δ).

6.4. Efeito do As e do NO na concentração de intermediários reativos de oxigênio

6.4.1 Concentração de peróxido de hidrogênio

A exposição de plantas ao As resultou em aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com o decorrer do tempo. No entanto, a presença do SNP foi capaz de reverter esse acréscimo após 14 horas de exposição. Ao final de 24 horas, verificou-se que a concentração de H_2O_2 foi 24% menor nas plantas expostas ao As+SNP em relação às plantas expostas ao As (Figura 4).

Isoladamente, o SNP não teve influência significativa na concentração de H_2O_2 , permanecendo os valores aproximadamente iguais aos das plantas controle.

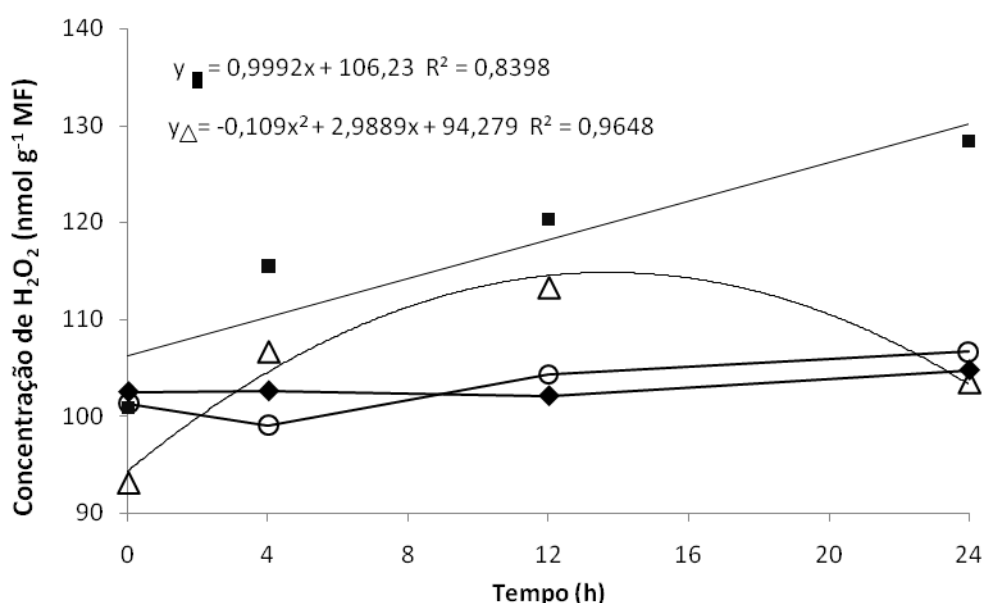


Figura 4 – Concentração de H_2O_2 em raízes de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms expostas aos tratamentos: Controle (◆), SNP (○), As (■) e As+SNP (△).

6.4.2 Concentração de ânion superóxido

A concentração do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) aumentou com a exposição ao As, sendo que este aumento acentuou-se com o decorrer do tempo. No tratamento onde se adicionou o SNP à solução com As, também houve aumento na concentração de $O_2^{\cdot-}$, porém se manteve abaixo do tratamento com apenas As (Figura 5). No tratamento contendo apenas o SNP, as concentrações de $O_2^{\cdot-}$ se mantiveram semelhantes ao do controle.

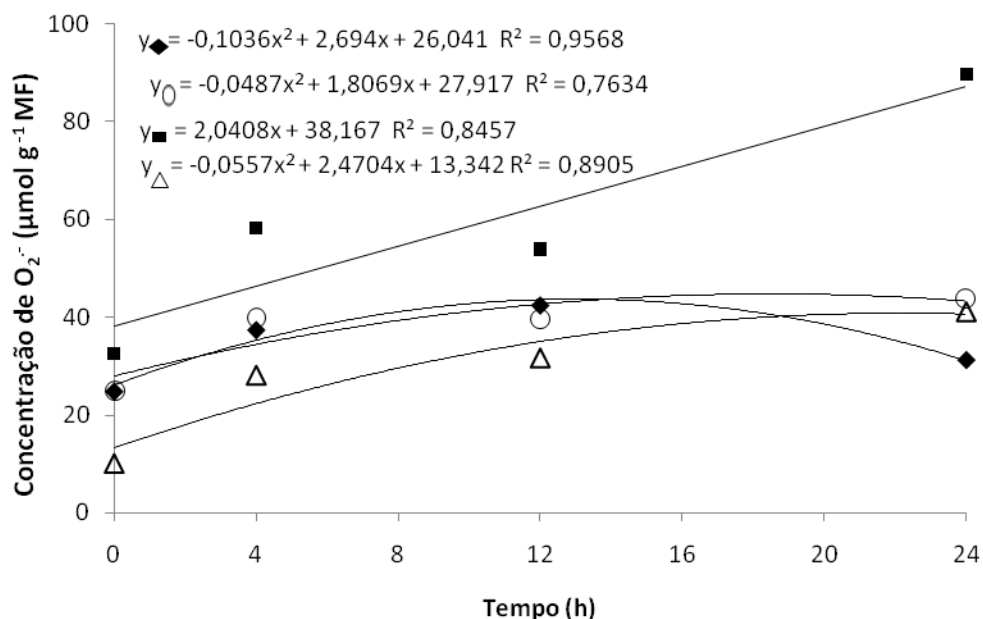


Figura 5 – Concentração de O_2^- em raízes de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms expostas aos tratamentos: Controle (◆), SNP (○), As (■) e As+SNP (△).

6.5. Acúmulo de Malonaldeído (MDA)

O grau de peroxidação lipídica nas raízes de aguapé, quando submetidas ao As, foi maior comparado aos demais tratamentos, com acentuado incremento a partir de 12 horas de exposição. Ao final das 24 horas de exposição ao As, a concentração de MDA alcançou valor 50 vezes maior do que aquele obtido no início do tratamento. A presença do SNP no meio contendo As foi determinante na manutenção dos baixos valores da concentração de MDA, indicativo de preservação da integridade das membranas (Figura 6). A adição de SNP isoladamente não causou significativa alteração na concentração de MDA, permanecendo próximo àqueles valores observados no controle.

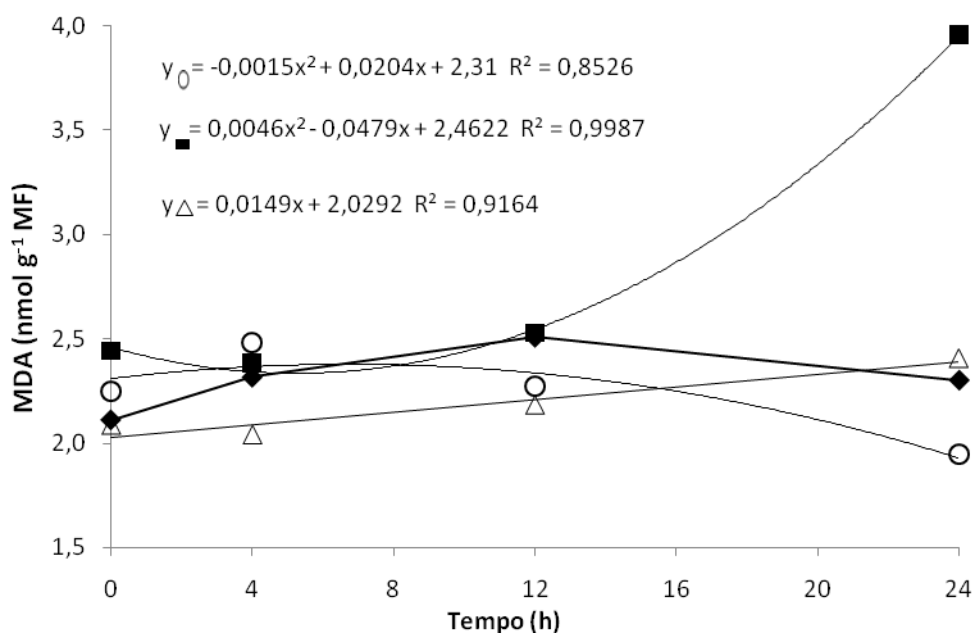


Figura 6 – Concentração de MDA em raízes de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms expostas aos tratamentos: Controle (◆), SNP (○), As (■) e As+SNP (△).

6.6. Efeito do As e do NO na integridade da membrana plasmática em células de raiz

A raiz exposta ao As revelou danos causados à integridade de membrana, visualizado por meio da coloração azul mais intensa no ápice radicular. A presença do SNP, juntamente com o As, tornou esse dano menos intenso, conforme observação da coloração mais tênue do ápice das raízes (Figura 7).

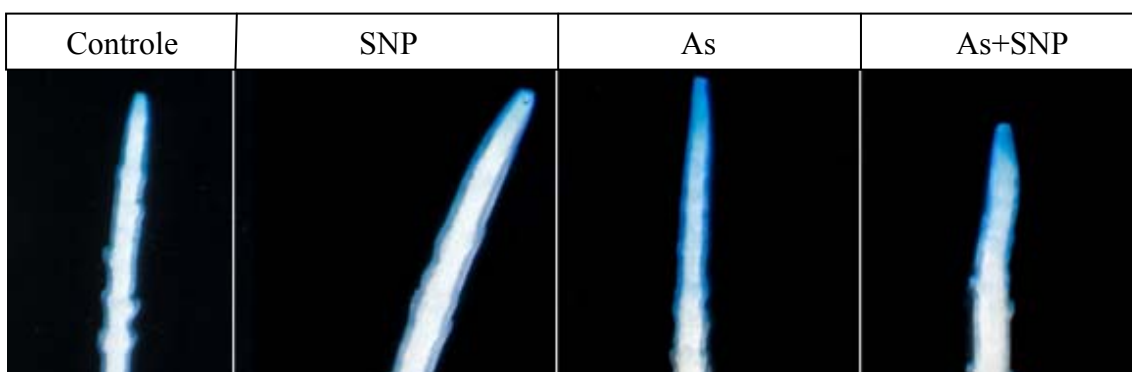


Figura 7: Coloração com Azul de Evans mostrando o efeito da exposição de raízes de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms aos tratamentos por 24 horas.

6.7. Efeito do As e do NO na atividade de enzimas antioxidantes

6.7.1 Dismutase do Superóxido (SOD)

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) nas plantas expostas ao As foi, ao longo de 24 horas de exposição, significativamente maior do que aquela observada em plantas expostas ao As+SNP. O maior incremento na atividade da SOD em plantas expostas ao As, ocorreu a partir de 12 horas de exposição, ao passo que, no tratamento de As+SNP, o aumento na atividade se deu de forma linear (Figura 8). Dessa forma, provavelmente a redução observada na concentração de $O_2^{\cdot-}$ nessas plantas se deve a ação conjunta do NO agindo diretamente sobre o $O_2^{\cdot-}$ e da atividade da SOD.

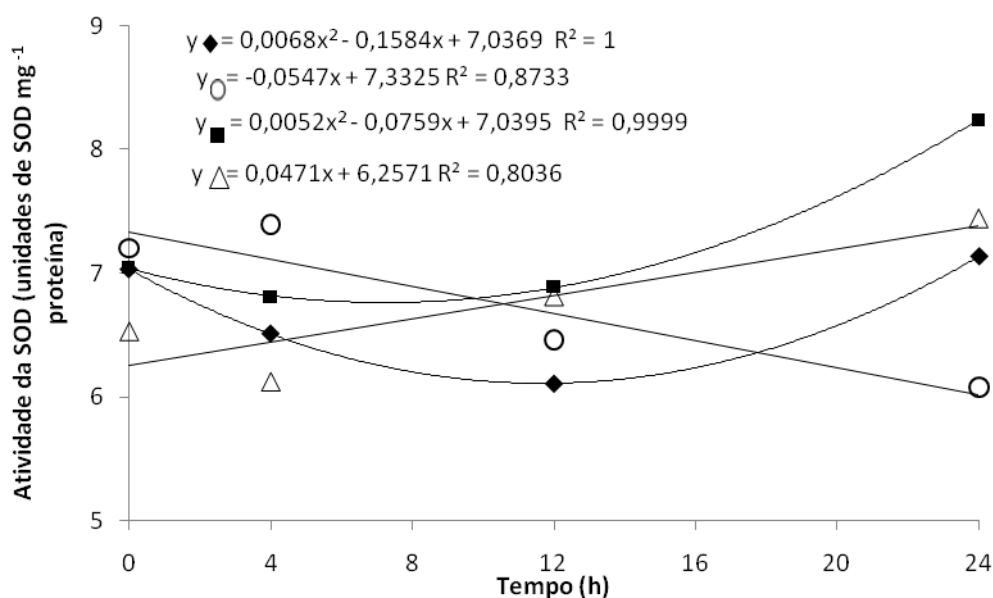


Figura 8 – Atividade da SOD em raízes de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms expostas aos tratamentos: Controle (◆), SNP (○), As (■) e As+SNP (△).

6.7.2 Catalase (CAT)

Semelhante à avaliação da enzima SOD, a atividade da enzima CAT teve significativo incremento após 12 horas de exposição ao As. Ao final de 24 horas, esta atividade foi superior àquela obtida em plantas expostas ao As+SNP. No entanto, não foi suficiente para atenuar os danos oxidativos celulares (Figura 9). O SNP, fornecido juntamente com o As, induziu aumento contínuo da atividade enzimática,

desempenhando papel determinante como ativador de mecanismo de proteção contra danos oxidativos desde as etapas iniciais de absorção de As.

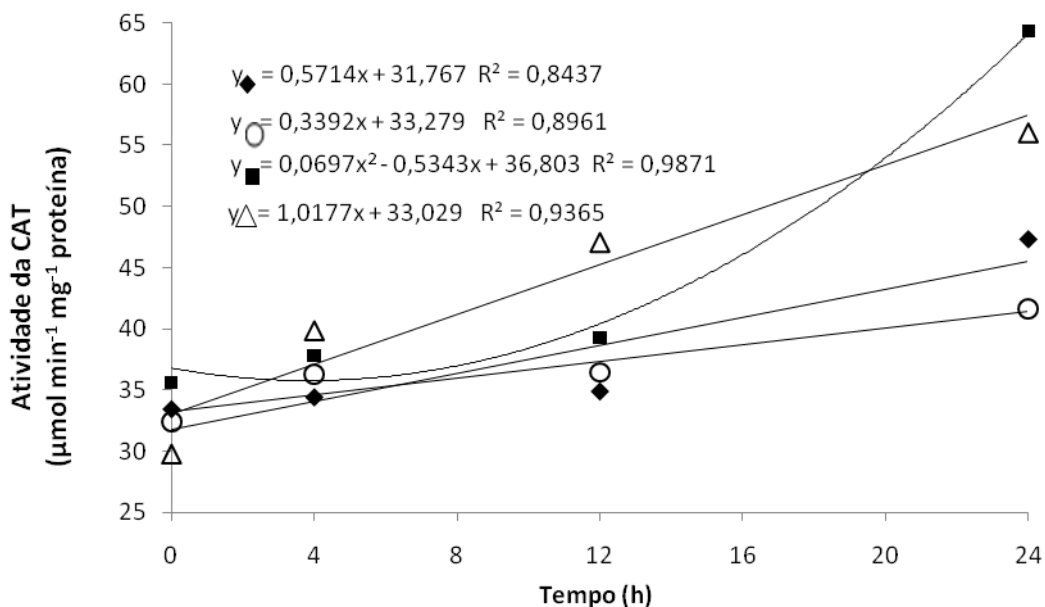


Figura 9 – Atividade da CAT em raízes de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms expostas aos tratamentos: Controle (◆), SNP (○), As (■) e As+SNP (△).

6.3.3 Peroxidase (POX)

As plantas expostas ao As apresentaram aumento contínuo na atividade da POX, com valores superiores àqueles obtidos nos demais tratamentos (Figura 10). Esse aumento da atividade não foi suficiente para a remoção do excesso de H_2O_2 gerado decorrente do tratamento com As.

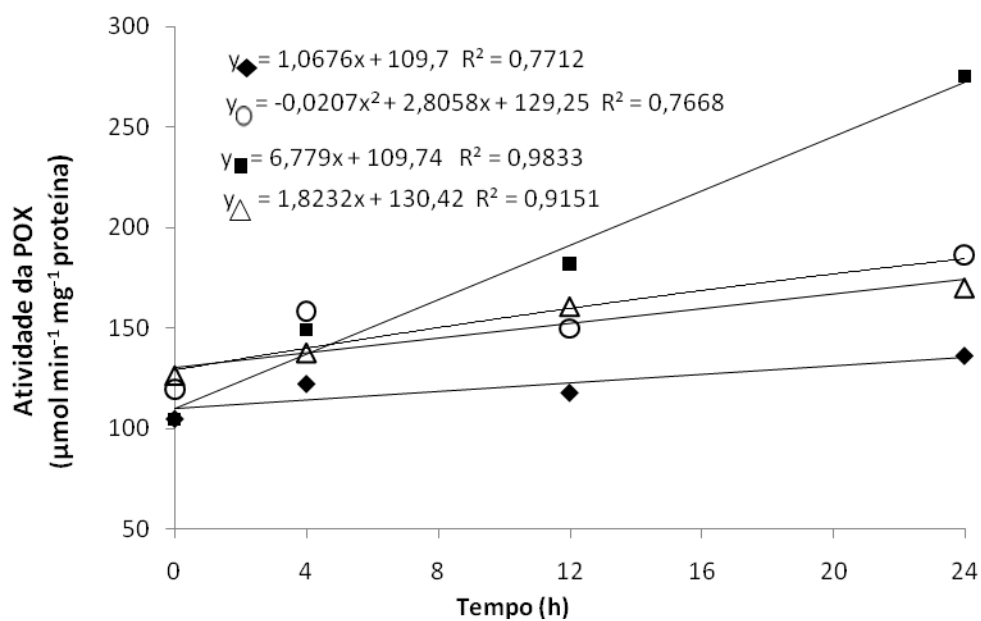


Figura 10 – Atividade da POX em raízes de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms expostas aos tratamentos: Controle (◆), SNP (○), As (■) e As+SNP (△).

Por outro lado, nas plantas submetidas ao tratamento com As+SNP não se verificou incremento significativo em relação ao tratamento com apenas SNP, indicando que, neste, o doador de NO não atuou como agente indutor na atividade dessa enzima.

7. DISCUSSÃO

De modo geral, as plantas acumulam metais e metaloides em maior concentração nas raízes (Singh *et al.*, 2007). No caso do arsenato (As^{V}), devido à sua semelhança química com o fosfato, verifica-se que ele utiliza o mesmo sistema de absorção e, dessa forma, ocorre a rápida absorção deste elemento (Zhang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009), conforme verificado em aguapé após 4 horas de exposição ao As. Um dos principais meios de acúmulo deve-se a ligação do arsenito (As^{III}), resultante da redução do arsenato, a compostos tiólicos e armazenamento no vacúolo (Tripathi *et al.*, 2006).

As plantas de aguapé, expostas ao As em conjunto com o SNP, apesar de apresentarem maior concentração de As nas raízes e maior translocação para as folhas, tiveram sintomas da toxidez menos severos do que aquelas expostas apenas ao As, o que indica efeito atenuante do NO, possivelmente, através da ativação de mecanismos antioxidantes, que atuaram protegendo as estruturas celulares (Laspina *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

Geralmente, as plantas hiperacumuladoras apresentam, o fator de translocação (FT) $> 1,0$, característica desejável na remoção de poluentes do meio aquático poluído (Zhao *et al.*, 2009; 2010). Este FT indica também a tolerância que as folhas apresentam em relação a determinado agente tóxico, uma vez que o processo fotossintético poderia atuar mesmo em presença de elevadas concentrações do poluente. Adicionalmente, o FT indica que as etapas de absorção e translocação estão sendo preservadas. No caso do aguapé, as plantas foram afetadas pelo As, uma vez que o valor alcançado em 4 h de exposição permaneceu o mesmo até 24 h de tratamento. A presença do SNP, no entanto, foi capaz de, por meio de sistemas bioquímicos de proteção, fazer com que os valores de FT aumentassem continuamente com o tempo de exposição.

Diversas condições de estresses bióticos e abióticos induzem a geração acentuada de ROI's, como ocorre com a toxidez causada pelo As, que altera o estado redox da célula, causando danos à mesma (Mittler, 2002; Shri *et al.*, 2009). Plantas de aguapé acumularam elevadas concentrações de As e, dessa forma, ocorreu significativo incremento nas concentrações de H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e MDA. A presença de SNP, no entanto, atuando como doador de NO, promoveu redução na concentração destas substâncias, e conseqüentemente, menores danos. Esses resultados estão de acordo com estudos que

demonstraram o efeito citoprotetor do NO contra diversos agentes tóxicos (Yu *et al.*, 2005; Wang e Yang, 2005; Sing *et al.*, 2008 e 2009; Valentovicová *et al.*, 2010).

O H₂O₂ é naturalmente sintetizado como resultado do metabolismo normal da planta, podendo ser gerado através da reação de Mehler, nos cloroplastos, transporte de elétrons nas mitocôndrias e fotorrespiração em peroxissomos (Neill *et al.*, 2002). Estresses abióticos podem aumentar a geração de H₂O₂ através destas rotas e, também, pela atuação de NADPH oxidases localizadas na membrana plasmática (RBOH) ou peroxidases da parede celular (Mittler, 2002).

Plantas de aguapé tiveram significativa redução na concentração de H₂O₂ quando expostas ao As em presença do SNP, conforme observado por Wang *et al.* (2011), em que foi verificado que essa redução ocorreu, principalmente, pela baixa atividade da enzima NADPH oxidase. Embora esta enzima não tenha sido avaliada no presente estudo, pode-se sugerir que a enzima CAT tenha atuado degradando o H₂O₂ produzido.

Os efeitos tóxicos induzidos pelo As resulta, também, no incremento da geração de O₂^{•-}, conforme observado em plantas de aguapé. A remoção desses O₂^{•-} produzidos pode ocorrer através da atividade da enzima SOD, que dismuta o O₂^{•-} à H₂O₂ (Alscher *et al.*, 2002), ou por meio da sua interação com o NO, resultando na formação do peroxinitrito (ONOO⁻) (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007). O peroxinitrito pode ser removido por compostos tiólicos e metaloporfirinas (Crow, 2000), além disso, tem sido sugerido que a catalase tem papel na eliminação desta molécula (Gebicka e Didik, 2009). A partir dos dados observados, é possível inferir que a menor concentração de O₂^{•-} nas plantas expostas ao As+SNP em relação às plantas tratadas com As se deve à atuação direta do NO, uma vez que não foram observadas alterações significativas na atividade da SOD.

Como consequência da redução de concentração de ROI's em plantas expostas ao As+SNP observou-se diminuição na peroxidação de lipídeos, conforme verificado nas respostas de toxicidade induzida por cobre (Yu *et al.*, 2005), alumínio (Wang e Yang, 2005) e cádmio (Sing *et al.*, 2008).

O processo de peroxidação de lipídeos é resultado de uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de ROI's sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares gerando, principalmente, radical lipídico, alcoxila e peroxila. Essas reações levam à destruição da estrutura da membrana, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular. A peroxidação lipídica talvez se

constitua no evento citotóxico primário que desencadeia sequência de lesões na célula (Darley-USmar *et al.*, 2000). Além de atuar como agente indutor de mecanismos antioxidantes, o NO pode agir diretamente por combinação com radicais alcoxila e peroxil, o que interrompe a peroxidação lipídica evitando a propagação do evento (Wink e Mitchell, 1998).

A análise de coloração das raízes possibilitou verificar os efeitos tóxicos do As e a ação atenuante do NO, fornecido via SNP, na integridade das membranas. Nesta avaliação, ficou evidente a intensidade dos danos na região das raízes menos diferenciadas, resultado da ação mais danosa dos ROI's sobre os lipídeos destas membranas, conforme relatado por Singh *et al.* (2009). O NO, neste caso, atua como parte do sistema de proteção das membranas, evitando que ocorra o extravasamento de íons (Beligni e Lamattina, 2002; Santa-Cruz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Nesta análise, as raízes com maiores danos tornam-se mais coradas devido a maior penetração do corante, uma vez que, as membranas danificadas perdem a seletividade e assim, não conseguem impedir sua entrada.

A prevenção de danos celulares decorrentes da ação dos ROI's envolve a participação de diversos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Halliwell, 2006). No presente estudo, a exposição de aguapé ao As aumentou significativamente as atividades das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX), indicando a participação ativa dessas enzimas como parte da estratégia para reduzir o estresse induzido pelo metaloide.

A SOD é a primeira enzima a atuar na remoção de ROI's eliminando o $O_2^{\cdot-}$ (Alscher *et al.*, 2002) e, nesse estudo, o estresse induzido pelo As promoveu aumento na concentração de $O_2^{\cdot-}$ e, em consequência, maior atividade da SOD. Entretanto, apesar do aumento na atividade dessa enzima, isso não foi suficiente para remover o excesso de $O_2^{\cdot-}$ produzido.

Nas plantas expostas ao As, em presença do SNP, a atividade da SOD apresentou redução, o que, neste caso, pode ter ocorrido em função da redução na concentração do $O_2^{\cdot-}$ por ação direta do NO, diminuindo assim, o substrato para a enzima. Resultados semelhantes foram encontrados em raízes de trigo submetidas ao estresse por cádmio, onde a aplicação do SNP causou a redução na atividade da SOD, assim como de outras enzimas, e em raízes de arroz, submetidas ao As e SNP (Singh *et al.*, 2008 e 2009).

O NO, fornecido via SNP, teve papel indutor na atividade da catalase (CAT) em plantas de aguapé expostas ao As, auxiliando na atenuação dos danos tóxicos causados por este elemento. Essa ação do NO sobre a CAT foi, também, verificada em outras condições de estresse, como relatado por Beligni e Lamattina (2002) em folhas de batata tratadas com herbicida e por Wang *et al.* (2011) em *Hydrilla verticillata* tratada com amônia.

Além da catalase, a peroxidase também atua na remoção de H₂O₂, porém essas duas classes de enzimas apresentam afinidades diferentes para com o substrato. As peroxidases são responsáveis pela fina modulação de H₂O₂, removendo-o mesmo em quantidades menores, enquanto que as catalases são responsáveis pela remoção dessa molécula quando está em altas concentrações, ou seja, durante o estresse (Willekens *et al.*, 1997; Mittler 2002). No presente estudo, a atuação da catalase em conjunto com a peroxidase, não foi suficiente para combater o excesso de H₂O₂ produzido, uma vez que a concentração dessa molécula aumentou ao longo do tempo de exposição ao metaloide. Porém, o NO pareceu atuar na redução da concentração do H₂O₂, uma vez que o tratamento de As com SNP mostrou redução na concentração dessa substância, provavelmente pelo aumento na atividade da CAT que removeu seu excesso. A POX apresentou pouco aumento de atividade, isso devido à menor concentração de seu substrato.

O equilíbrio na atividade das enzimas antioxidativas (SOD, CAT e POX) são de grande importância para manter o estado redox da célula, evitando a formação de radicais hidroxila altamente tóxicos (Apel e Hirt, 2004). Os resultados do presente estudo sugerem que o NO atua direta ou indiretamente na redução da concentração de ROI's. Com a doação de NO, a partir do SNP, houve redução da concentração de O₂⁻, mas a atividade da SOD não aumentou. Provavelmente o NO atuou reagindo com o O₂⁻ formando ONOO⁻ (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007). Além disso, houve alta atividade da POX e redução da concentração de H₂O₂ no tratamento com NO, isso porque a alta atividade da CAT pode ter eliminado o excesso de H₂O₂ (Willekens *et al.*, 1997). Com o NO, a atividade da CAT continuou aumentando ao longo do tempo, mesmo com a redução da concentração de H₂O₂, provavelmente para eliminar o excesso de ONOO⁻ gerado pela reação do NO com O₂⁻ (Gebicka e Didik, 2009). Com menor concentração desses ROI's, os danos celulares são reduzidos, inclusive a peroxidação lipídica (Darley-Usmar *et al.*, 2000).

8. CONCLUSÃO

O NO atuou como agente redutor dos efeitos tóxicos causados pelo As, através da diminuição da concentração de ROI's e, conseqüentemente, reduziu os danos oxidativos. A ação direta e indireta do NO foi determinante para manter a integridade da membrana das raízes levando à redução dos sintomas de toxidez do As.

A grande absorção do metaloide pelo aguapé foi maximizada devido à manutenção do estado redox da mesma, como comprovado pelos maiores resultados do FT, com a adição de NO através do SNP. Dessa forma a planta conseguiu manter os mecanismos de tolerância ao As em níveis adequados e, assim, eliminou em parte os danos tóxicos decorrentes da rápida absorção do metaloide.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agunbiade FO, Olu-Owolabi BI, Adebowale KO. 2009. Phytoremediation potencial of *Eichornia crassipes* in metal-contaminated. *Bioresource Technology* 100:4521-4526
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue 1331-1341
- 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* 55:373-99
- Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J. 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science* 172:876-887
- Barreiros ABS, David JM, David JP. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29:113-123
- Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287
- Beligni MV, Lamattina L. 2002. Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* 25:737-748
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:517-529
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 59:21-39
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16:332-341
- Boveris. 1984. *Methods in Enzymology* 105:429-435
- Chance B, Maehley AC. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymology* 2:764-775
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM. 2006. Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* 224: 246-54
- Crawford MN, Galli M, Tischner R, Heimer YM, Okamoto M, Mack A. 2006. Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Science* 11: 526-527

Crow JP. 2000. Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Radical Biology and Medicine* 28:1487-1494

Darley-Usmar VM, Patel RP, O'Donnell VB, Freeman BA. 2000. Antioxidant Actions of Nitric Oxide. In: Ignarro LJ, *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* 265-276

Del Longo OT, González A, Pastori GM, Trippi VS. 1993. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiology* 34:1023-1028

Doop E, Hartmannb LM, Florea AM, Recklinghausenc U, Pieper R, Shokouhi B, Rettenmeier AW, Hirner AV, Obe G. 2004. Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 201:156-165

Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:10328-10333

Ferreira LC, Cataneo AC, Remaeh LMR, Corniani N, Fumis TF, Souza YA, Scavroni J, Soares BJA. 2010. Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97:47-54

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

Gebicka L, Didik J. 2009. Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103:1375-1379

Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59:309-14

Guimarães PF, Gomes CQ, Magalhães ABS, Freitas TV, Oliveira JA, Aguiar R. 2006. Estudos laboratoriais de acúmulo e toxicidade de arsênio em *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 1:109-113

Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302:100-103

Grün S, Lindermayr S, Durner J. 2006. Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* 57:507-516

Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141:312-322

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

- Heath RL, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archieve Biochemistry and Byophysics* 125:189-198
- Kar M, Nishra D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319
- Karenlampi S, Schat H, Vangronsveld J, Verkleij JAC, Lelie D, Mergeay M, Tervahauta AI. 2000. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental Pollution* 107:225-231
- Kuo MC, Kao CH. 2003. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum* 46:149-152
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science* 169:323-330
- Leach J, Keyster M, Plessis MD, Ludidi N. 2010. Nitric oxide synthase activity is required for development of functional nodules in soybean. *Journal of Plant Physiology* doi: 10.1016/j.jplph.2010.06.019
- Lindermayr C, Durner J. 2009. S-Nitrosylation in plants: Pattern and function. *Journal of Proteomics* 73:1-9
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J. 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137:921-930
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry* 193:265-275
- 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
- Meier S, Madeo L, Ederli L, Donaldson L, Pasqualini S, Gehring C. 2009. Deciphering cGMP signatures and cGMP-dependent pathways in plant defence. *Plant Signaling and Behavior* 4:307-309
- Misra HP, Fridovich I. 1971. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *The Journal of Biological Chemistry* 246:6886-6890
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410
- Mohammadi M, Karr AL. 2001. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *Journal of Plant Physiology* 158:1023-1029
- Murgia I, Pinto MC, Delledonne M, Soavea C, Gara L. 2004. Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *Journal of Plant Physiology* 161:777-783

- Neill S, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Wilson I. 2008. Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany* 59:25-35
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5:388-395
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT. 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* 159:11-35
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L. 2004. Nitric oxide mediates the indole-acetic acid activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root formation. *Plant Physiology* 135:279-286
- 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
- Santa-Cruz DM, Pacienza NA, Polizio AH, Balestrasse KB, Tomaro ML, Yannarelli GG. 2010. Nitric oxide synthase-like dependent NO production enhances heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B-irradiated soybean plants. *Phytochemistry* 71:1700-1707
- Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi K, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Rakesh Tuli. 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, Kaur G, Arora K, Kohli RK. 2008. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environmental and Experimental Botany* 63:158-167
- Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K. 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation* 53:65-73.
- Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP, Sharma N, Kohli RK. 2009. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* 20:289-297
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC. 2001. Nitrosylation: the prototypic redox-based signalling mechanism. *Cell* 106:675-678
- 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* 25:156-165
- Valentovičová K, Halušková L, Huttová J, Mistrík I, Tamás L. 2010. Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips. *Journal of Plant Physiology* 167:10-14

- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160:1-40
- Wang C, Zhang SH, Li W, Wang PF, Li L. 2011. Nitric oxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:67-73
- Wang H, Huang J, Bi YB. 2010. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Science* 179:281-288
- Wang PG, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T, Janczuk AJ. 2002. Nitric Oxide Donors: Chemical activities and biological applications. *Chemical Reviews* 102:1091-1134
- Wang YS, Yang GM. 2005. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiology* 46:1915-1923
- Wang X, Li J, Liu J, He W, Bi Y. 2010. Nitric oxide increases mitochondrial respiration in a cGMP-dependent manner in the callus from *Arabidopsis thaliana*. *Nitric Oxide* 23:242-250
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Montagu MV, Inzé D, Camp WV. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal* 16:4806-4816
- Wink DA, Mitchell JB. 1998. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 25:434-456
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H. 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology* 125:199-208
- Yu CC, Hung KT, Kao HC. 2005. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH₄⁺ accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology* 162:1319-1330
- Zayed A, Gowthaman S, Terry N. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality* 27:715-21
- Zhang X, Lin AJ, Zhao FJ, Xu GZ, Duan GL, Zhu YG. 2008. Arsenic accumulation by the aquatic fern *Azolla*: Comparison of arsenate uptake, speciation and efflux by *A. caroliniana* and *A. filiculoides*. *Environmental Pollution* 156:1149-1155
- 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
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* 181:777-794