

SAMUEL COELHO ARAUJO

**PARTICIPAÇÃO DO ÁCIDO JASMÔNICO NAS
RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS
DE *Lemna valdiviana* EXPOSTAS AO ARSÊNIO**

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
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A663p
2015

Araújo, Samuel Coelho, 1985-

Participação do ácido jasmônico nas respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de *Lemna valdiviana* expostas ao arsênio / Samuel Coelho Araújo. – Viçosa, MG, 2015.

vii, 44f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Lemna valdiviana*. 2. Plantas - Metabolismo. 3. Arsênio Efeito fisiológico. 4. Stress oxidativo. 5. Enzimas. 6. Arsenatos. 7. Arsenitos. 8. Toxicidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 584.64

SAMUEL COELHO ARAUJO

**Participação do ácido jasmônico nas
respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de
Lemna valdiviana expostas ao arsênio**

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: 17 de dezembro de 2015.



Prof. Cléberson Ribeiro



Prof. Dimas Mendes Ribeiro



Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço somente a Deus pois:

Foi Ele quem me deu uma filha tão amada e preciosa, Rebeca, que dia após dia alegra minha vida e trouxe a mim um amor que não sabia que existia;

Me concedeu uma esposa linda, que amo tanto, uma guerreira, amiga fiel, companheira e feita na medida pra mim. Te amo.

Permitiu que fosse gerado em um lar de amor, com pais tão especiais e que amo muito, Pedro e Maria do Carmo, que me educaram, me deram valores, me ensinaram, se sacrificaram, dedicaram e abdicaram de tantos projetos pra que pudesse realizar os meus. A vocês ofereço e dedico.

Colocou em minha vida um irmão querido, Lucas, meu amigo, que sempre cuidou de mim como um pai. Amo muito você.

Me deu uma família linda, parentes que muitas vezes não vejo, mas sempre estão em meu coração.

Abriu as portas da Universidade Federal de Viçosa, especialmente o Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, que proporcionaram todas as condições de realização desse trabalho e onde encontrei grandes mestres que me ensinaram.

Trouxe a mim a secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Luciene, que com grande atenção e disposição me ajudou nessa etapa da vida. Obrigado, Lu.

Permitiu que o professor Juraci Alves de Oliveira me orientasse nesse mestrado, me acolhendo e agindo sempre com paciência e carinho. Obrigado por tudo, por transmitir seu conhecimento com tanta competência e por todo o auxílio na conclusão desta dissertação.

Levou à minha banca de defesa os professores Cleberson e Dimas, que prontamente se dispuseram em analisar esse material. Obrigado pelas considerações e correções que enriqueceram ainda mais esse trabalho.

Me colocou em um laboratório onde encontrei pessoas especiais, colegas como Gutenberg, Taline, Micaela, Lílian, Fernanda Vidal e Fernanda Farnese, que me ajudaram e aconselharam em todas as etapas. Obrigado pelo bom convívio e amizade.

Me concedeu a oportunidade de ser agraciado pela concessão de bolsa durante o curso de uma instituição séria como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Me inseriu em um corpo, sua igreja amada, onde fiz amigos/irmãos como Claudiano, Michele, Matheus, Caroline, Joseli, Yuri, Valter, Adriana, Paulo, Rithiely e aos demais irmãos da Igreja Cristã Maranata em São José do Triunfo e Alto. Obrigado por cada oração, pela amizade.

Por tudo isso e muito mais, agradeço somente a Deus, pois dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

“O coração do homem planeja o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos.” (Provérbios 16:9).

“Ora, àquele que é poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera, a esse glória na igreja, por Jesus Cristo, em todas as gerações, para todo o sempre. Amém.” (Efésios 3:20,21).

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Estudo Preliminar	3
1. Introdução	5
2. Material e Métodos	7
2.1 Material vegetal e condições experimentais	7
2.2 Taxa de crescimento relativo	7
2.3 Determinação do arsênio absorvido	8
2.4 Determinação do índice de tolerância	8
2.5 Delineamento experimental	8
3. Resultados	8
3.1 Concentração de arsênio em <i>Lemna valdiviana</i>	8
3.2 Crescimento de <i>Lemna valdiviana</i>	9
3.3 Índice de tolerância de <i>Lemna valdiviana</i>	10
Discussão	11
Referências Bibliográficas	13
Artigo	18
1. Introdução	20
2. Material e Métodos	22
2.1 Material Vegetal e Condições Experimentais	22
2.2 Determinação quantitativa de H ₂ O ₂	23
2.3 Determinação quantitativa do íon superóxido.....	23
2.4 Determinação da peroxidação de lipídios	23
2.5 Análises enzimáticas	24
2.5.1 Obtenção dos Extratos Enzimáticos Brutos	24
2.5.2 Determinação da atividade da catalase.....	24
2.5.3 Determinação da atividade da peroxidase	25
2.5.4 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato.....	25

2.5.5 Determinação da atividade da dismutase do superóxido.....	25
2.5.6 Determinação da atividade da peroxidase da glutathione	25
2.5.7 Determinação da atividade da redutase da glutathione	26
2.5.8 Determinação de pigmentos fotossintéticos	26
2.6 Análises estatísticas.....	26
4. Resultados	27
4.1 Concentração de espécies reativas de oxigênio	27
4.2 Efeito do arsênio e do ácido jasmônico sobre a peroxidação lipídica.....	27
4.3 Efeito do arsênio e do ácido jasmônico sobre a atividade das enzimas antioxidantes	28
4.4 Efeito do arsênio e do ácido jasmônico sobre os pigmentos fotossintéticos.....	30
Discussão	31
Referências Bibliográficas	34
Conclusões Gerais.....	44

RESUMO

ARAÚJO, Samuel Coelho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2015. **Participação do ácido jasmônico nas respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de *Lemna valdiviana* expostas ao arsênio.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Atualmente existe uma grande preocupação com os recursos hídricos, tendo em vista que são finitos e um dos pilares dessa preocupação é a sua contaminação por metais pesados. No presente trabalho, plantas de *Lemna valdiviana* foram expostas por 24 horas a diferentes concentrações de arsênio: arsenato, As^{+5} , (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,5 mg L⁻¹); arsenito, As^{+3} , (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,5 mg L⁻¹) a fim de se avaliar o efeito no crescimento, índice de tolerância e absorção e acúmulo dessas formas inorgânicas. Os espécimes expostos ao arsênio absorveram concentrações crescentes do metaloide à medida que se aumentou a disponibilidade do poluente em solução. Tal fato promoveu grande redução na taxa de crescimento relativo (TCR) e no índice de tolerância (IT), porém com maiores quedas para as plantas tratadas com arsenito, que aparentemente se mostrou mais tóxico para *Lemna valdiviana*, ocorrência essa associada às maiores concentrações internas da forma trivalente verificadas nas plantas. Posteriormente avaliou-se o papel do ácido jasmônico (JA) nessas plantas quando expostas ao arsenato na dose de 4,0 mg L⁻¹, que foi onde ocorreu redução aproximada de 50% na TCR. Foram utilizadas quatro doses de JA: 50, 100, 250 e 500 µM. A exposição ao metaloide desencadeou uma série de danos celulares, como produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânion superóxido (O₂⁻), gerando efeitos sobre a integridade de membranas celulares como a peroxidação lipídica e acarretando danos também em pigmentos cloroplastídicos. O JA atuou como um atenuante uma vez que agiu como um antioxidante, diminuindo a peroxidação lipídica e como estimulante da produção de enzimas antioxidantes como catalase, peroxidase, dismutase do superóxido, peroxidase da glutaciona, redutase da glutaciona, aumenta assim a capacidade antioxidante da plantas. Nos pigmentos fotossintéticos, tanto o arsênio como o JA causaram diminuição nos teores das clorofilas *a* e *b* e aumentaram os teores de carotenoides. Esses dados reforçam a ideia de que o JA está relacionado com alterações no estresse oxidativo, alterando as atividades de algumas enzimas chave que controlam este processo.

ABSTRACT

ARAUJO, Samuel Coelho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2015. **Participation of jasmonic acid in biochemical and physiological responses of *Lemna valdiviana* plants exposed to arsenic.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira.

Currently there is a great concern for water resources, considering that are finite and one of the pillars of this concern is the contamination by heavy metals. In this study, plant *Lemna valdiviana* were exposed for 24 hours to different concentrations of arsenic: arsenate, As^{+5} , (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,5 $mg L^{-1}$); arsenite, As^{+3} , (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,5 $mg L^{-1}$) in order to evaluate the effect growth, tolerance index and absorption and accumulation of these inorganic forms. The specimens exposed to increasing concentrations of arsenic absorbed metalloid as it increased the availability of the pollutant in solution. This fact promoted significant reduction in the growth rate (TCR) and the tolerance index (IT), but with larger declines for plants treated with arsenite, which apparently was more toxic to *Lemna valdiviana*, occurrence that associated with higher internal concentrations the trivalent form verified in plants. Subsequently evaluated the role of jasmonic acid (JA) in these plants when exposed to arsenate at a dose of 4.0 $mg L^{-1}$, which was where there was approximate 50% reduction in TCR. They used four doses of JA: 50, 100, 250 and 500 μM . Exposure to metalloid triggered a series of cell damage, such as production of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion (O_2^-), generating effects on the integrity of cell membranes as lipid peroxidation and causing damage also chloroplastid pigments. The JA served as a mitigating once acted as an antioxidant, reducing lipid peroxidation and as stimulating the production of antioxidant enzymes such as catalase, peroxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, thus increases the antioxidant capacity of plants. In photosynthetic pigments as much arsenic as the JA caused degradation of chlorophyll a and b and increased carotenoid content. These data reinforce the idea that the JA is related to changes in oxidative stress by altering the activities of some key enzymes that control this process.

INTRODUÇÃO GERAL

O ambiente natural para as plantas é composto por um conjunto complexo de estresses abióticos, os quais resultam de condições ambientais que reduzem o crescimento e a produtividade abaixo dos níveis ideais, sendo que as respostas das plantas a esses estresses são dinâmicas e complexas (Cramer, 2010; Skirycz et al., 2010).

As alterações nas condições favoráveis ao desenvolvimento vegetal afetam também, direta ou indiretamente, a sobrevivência dos demais organismos, como tem ocorrido com a crescente contaminação dos recursos hídricos por metais pesados e outros poluentes. Essa contaminação é resultante, em maior parte, de ações antrópicas, como aquelas que causam a liberação de arsênio (As) nos ambientes naturais, que podem resultar em concentrações elevadas em águas superficiais e, até mesmo, subterrâneas (Shankar et al., 2014).

A atividade mineradora é uma das grandes responsáveis por volumes crescentes de As no ambiente natural, sendo principalmente obtidos como resíduo da mineração e processamento do ouro, cobre, chumbo e cobalto, sendo que os principais impactos da mineração no Brasil envolvem também a mineração do ferro. Fontes naturais de contaminação por As estão ligadas a depósitos de rochas sulfetadas presentes em várias localidades do país, como a região do Quadrilátero Ferrífero (MG) (Faria 2001; Borba et al., 2004; Oliveira et al., 2009).

A principal forma de contaminação humana pelo As é por meio da ingestão de água acima dos limites que excedem a concentração máxima permitida de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Muitos projetos já foram realizados a fim de se remover o As do ambiente e uma estimativa mundial para os gastos anuais com a despoluição ambiental gira em torno de 25 a 30 bilhões de dólares (Mazzuco, 2008). Dentre tantos projetos para a descontaminação desses ambientes, a fitorremediação se apresenta como uma área de pesquisa em que muitos estudos foram realizados nos últimos anos (Mandal et al., 2012).

Em ambientes aquáticos, a fitorremediação é associada, principalmente, ao uso de macrófitas aquáticas, como do gênero *Lemna*, dentre outras, que se apresentam como potencial para remoção de vários elementos tóxicos (Wolff et al., 2008; Leão et al., 2014). Essas plantas apresentam crescimento rápido, com expressiva produção de biomassa e sistema

radicular com grande área de contato com o poluente, além de considerável tolerância, o que possibilita maior absorção e acúmulo em seus tecidos. Como exemplo disso, pode-se citar *Lemna valdiviana*, uma monocotiledônea aquática, flutuante e de pequeno porte. Adapta-se a diferentes condições ambientais e desempenha papel importante na bioacumulação de metais pesados (Hu et al., 2010).

Nas plantas, o As pode ser absorvido por diferentes vias, dependendo da forma química. Na forma de arsenato, a absorção se dá por meio dos transportadores de fosfato e, para a forma inorgânica arsenito a absorção ocorre por meio de canais aquaporinas. Mesmo com a capacidade de absorver e acumular diferentes metais pesados em suas diferentes formas, as plantas, ao entrarem em contato com o poluente, sofrem diversos danos que afetam seu desenvolvimento normal, acarretado por alterações fisiológicas e bioquímicas (Liu et al., 2012).

A exposição das plantas ao poluente gera estresse oxidativo, com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam oxidação de estruturas celulares e, a remoção dessas ROS, garante às plantas maior tolerância aos agentes tóxicos (Bhaduri e Fulekar, 2012). As principais ROS geradas são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem ter os danos atenuados pela ação dos mecanismos de defesa antioxidante enzimático da planta, como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutathione (GPX) e a redutase da glutathione (GR) (Singh et al., 2009). A exposição de plantas ao As, da geração de ROS e a ação de mecanismos de defesa antioxidante, resulta, também, em alterações na expressão gênica. Muitos desses genes estão envolvidos com diversas vias de sinalização, como a rota octadecanoide, que tem como produto o ácido jasmônico (JA).

Segundo Bleeker et al. (2006) os metais pesados induzem a biossíntese do JA, assim como promovem a expressão de alguns genes, por exemplo, VSP2, MAPK e CDC25, envolvidos em rotas de sinalização, e daqueles que participam no metabolismo da glutathione. Yu et al. (2012) relatam que os genes envolvidos na via de biossíntese de JA são consideravelmente regulados em raízes e brotos após tratamentos com As^{+3} , concluindo que esse hormônio tem sua síntese aumentada em plantas expostas ao metaloide. Recentes estudos indicam, ainda, que o JA, provavelmente, é o hormônio chave na percepção do estresse desencadeado pelo arsênio (Srivastava et al., 2012).

Com isso, pretendemos nesse trabalho avaliar os efeitos do As na fisiologia e bioquímica de plantas aquáticas de *Lemna valdiviana*, com ênfase no papel do JA que será adicionado de forma exógena.

Estudo Preliminar

Avaliação da toxicidade do arsenato (As^{+5}) e do arsenito (As^{+3}) em *Lemna valdiviana*: crescimento e tolerância

Resumo

No presente trabalho foram avaliadas as alterações no crescimento, índice de tolerância e teor de arsênio absorvido em plantas expostas ao arsênio (As) na forma de arsenito (As^{+3}) e arsenato (As^{+5}).

Plantas de *Lemna valdiviana* foram cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, e expostas aos seguintes tratamentos durante 24 horas: controle (solução nutritiva); arsenato (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,5 mg L⁻¹); arsenito (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,5 mg L⁻¹). A exposição de *Lemna valdiviana*, tanto a arsenato (As^{+5}) quanto ao arsenito (As^{+3}), resultou em absorção e acúmulo do metaloide nas diferentes concentrações do poluente. Essa concentração de arsênio nas plantas aumentou gradativamente com a disponibilidade crescente desse elemento em solução nutritiva. A exposição de *Lemna valdiviana* ao As desencadeou quedas gradativas no crescimento vegetal nas concentrações iniciais do elemento. As plantas submetidas ao tratamento contendo arsenato (As^{+5}) tiveram um comportamento linear no decréscimo do crescimento, enquanto que em presença do arsenito (As^{+3}) o comportamento foi exponencial, mostrando uma queda mais abrupta na presença dessa forma trivalente. Nos tratamentos com a forma As^{+5} , a taxa de crescimento relativo (TCR) decaiu a 50% do controle na concentração aproximada de 4,0 mg L⁻¹, enquanto que na forma As^{+3} esse mesmo comportamento foi observado na concentração de 1,0 mg L⁻¹, ocasionada pela sua natureza mais tóxica para as plantas. O índice de tolerância também sofreu queda ao longo das diferentes concentrações. Nas menores concentrações das duas formas ministradas, pentavalente e trivalente, o índice de tolerância foi maior, enquanto que nas maiores o índice

foi menor, acompanhando assim o que foi apresentado na TCR, com queda mais drástica para os tratamentos contendo arsenito, porém sempre com menor índice de tolerância em todas as concentrações do arsênito quando comparada com arsenato.

Palavras-chave: Arsênio, toxicidade, tolerância, *Lemna valdiviana*.

Abstract

In this study we assessed the changes in the growth rate tolerance in plants exposed to arsenic (As) in the form of arsenite (As^{+3}) and arsenate (As^{+5}). The absorbed arsenic content was measured as well as lipid peroxidation these plants at different concentrations arsenate. *Lemna valdiviana* plants were grown in nutrient solution, pH 6.5, and exposed to the following treatments for 24 hours: control (nutrient solution); arsenate (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 and 7,5 mg L⁻¹); arsenite (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 and 7,5 mg L⁻¹). The exposure of *Lemna valdiviana*, both arsenate (As^{+5}) as to arsenite (As^{+3}) resulted in absorption and accumulation of metalloid in different concentrations of the pollutant. This concentration of arsenic in plants increased gradually with the increasing availability of this element in nutrient solution. The *Lemna* exposure to valdiviana. The triggered gradual declines in plant growth in the initial concentrations of the element. The plants subjected to treatment containing arsenate (As^{+5}) showed a linear behavior in the growth decrease, whereas in the presence of arsenite (As^{+3}) has an exponential behavior, showing a more abrupt decline in the presence of such trivalent form. In the treatments with the As^{+5} medium, the growth rate (TCR) declined to 50% of control at an approximate concentration of 4,0mg L⁻¹, while as As^{+3} the same behavior was observed in the concentration of 1.0 mg L⁻¹ occasioned by their nature more toxic for plants. The tolerance index also was down throughout the different concentrations. In lower concentrations of the two forms given, pentavalent and trivalent, the index of tolerance was higher, while the highest index was lower, thus following what was presented in TCR, more drastic drop for the treatments containing arsenite, but always with lower level of tolerance in all arsenite concentrations compared with arsenate.

Keywords: Arsenic, toxicity, tolerance, *Lemna valdiviana*.

1. Introdução

Metais pesados, também conhecidos como elementos-traço, estão presentes naturalmente em solos e em sistemas aquáticos superficiais e subsuperficiais, mesmo que não haja perturbação antrópica do ambiente. O aumento da concentração desses metais pode ocorrer tanto em razão de processos naturais quanto por atividades antrópicas. Os processos naturais que contribuem para o aparecimento de metais pesados nos sistemas aquáticos são a decomposição de rochas e a lixiviação no perfil do solo, enquanto as fontes antrópicas estão associadas, principalmente, a atividades de mineração (carvão e jazidas minerais) e industriais, além da geração de efluentes municipais (McClintock et al., 2012).

Com o passar dos anos, cresce a preocupação com a contaminação do meio ambiente com metais pesados, uma vez que essa contaminação aumenta de forma acelerada em todo o mundo. Como exemplo dessa preocupação entre os principais impactos ambientais da mineração no Brasil destaca-se a presença de grandes barragens de contenção de resíduo, barragens de decantação que foram abandonadas, e é frequente a poluição de áreas superficiais, principalmente em Minas Gerais. No mês de novembro de 2015, como grande destaque atual dessa ação antrópica por mineradoras, o desastre causado pelo rompimento das barragens Fundão e Santarém da empresa Samarco, em Mariana-MG, despejou bilhões de litros de rejeitos que afetaram a Bacia do Rio Doce, chegando ao litoral do estado do Espírito Santo.

A Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (Agency for Toxic Substances and Diseases Registry - ATSDR), sediada nos Estados Unidos, considerou o As como elemento químico mais perigoso de sua Lista Prioritária de Substâncias Perigosas (Priority List of Hazardous Substances) (ATSDR, 2013), tornando-o merecedor de ampla atenção.

O arsênio é um semimetal (metaloide) pertencente ao grupo 15 (5A) da classificação periódica dos elementos químicos, está presente na natureza numa variedade de formas químicas e estados de oxidação que irão determinar a sua toxidez. As formas inorgânicas arsenito trivalente (As^{3+}) e arsenato pentavalente (As^{5+}) ocorrem naturalmente, sendo que o estado de oxidação +3 confere maior toxicidade do que os compostos análogos com estado de oxidação +5 (Figueiredo et al., 2007; Rana, 2008; Ghosh et al., 2008). Como elemento não

essencial e tóxico para as plantas, alguns sintomas dessa toxidez são inibição do crescimento radicular, inibição da fotossíntese e morte celular (Figueiredo et al., 2007; Lubin et al., 2007; Mishra et al., 2014; Kumar et al., 2015).

As formas citadas acima, sejam elas orgânicas ou inorgânicas, penta ou trivalentes, acabam quase sempre sendo convertidas pelo organismo ao trióxido de arsênio, o qual reage muito rapidamente com os grupos sulfidrila (-SH) de proteínas, inibindo a ação enzimática e bloqueando várias reações bioquímicas celulares (Sharma e Sohn, 2009).

Em plantas, as duas formas inorgânicas, trivalente e pentavalente, são absorvidas de formas diferentes. A primeira forma, As^{+3} , é absorvida via canais aquaporina. Em arroz, por exemplo, dois canais aquaporinas foram relatados, Lsi1 e Lsi2, presentes nas raízes, que desempenham um papel importante no transporte de As^{+3} para a parte aérea e conseqüentemente para os grãos. Como grande parte do arroz mundial é produzido no Sudeste da Ásia em áreas contaminadas pelo arsênio, isso gerou uma grande preocupação pois se tornou um dos principais meios de entrada na cadeia alimentar do homem (Kumar et al., 2014a). A forma inorgânica As^{+5} , por mostrar analogia estrutural com o fosfato, é absorvida via transportadores de fosfato, principalmente os de alta afinidade (Tripathi et al., 2007; Castrillo et al., 2013). Enquanto arsenato pode substituir o fosfato em muitas reações bioquímicas, podendo substituir o fosfato do ATP e formar uma molécula instável ADP-As conduzindo à interrupção do fluxo de energia, o arsenito interfere no funcionamento de proteínas e enzimas através de interações tióis (Finnegan e Chen, 2012).

Por ser um metaloide redox ativo, o As, ao ser absorvido pela planta, induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a peroxidação lipídica, alteração do estado redox celular e toxicidade associada (Finnegan e Chen, 2012).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de absorção e tolerância de plantas de *Lemna valdiviana* expostas a diferentes concentrações das formas inorgânicas trivalente (As^{+3}) e pentavalente (As^{+5}).

2. Material e Métodos

2.1. Material Vegetal e Condições Experimentais

Plantas aquáticas da espécie *Lemna valdiviana* foram coletadas no Horto Botânico do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Posteriormente, foram cultivadas em recipientes de polietileno (0,35 x 0,30 x 0,17 m) contendo 2 L de solução nutritiva Clark (1975), pH 6,5, em sala de crescimento de plantas com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C, $230 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$), sob fotoperíodo de 10 horas, trocando-se a solução nutritiva a cada três dias.

Após o período de aclimação, aproximadamente 1 g de plantas foram transferidas para recipientes de vidro contendo 0,25 L de solução nutritiva de Clark (1975), pH 6,5 e aplicados os tratamentos nas seguintes concentrações de arsenato e de arsenito, nas formas de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NaAsO_2 , respectivamente: 0,0 (controle); 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,5 mg L^{-1} de As, por um período de 3 dias.

2.2 Taxa de crescimento relativo

Para obtenção da taxa de crescimento relativo (TCR), plantas de *Lemna valdiviana* foram coletadas ao final do período de exposição, lavadas com água desionizada e colocadas em estufa convencional a 80°C até obtenção do peso seco constante. A massa seca inicial foi obtida a partir de estimativa de 10 amostragens de plantas nas mesmas condições em que foram utilizadas na montagem do experimento, fazendo a relação entre a massa fresca e seca. A TCR foi calculada utilizando-se a equação proposta por Hunt (1978), usando a massa seca das plantas:

$$\text{TCR} = (\ln w_1 - \ln w_0) \times 1000 / (t_1 - t_0)$$

Onde:

TCR: representa a taxa de crescimento relativo;

$\ln w_1$: logaritmo neperiano do peso seco final;

$\ln w_0$: logaritmo neperiano do peso seco inicial;

t_0 : tempo inicial;

t_1 : tempo final.

2.3 Determinação do arsênio absorvido

Para determinação do As absorvido, o material vegetal seco (planta inteira) foi digerido em mistura de ácido nitro-perclórico, à temperatura máxima de 140 °C, para obtenção do extrato mineral (Marin et al., 1993). A quantificação do As foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência atômica PS Analytical, modelo 10.055, série 532, Reino Unido.

2.4 Determinação do índice de tolerância

O índice de tolerância (IT) (%) ao As foi estimado utilizando-se a equação proposta por Wilkins (1978):

$$IT (\%) = (TCR^*/TCR) \times 100$$

Onde:

TCR*: taxa de crescimento da planta na solução com As (arsenato ou arsenito),

TCR: taxa de crescimento da planta na solução controle.

2.5 Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, sendo os dados submetidos à análise de regressão, ANOVA. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAEG, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

3. Resultados

3.1 Concentração de arsênio em *Lemna valdiviana*

A exposição de *Lemna valdiviana*, tanto ao arsenato (As^{+5}) quanto ao arsenito (As^{+3}), resultou na absorção e acúmulo do metaloide nas diferentes concentrações do poluente. Essa concentração de As nas plantas aumentou linearmente com a disponibilidade crescente desse elemento em solução nutritiva, sendo que as concentrações atingidas nas plantas expostas ao arsenito foram aproximadamente o dobro daquelas expostas ao arsenato.

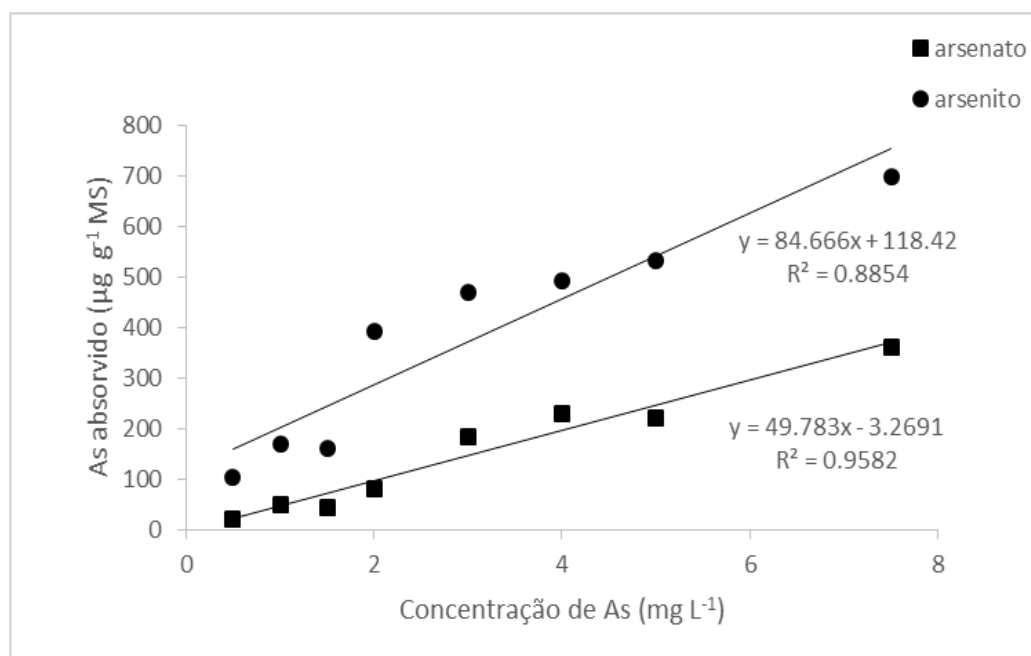


Figura 1. Concentração de As nas plantas de *Lemna valdiviana* expostas ao arsenato e arsenito na solução nutritiva.

3.2 Taxa de crescimento relativo de *Lemna valdiviana*

A exposição de *Lemna valdiviana* ao As causou decréscimo na taxa de crescimento relativo à medida que se aumentou a disponibilidade desse poluente na solução nutritiva. Enquanto nos tratamentos contendo arsenato (As^{+5}) a queda no crescimento teve um comportamento linear, nas plantas expostas ao arsenito (As^{+3}) esse comportamento foi exponencial, o que está associado às maiores concentrações observadas nessas plantas. Nos tratamentos com a forma As^{+5} , a taxa de crescimento relativo (TCR) reduziu a 50% do controle na concentração aproximada de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que na forma As^{+3} essa mesma redução foi observada na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

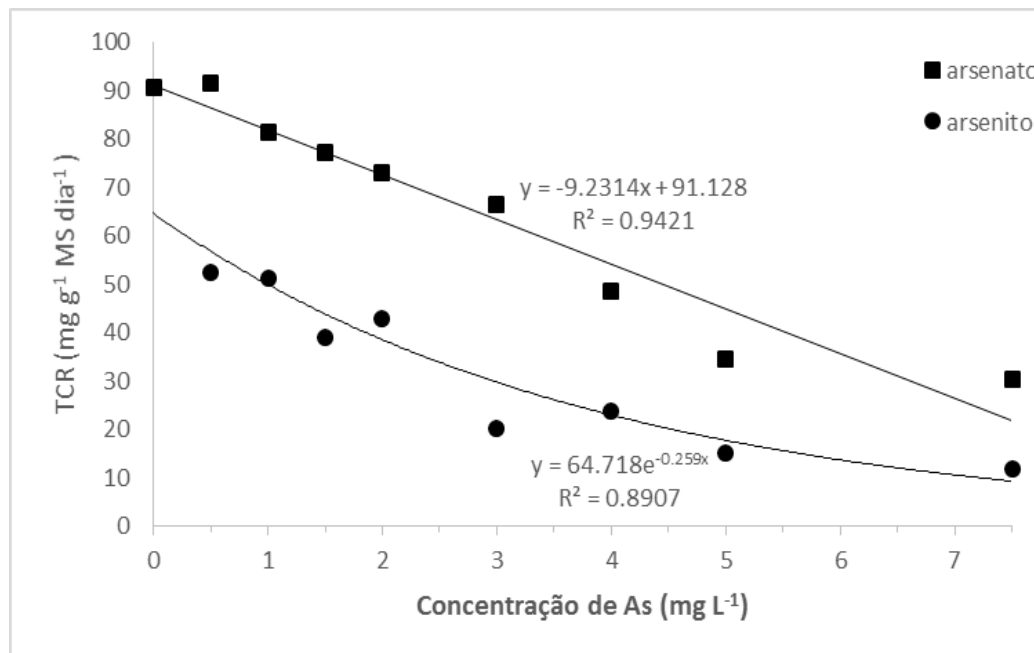
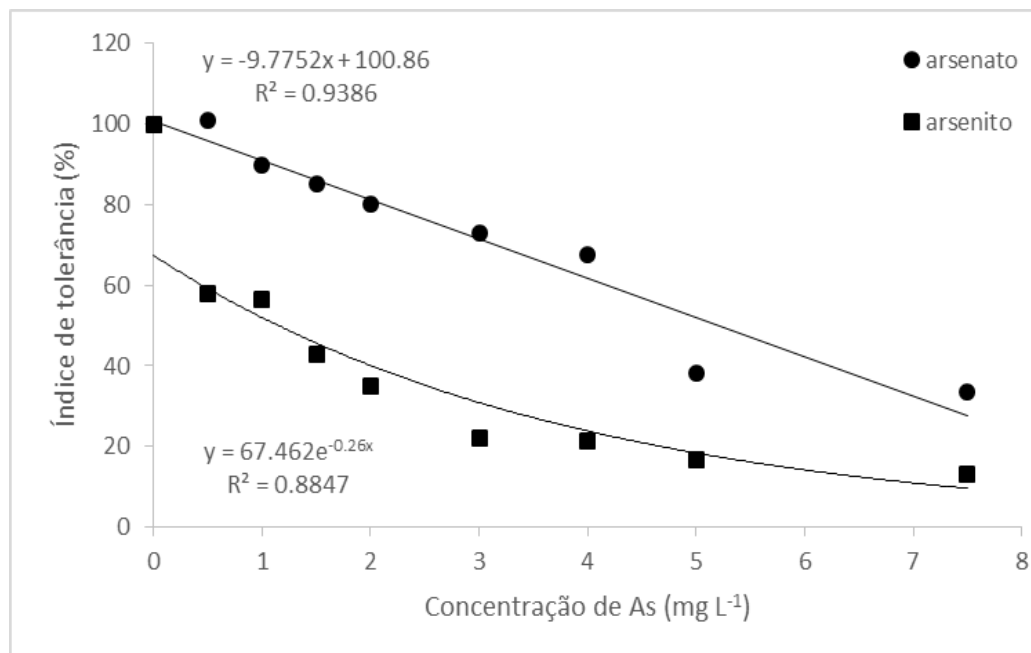


Figura 2. Taxa de crescimento relativo (TCR) em plantas de *Lemna valdiviana* submetidas a diferentes concentrações de arsenato (As^{+5}) e arsenito (As^{+3}) em solução nutritiva.

3.3 Índice de tolerância de *Lemna valdiviana*

Nas diferentes concentrações de arsenato e arsenito ocorreram quedas no crescimento vegetal, mostrando diferentes índices de tolerância da planta ao metaloide. Nas menores concentrações das duas formas ministradas, pentavalente e trivalente, o índice de tolerância foi maior, enquanto que nas maiores o índice foi menor, acompanhando assim o que foi apresentado na TCR, com queda mais drástica para os tratamentos contendo arsenito. Em todas as concentrações o índice de tolerância ao arsenito foi menor em comparação ao arsenato, mostrando sua natureza mais tóxica às plantas.

Figura 3. Índice de tolerância de *Lemna valdiviana* exposta a diferentes concentrações de arsenato e arsenito.



Discussão

Em condições de anaerobiose existe predominância da forma As^{+3} , enquanto que sob condições de aerobiose a predominância é da forma As^{+5} (Figueiredo et al., 2007; Rana, 2008; Ghosh et al., 2008). O arsenato é absorvido via transportadores de fosfato pois possuem comportamento químico semelhante, enquanto que o arsenito é absorvido via canais de aquaporina. Conforme observado, à medida que se aumentou a concentração das formas de arsênio em solução, ocorreu um aumento no acúmulo destas nas plantas. Com esse acúmulo, ocorreu uma redução na taxa de crescimento relativo (TCR) dessas plantas, com grande probabilidade de ter sido causada pela presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas, peroxidação lipídica com extravasamento de eletrólitos, diminuição de pigmentos cloroplásticos, levando provavelmente a diminuição da fotossíntese e da respiração (Mascher et al., 2002). Tal comportamento foi observado em várias espécies quando tratadas

com arsênio, como em arroz, que ao ser exposto ao poluente, sofreu drástica redução em sua TCR (Shri et al., 2009). A queda mais abrupta da TCR e também os menores índices de tolerância ao arsenito parecem estar ligados a sua forma mais tóxica para as plantas, podendo ser capaz de se ligar a grupos sulfidrilas causando danos estruturais, diminuindo assim a absorção de água e nutrientes, uma vez que sua velocidade de transporte para a parte aérea é maior do que o arsenato (Päivöke e Simola, 2001; Zhao et al., 2010; Mathews et al., 2010). Tal desbalanço na absorção de nutrientes foi observado em plantas de trigo quando tratadas tanto com arsenato como com arsenito (Liu et al., 2008). A peroxidação lipídica é outro fator usado para estimar o estresse oxidativo de determinada planta. Em presença de arsenato e arsenito, além da maior produção de ROS, ocorre também aumento de malondialdeído (MDA), gerado pelos danos causados às membranas celulares (Shri et al., 2009). O arsenito é apontado como o principal causador de danos a membranas celulares. Porém muitos outros trabalhos mostram aumentos significativos na peroxidação lipídica em diferentes espécies de plantas tratadas com arsenito e com arsenato, como em plantas de agrião, arroz, feijão (Ozturk et al., 2010; Shri et al., 2009; Stoeva et al., 2005). Tal efeito pode ser também devido a rápida conversão que ocorre dentro da planta, que ao absorver o arsenato, o converte em arsenito para ser transportado ao longo da parte aérea (Zhao et al., 2010; Chakrabarty et al., 2009). As formas químicas arsenato e arsenito apresentaram efeitos tóxicos diferentes em espécimes de *Lemna valdiviana*. Ainda que tenham causado danos diretos e indiretos sobre as plantas, o arsenito se mostrou mais tóxico para as plantas em questão, levando a menores taxas de crescimento e índice de tolerância em concentrações menores quando comparado com o arsenato. Porém, tudo isso quando avaliou-se apenas a concentração externa das formas inorgânicas. Ao analisarmos a concentração interna de As, vemos que existe uma semelhança nos valores que foram absorvidos no tratamento com 1 mg L⁻¹ de arsenito e no tratamento com 4 mg L⁻¹ de arsenato, onde ambos apresentaram concentração interna de arsênio em torno de 200 µg por grama de massa seca. Assim, dentro da planta os danos desencadeados foram similares, não existindo maior relação de toxidez do arsenito em relação ao arsenato para as plantas em questão.

Referências Bibliográficas

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. Priority List of Hazardous substances. 2013. (disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>). Acesso em novembro 2014.

Bhaduri AM, Fulekar MH. 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* 11: 55-69.

Bleeker PM, Hakvoort HWJ, Bliet M, Souer E, Schat H. 2006. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *The Plant Journal* 45: 917–929.

Borba RP, Figueiredo BR, Cavalcanti JA. 2004. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). *Revista Escola de Minas* 57: 45-51.

Castrillo G, Sánchez-Bermejo E, de Lorenzo L, Crevillén P, Fraile-Escanciano A, Tc M, Mouriz A, Catarecha P, Sobrino-Plata J, Olsson S, Leo Del Puerto Y, Mateos I, Rojo E, Hernández LE, Jarillo JA, Piñeiro M, Paz-Ares J, Leyva A. 2013. WRKY6 transcription factor restricts arsenate uptake and transposon activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 2944-2957.

Chakrabarty D, Trivedi PK, Misra P, Tiwari M, Shri M, Shukla D, Kumar S, Rai A, Pandey A, Nigam D, Tripathi RD, Tuli R. 2009. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere* 74:688–702.

Cramer GR. 2010. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16:86-93.

Faria, CEG. 2001. A mineração e o meio ambiente no Brasil. Secretaria Técnica do Fundo Setorial Mineral, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 39pp.

Figueiredo BR, Borba RP, Angélica RS. 2007. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environmental Geochemistry and Health*, 29:109-118.

Finnegan PM, Chen W. 2012. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Frontiers in Physiology* 3: 1-18.

Ghosh P, Banerjee M, Giri AK, Ray K. 2008. Toxicogenomics of arsenic: Classical ideas and recent advances. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659:293-301.

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.

Hu, J., Zheng, A., Pei, D., Shi, G. 2010. Bioaccumulation and Chemical Forms of Cadmium, Copper and Lead in Aquatic Plants. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53: 235-240.

Hunt R. 1978. *Plant growth analysis*. London: Edward Arnold Limited 67 p.

Kumar A, Dwivedi S, Singh RP, Chakrabarty D, Mallick S, Trivedi PK. 2014a. Evaluation of amino acid profile in contrasting arsenic accumulating rice genotypes under arsenic stress. *Biol. Plant.* 58 733–742.

Kumar S, Dubey RS, Tripathi RD, Chakrabarty D, Trivedi. 2015. Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: Current updates and prospective. *Environment International* 74: 221-230.

Leão GA, Oliveira JO, Felipe RTA, Farnese FS, Gusman GS. 2014. Anthocyanins, thiols, and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. *Journal of Plant Interactions*, 9: 143-151.

Liu Q, Hu C, Tan Q, Sun X, Su J, Liang Y. 2008. Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum estivum* L.) under hydroponic conditions. *Ecotox Environ Saf*, 72: 1102-1110.

Lubin JH, Freeman LEB, Cantor KP. 2007. Inorganic Arsenic in Drinking Water: An Evolving Public. *Journal of the National Cancer Institute*, 99:906-907.

Mandal A, Purakayastha TJ, Patra AK, Sanyal SK. 2012. Phytoremediation of arsenic contaminated soil by *Pteris vittata* L. I. Influence of phosphatic fertilizers and repeated harvests. *International Journal of Phytoremediation*, 14: 978-995.

Marin AR, Pezeshki SR, Masschelen PH, Choi HS. 1993. Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. *Journal of Plant Nutrition* 16: 1532-4807.

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

Mazzuco KTM. 2008. Uso da *Canavalia ensiformis* como fitorremediador de solos contaminados por chumbo. Tese de Doutorado. Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

McCarty KM, Hanh HT, Kim KW. 2011. Arsenic geochemistry and human health in South East Asia. *Rev. Environ. Health*, 26: 71–78.

McClintock TR, Chen Y, Bundschuh J, Oliver JT, Navoni J, Olmos V, Lepori EV, Ahsan, H, Parvez F. 2012. Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science of the Total Environment*, 429:76-91.

Mishra S, Starkb H-J, Kupper H. 2014. A different sequence of events than previously reported leads to arsenic-induced damage in *Ceratophyllum demersum* L. *Metallomics* 6: 444-454.

Ozturk F, Duman F, Leblebici Z, Temizgul. 2010. Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environ Exp Bot* 69: 167-174.

Päivöke AEA, Simola LK. 2001. Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: Mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. *Ecotoxicol Environ Safety (Environ Res Section B)* 49:111–121.

Rana SVS. 2008. Metals and apoptosis: Recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22:262-284.

Shankar S, Shanker U, Shikha S. 2014. Arsenic contamination of groundwater: a review of sources, prevalence, health risks, and strategies for mitigation. *The Scientific World Journal* 2014: 1-18.

Sharma VK, Sohn M. 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*, 35: 743–759.

Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP, Sharma N. 2009. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* 20, 289-297.

Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Tuli R. 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf*, 72:1102–1110

Skirycz A, Inze D. 2010. More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, 21:197-203.

Srivastava S, Srivastava AK, Suprasanna P, D'Souza SF. 2012. Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in *Brassica juncea*. *J Exp Bot* 64:303–315.

Stoeva N, Berova M, Zlatev Z. 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biol Plant* 49:293–296

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.

WHO - World Health Organization. 2006. Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 1:306-308 (3rd ed.).

Wilkins DA. 1978. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytologist* 80: 623 633.

Wolff G, Assis LR, Pereira GC, Carvalho JG, Castro EM. 2008. Effects of zinc toxicity on leaves of *Salvinia auriculata* cultivated in nutrient solution. *Planta Daninha*, 26: 315-325.

Yu LJ, Luo YF, Liao B, Xie L J, Chen L, Xiao S, Li J T, Hu SN, Shu WS. 2012. Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 195:97-112.

Zhao F-J, McGrath SP, Meharg A. 2010. Arsenic as a food chain contaminant: Mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu Rev Plant Biol* 61:1–25.

Artigo

Participação do ácido jasmônico nas respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de *Lemna valdiviana* expostas ao arsenato

Resumo

Frequentemente as plantas estão expostas a diferentes estresses bióticos ou abióticos, que prejudicam seu crescimento, desenvolvimento e sua produtividade.

No presente trabalho foram avaliadas as alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas expostas ao arsênio (As) na forma de arsenato (As^{+5}) e a combinação desse poluente com diferentes doses do hormônio vegetal ácido jasmônico (JA). Plantas de *Lemna valdiviana* foram cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, e expostas a seis tratamentos: controle (solução nutritiva); As ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$); As+JA, sendo $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de arsenato e ácido jasmônico nas seguintes concentrações: $50 \text{ }\mu\text{M}$; $100 \text{ }\mu\text{M}$; $250 \text{ }\mu\text{M}$; $500 \text{ }\mu\text{M}$. As plantas permaneceram nessas condições por 24 horas. As plantas absorveram e acumularam o arsênio, que por ser tóxico, acarretou uma série de danos, como aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-), bem como ocorreu aumento na peroxidação lipídica. Na presença do JA, ocorreu aumento na concentração de peróxido de hidrogênio, porém diminuição na concentração do ânion superóxido para valores abaixo do controle, provavelmente para sinalização, uma vez que houve alto incremento da atividade da dismutase do superóxido (SOD), enzima de defesa relacionada com as etapas iniciais de produção das ROS. O JA atuou atenuando os danos causados na peroxidação lipídica, uma vez que desencadeou estímulos para produção de enzimas antioxidantes como: catalase, peroxidase, dismutase do superóxido, peroxidase da glutatona e redutase da glutatona. Os pigmentos fotossintéticos, clorofila *a*, clorofila *b*, foram também afetados na presença dos tratamentos. Já os carotenoides tiveram aumento significativo, atuando em mecanismos de defesa contra o estresse desencadeado.

Palavras-chave: Arsênio, toxicidade, *Lemna valdiviana*, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes, espécies reativas de oxigênio.

Abstract

Frequently the plants are exposed to different stresses, biotic and abiotic, that impair their growth, development and productivity.

In this study we evaluated the biochemical and physiological changes in plants exposed to arsenic (As) in the form of arsenate (As^{+5}) and the combination of this pollutant with different doses of the plant hormone jasmonic acid (JA). *Lemna valdiviana* plants were grown in nutrient solution, pH 6.5, and exposed to six treatments: control (nutrient solution); The (4.0 mg L⁻¹); The + JA, and 4.0 mg L⁻¹ arsenate and jasmonic acid at the following concentrations: 50 μM ; 100 μM ; 250 μM ; 500 μM . The plants remained under these conditions for 24 hours. Plants absorb and accumulate arsenic, to be toxic to, caused a lot of damage, such as increase in reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and there was an increase in peroxidation lipid. In the presence of JA, there was an increase in the concentration of hydrogen peroxide, but a decrease in the concentration of superoxide anion to values below control, probably for signaling, since there was a large increase of dismutase activity dismutase (SOD), defense enzyme associated with the early stages of production of ROS. Jasmonic acid acted attenuating the damage caused lipid peroxidation, once triggered stimulus for the production of antioxidant enzymes such as catalase, peroxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. The photosynthetic pigment, chlorophyll a, chlorophyll b, were also affected in the presence of the treatments. Already carotenoids had significant increase, acting in defense mechanisms against stress triggered.

Keywords: Arsenic, toxicity, *Lemna valdiviana*, oxidative stress, antioxidant enzymes, reactive oxygen species.

1. Introdução

Compostos de As são toxinas ambientais com múltiplos efeitos em representantes do reino Animal e Vegetal. A exposição crônica ao metaloide tem sido associada a diversos tipos de câncer, em várias partes do mundo (Mehranjani e Hemadi, 2007). Alguns exemplos disso foram as tragédias ocorridas no Brasil, Bengala Ocidental, Bangladesh, México e outros países do mundo (Figueiredo et al., 2007). Segundo Rana (2008), metais tóxicos podem simular metais essenciais e assim ganhar acesso a alvos moleculares importantes, podendo interferir em processos celulares. Lembrando que os elementos essenciais estão envolvidos em uma variedade de funções críticas incluindo transcrição gênica, condução do impulso nervoso, transporte de oxigênio e integração de centros ativos de enzimas.

Encontrado em diversas formas orgânicas e inorgânicas, o arsênio apresenta a forma arsenato (As^{+5}), que é amplamente encontrada em ambientes oxigenados, como, solos aeróbicos e águas superficiais. Segundo a Organização das Nações Unidas, a água se apresenta como um dos principais recursos escassos do século 21. O uso de grandes quantidades de água na mineração e a crescente contaminação antropogênica da água, torna cada vez mais importante a avaliação mais pormenorizada da contaminação das águas por resíduos da mineração. O arsenato, uma vez absorvido via transportadores de fosfato desencadeia uma série de alterações fisiológicas e estruturais na planta, resultado esse gerado em grande parte por espécies reativas de oxigênio (Schneider et al., 2013; Liu et al., 2012).

A principal via de metabolismo do oxigênio no organismo envolve a sua completa redução à água, incorporando quatro elétrons ao final da cadeia respiratória (redução tetravalente do oxigênio). Durante este processo são formados intermediários reativos chamados espécies reativas de oxigênio (ROS). Normalmente, a reatividade das ROS é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons.

Os estresses abióticos, como os metais pesados, geram uma série de sinais e um dos primeiros sinais de muitos desses estresses envolvem estas ROS, que modificam a atividade enzimática e regulação gênica (Molassiotis et al., 2011; Mittler et al., 2011). Os autores Mittler et al.(2011), reviram a interação entre sinalização por ROS em resposta a estresses abióticos com os hormônios vegetais.

Ao longo do tempo as plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos capazes de neutralizar a citotoxicidade das ROS. Os mecanismos detoxificadores das ROS encontram-se em diferentes compartimentos como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. A começar por uma cascata enzimática, onde estão incluídas as enzimas dismutase do superóxido (SOD), a qual catalisa a reação de dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 ; as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, como a ascorbato-peroxidase (APX) que detoxifica o H_2O_2 gerado também pela ação da SOD, a catalase (CAT), cuja função também é a detoxificação do H_2O_2 , formando água e oxigênio, o sistema celular de defesa antioxidante envolve também componentes não enzimáticos, dentre os quais se destacam o ascorbato, a glutathione, o β -caroteno e o α -tocoferol. Tais antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (Serkedjieva, 2011).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio que pode atuar inicialmente como molécula sinalizadora de defesa em plantas. Moderadamente reativa, possui meia-vida relativamente longa, 1ms, e por seu pequeno tamanho atravessa membranas celulares migrando por diferentes compartimentos difundindo seus danos e atuando como mensageiro da condição estressante (Gadjev et al., 2008; Karuppanapandian et al., 2011). Uma série de outras espécies reativas, bem como diversas enzimas antioxidativas são constantemente moduladas frente a determinado estresse com o objetivo de contorná-lo. Uma interação mais íntima entre moléculas sinalizadoras se mostra como o cenário mais real. Existem diversas peças envolvidas na indução de resposta de defesa vegetal contra muitos estresses abióticos que merecem ser averiguadas.

A acumulação dessas espécies reativas aumenta a peroxidação de lipídios de membrana, o dano à membrana do cloroplasto e desnaturação de biomoléculas, levando à diminuição da fotossíntese e morte celular (Djanaguiraman et al., 2009). Segundo Djanaguiraman et al. (2011), o acúmulo de ROS pode diminuir a atividade de enzimas antioxidantes como a dismutase do superóxido, catalase e peroxidase, que protegem as células dos danos oxidativos.

Produtos da peroxidação lipídica, por exemplo o malondialdeído (MDA), podem ser utilizados como indicadores da ação dos radicais livres no organismo. O MDA possui ação

citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo.

As plantas produzem uma série de compostos responsáveis pelo controle do crescimento e desenvolvimento, os quais são regulados de uma maneira complexa via uma extensa rede de sinalização interna e externa. Tais sinais internos são substâncias químicas como hormônios e enzimas, que atuam em resposta a flutuações ambientais, embora também estejam sob controle do ritmo circadiano e da programação genética.

Entre os hormônios vegetais, fitohormônios, podemos citar o ácido jasmônico (JA) e seu éster aromático e volátil, o metil jasmonato (MeJA), que estão envolvidos em uma série de funções, a saber: transdução de sinal de estresses, inibição do crescimento e germinação de sementes, promoção da senescência e abscisão foliar, formação de tubérculos, amadurecimento de frutos, inibição da síntese e degradação da clorofila, defesa contra herbivoria e patógenos, entre outros (Pauwels e Goossens, 2011; Robert-Seilaniantz et al. , 2011; Dave Graham, 2012 ; Kombrink de 2012 ; Pieterse et al. , 2012). Com base nisso, esse trabalho teve como intuito avaliar o papel do ácido jasmônico como mediador do estresse oxidativo desencadeado pela forma inorgânica arsenato (As^{+5}) em plantas de *Lemna valdiviana*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Condições Experimentais

Plantas aquáticas da espécie *Lemna valdiviana* foram coletadas no Horto Botânico do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Posteriormente foram cultivadas em recipientes de polietileno (0,35 x 0,30 x 0,17 m) contendo 2 L de solução nutritiva Clark (1975), pH 6,5, em sala de crescimento de plantas com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C, $230 \mu E s^{-1} m^{-2}$), sob fotoperíodo de 10 horas, trocando-se a solução nutritiva a cada três dias. Após o período de aclimação, as plantas foram transferidas para recipientes de vidro contendo 0,25 L de solução nutritiva de Clark (1975), pH 6,5, sendo expostas por 24 horas aos tratamentos contendo As, na forma de $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ e ácido jasmônico, na forma de $C_{12}H_{18}O_3$, assim definidos: controle (somente solução nutritiva); As ($4,0 mg L^{-1}$); As+JA, sendo $4,0 mg L^{-1}$ de As na forma arsenato e ácido jasmônico nas seguintes concentrações: $50 \mu M$; $100 \mu M$; $250 \mu M$; $500 \mu M$.

2.2 Determinação quantitativa de H₂O₂

Os níveis de peróxido de hidrogênio foram determinados com amostras de 200 mg de tecidos foliares e radiculares que foram homogeneizados em meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1mM. O homogenato foi então centrifugado a 10.000 xg durante 15 min, a 4°C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 50µl do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo FeNH₄SO₄ 100 µM (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30min e a absorvância determinada a 560nm. As concentrações de H₂O₂ foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H₂O₂.

2.3 Determinação quantitativa do íon superóxido

Amostras de 50 mg de folhas e raízes foram incubadas em meio de extração constituído de sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100 µM, NADH 20 µM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). A reação foi iniciada pela introdução de 100 µL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 5min. A leitura da absorvância foi feita a 480 nm, durante 5 minutos (Boveris et al., 2002). A produção de O₂⁻ foi avaliada pela determinação do adenocromo acumulado, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 4,0 x 10³ M⁻¹ (Boveris et al., 2002).

2.4 Determinação da peroxidação de lipídios

Amostras de tecidos vegetais (parte aérea e raiz) foram utilizadas na determinação de malondialdeído (MDA), indicativo de peroxidação de lipídios.

Para a medição da peroxidação lipídica, o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), o qual determina MDA como produto final da peroxidação lipídica, foi usado. Material vegetal de planta inteira (500 mg) foi homogeneizado em 5 ml de 0,1% (w / v) de solução de TCA. O homogenato foi centrifugado a 12.000 xg durante 15 min e o sobrenadante (500 µL) foi adicionado a 1,5 ml de 0,5% (p/v) de TBA em TCA 20 % (p/v). A mistura foi incubada em água a 95°C durante 30 min, e a reação foi parada colocando os tubos de reação num banho de gelo por 10 min. Em seguida, passou-se a centrifugação das amostras a 10.000 xg durante 5 min, e a absorvância do sobrenadante lida a 532 nm. O valor para a absorção não-específica a

600 nm e a 400 nm foi subtraída. A quantidade de MDA-TBA complexo (pigmento vermelho) foi calculada a partir do coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hodges et al., 1999).

3.4 Análises enzimáticas

Para a determinação da atividade das enzimas, amostras vegetais foram coletadas, o material congelado em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado a -80°C .

3.4.1 Obtenção dos Extratos Enzimáticos Brutos

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades da catalase (CAT), da peroxidase (POX), da peroxidase do ascorbato (APX) e da dismutase do superóxido (SOD) foram obtidos pela maceração de aproximadamente 0,5 g de tecido vegetal em N_2 líquido, seguido da adição de 2 mL do seguinte meio de homogeneização: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Segue-se filtração através de quatro camadas de gaze e centrifugação a 12.000 xg por 15 minutos, a 4°C , obtendo-se um extrato enzimático bruto. Para determinação da atividade da peroxidase da glutaciona (GPX) foi utilizado o meio de homogeneização: tampão Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM, MgCl_2 10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001). Para a determinação da atividade da redutase da glutaciona (GR) utilizou-se o seguinte meio de homogeneização: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1mM, PVPP 1% (Carlberg e Mannervik, 1985).

3.4.2 Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pela adição de 200 μL do extrato enzimático foliar a 2,8 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM (Havir e McHale, 1987 modificado). O decréscimo na absorbância a 240 nm, à temperatura de 25°C , foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta nos primeiros segundos, após o início da reação. 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 o resultado expresso em $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$.

3.4.3 Determinação da atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) foi determinada utilizando-se o método proposto por Nakano e Asada (1981), estimando-se a taxa de produção de purpurogalina a 420 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μmol de purpurogalina $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF.

3.4.4 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981). O tampão de reação (2,8 mL) consistiu de 50 mM do tampão fosfato monobásico e 0,1 μM de EDTA (pH 6.0), 0,8 mM de ascorbato, 1 mM de H_2O_2 e 200 μL do extrato enzimático bruto. A atividade foi determinada pela oxidação do ascorbato no intervalo de 1 minuto a 290 nm. Para o cálculo da atividade enzimática, utilizou-se o coeficiente molar de extinção 2,8 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ do ascorbato e expressa como μmoles de ácido ascórbico $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF.

3.4.5 Determinação da atividade da dismutase do superóxido

A atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto foliar a 4,95 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM (Del Longo et al., 1993). Toda a reação ocorreu a 25°C, dentro de uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, permanecendo assim durante 5 min. A formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). A absorbância a 560 nm, de um meio de reação igual ao anterior, porém mantido no escuro, por igual tempo, serviu de “branco”. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

3.4.6 Determinação da atividade da peroxidase da glutathione (GPX, EC 1.11.1.9)

Para determinação da atividade da GPX, 0,1 mL do extrato bruto foi adicionado a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0, EDTA

1mM, NaCl 0,114 M, glutationa reduzida (GSH) 1 mM, NADPH 0,2mM, H₂O₂ 0,25mM, uma unidade de redutase da glutationa (Nagalakshmi e Prasad, 2001). Foi medido o decréscimo na absorvância durante o primeiro minuto a 340 nm e utilizou-se para calcular a atividade o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Anderson e Davis, 2004) e o resultado expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ MF.

3.4.7 Determinação da atividade da redutse da glutationa (GR, EC 1.6.4.2)

Para determinação da atividade da GR, 0,1 mL do extrato bruto foi adicionado a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5, EDTA 1mM, glutationa oxidada (GSSG) 1mM, NADPH 0,1mM (em tampão Tris-HCl 0,5 mM, pH 7,5) (Carlberg e Mannervik, 1985). Foi medido o decréscimo na absorvância durante o primeiro minuto a 340 nm e utilizou-se para calcular a atividade o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Foyer e Halliwell, 1976) e o resultado expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ MF.

3.4.8 Determinação de pigmentos fotossintéticos

A determinação de pigmentos cloroplastídicos clorofila a, clorofila b, clorofilas totais e carotenoides foi feita utilizando-se 0,5 g de massa fresca de *Lemna valdiviana* incubada em 5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), saturado com carbonato de cálcio, durante 24 horas. Após a incubação, a absorvância foi medida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470 nm, 646,8 nm e 663,2 nm. Os teores de cada pigmento foram calculados conforme fórmulas propostas por Lichthenthaler (1987).

3.5 Análises estatísticas

O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento e foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando significativo, foi utilizado o teste de comparação de médias de Tukey (SAEG, 1999) em nível de significância de 0,05% (p<0,05). Os resultados foram expressos em média ± desvio-padrão da média (DPM).

4. Resultados

4.1 Concentração de espécies reativas de oxigênio

A concentração do ânion superóxido, O_2^- , aumentou significativamente nas plantas de *Lemna valdiviana* quando expostas ao arsênio, indicativo de estresse oxidativo. Na presença da menor concentração de ácido jasmônico, não ocorreu diferença significativa com o tratamento somente com arsênio. Entretanto, o As em meio contendo de 100 a 500 μM de JA manteve, de modo geral, as concentrações do ânion em valores próximos ao controle, não diferindo estatisticamente.

As concentrações de peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , tiveram significativo aumento em presença de As e esse acréscimo não foi revertido ou atenuado pela presença de JA, em quaisquer concentrações. Em alguns casos, inclusive, verificou-se incremento nessa produção.

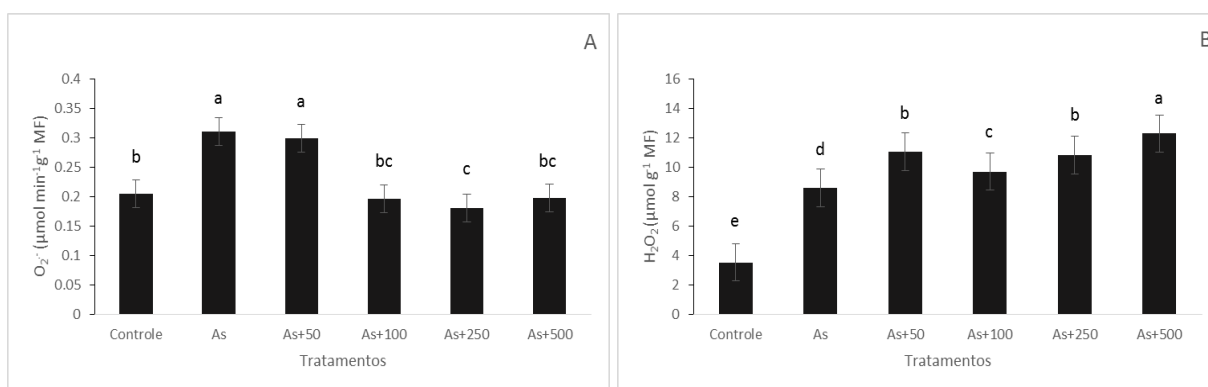


Figura 1. Efeito do arsênio, isolado ou em combinação com diferentes concentrações de ácido jasmônico, sobre a concentração do ânion superóxido (A) e peróxido de hidrogênio (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.2 Efeito do arsênio e do ácido jasmônico sobre a peroxidação lipídica

A concentração de malondialdeído (MDA) aumentou significativamente nas plantas tratadas somente com arsênio, indicando mais uma vez estresse oxidativo gerando peroxidação lipídica sobre as membranas celulares. Na presença do JA, no entanto, os efeitos foram

atenuados, não diferindo do controle e, por vezes, reduzindo as concentrações de MDA para níveis abaixo do controle. Comparativamente ao tratamento contendo apenas As, ocorreram reduções de 70% e 85%, em média, nas concentrações de MDA.

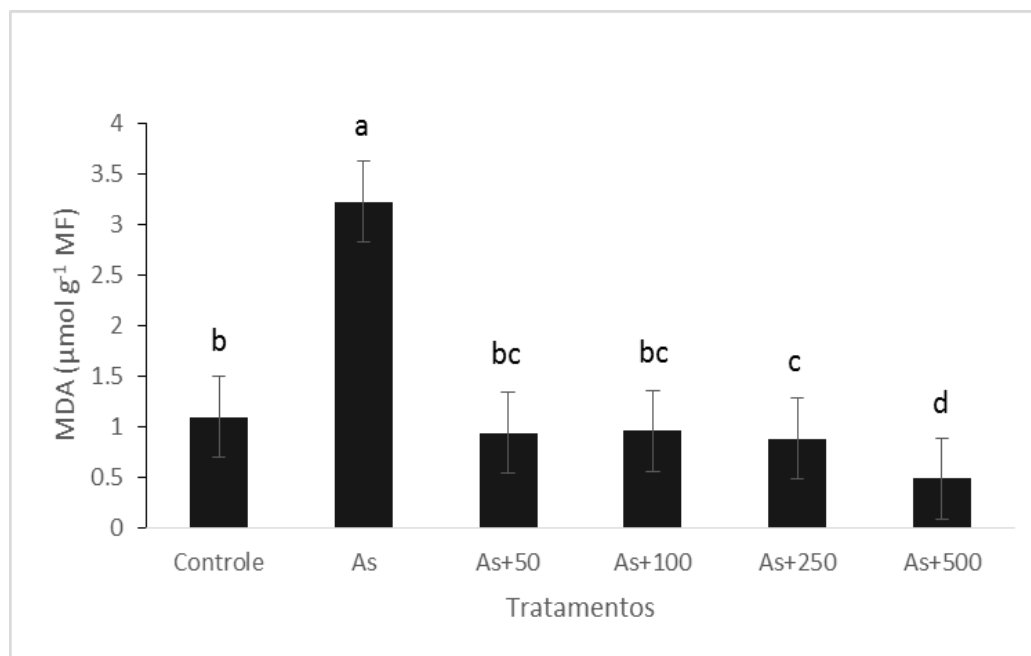


Figura 2. Concentração de malondialdeído (MDA) em plantas de *Lemna valdiviana* expostas ao arsênio, isolado ou combinado com diferentes doses de ácido jasmônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 Efeito do arsênio e do ácido jasmônico sobre a atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da SOD nos tratamentos contendo somente As e As+50 µM de JA não diferiram em relação ao controle. Para as demais doses de JA, no entanto, houve significativo incremento na atividade dessa enzima, com os maiores valores nas maiores concentrações de JA. A atividade da catalase, por sua vez, apresentou aumento em presença de As e essa atividade foi incrementada com a presença de JA, com significativos acréscimos à medida que se aumentou a dose de JA.

A atividade da peroxidase aumentou em presença de As e, com adição de JA, essa atividade teve incrementos significativos apenas nas doses de 250 e 500 µM. A enzima peroxidase do ascorbato não apresentou, de modo geral, alteração na sua atividade em

presença de As, isolado ou em combinação com o jasmonato. Em alguns casos, inclusive, ocorreu redução nessa atividade.

As atividades das enzimas peroxidase da glutaciona e redutase da glutaciona apresentaram alterações semelhantes em relação aos tratamentos. Em presença de As as atividades aumentaram em relação ao controle e, à medida que a concentração de jasmonato aumentou na solução nutritiva, essas atividades aumentaram gradativamente em todos os tratamentos.

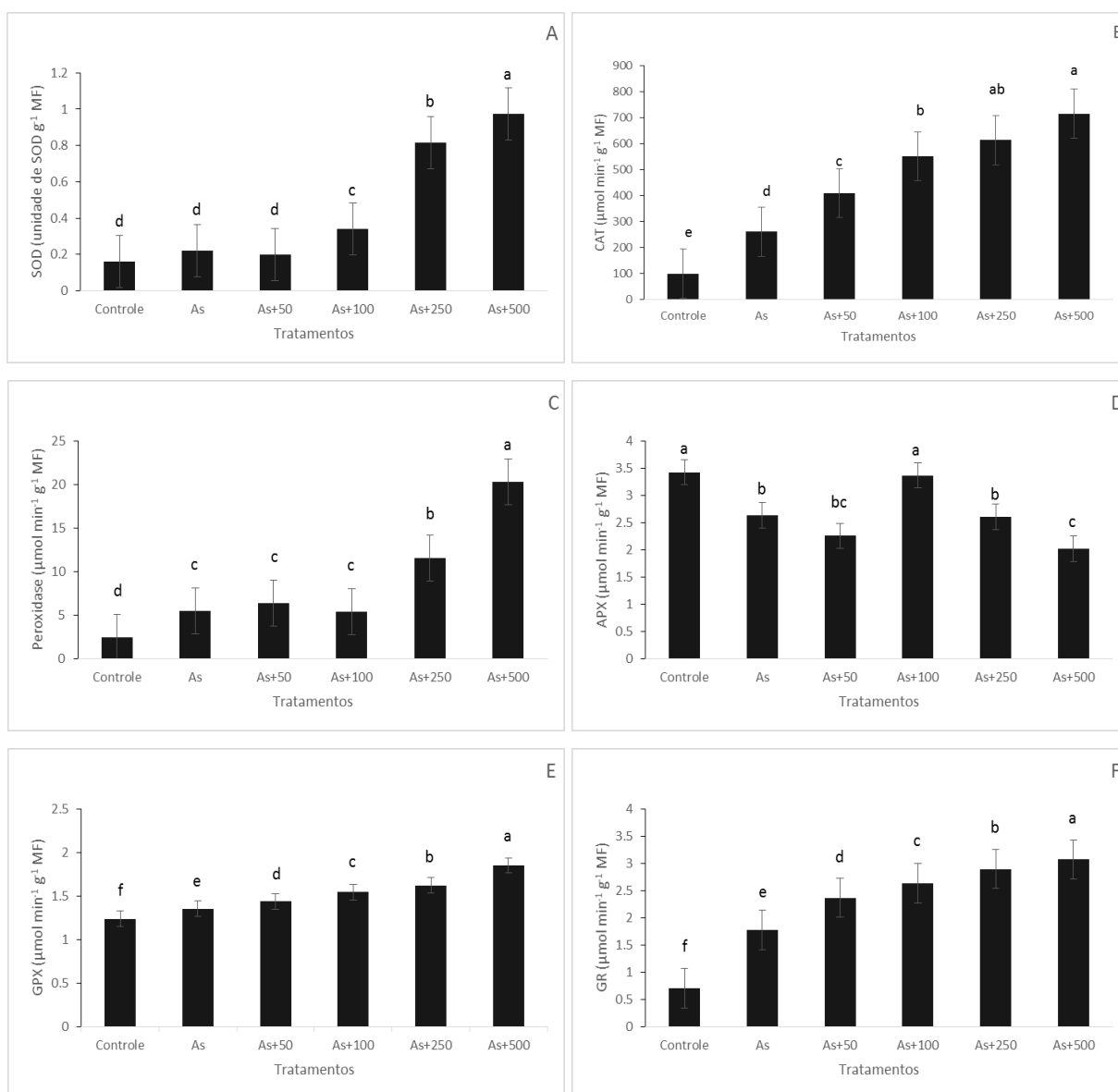
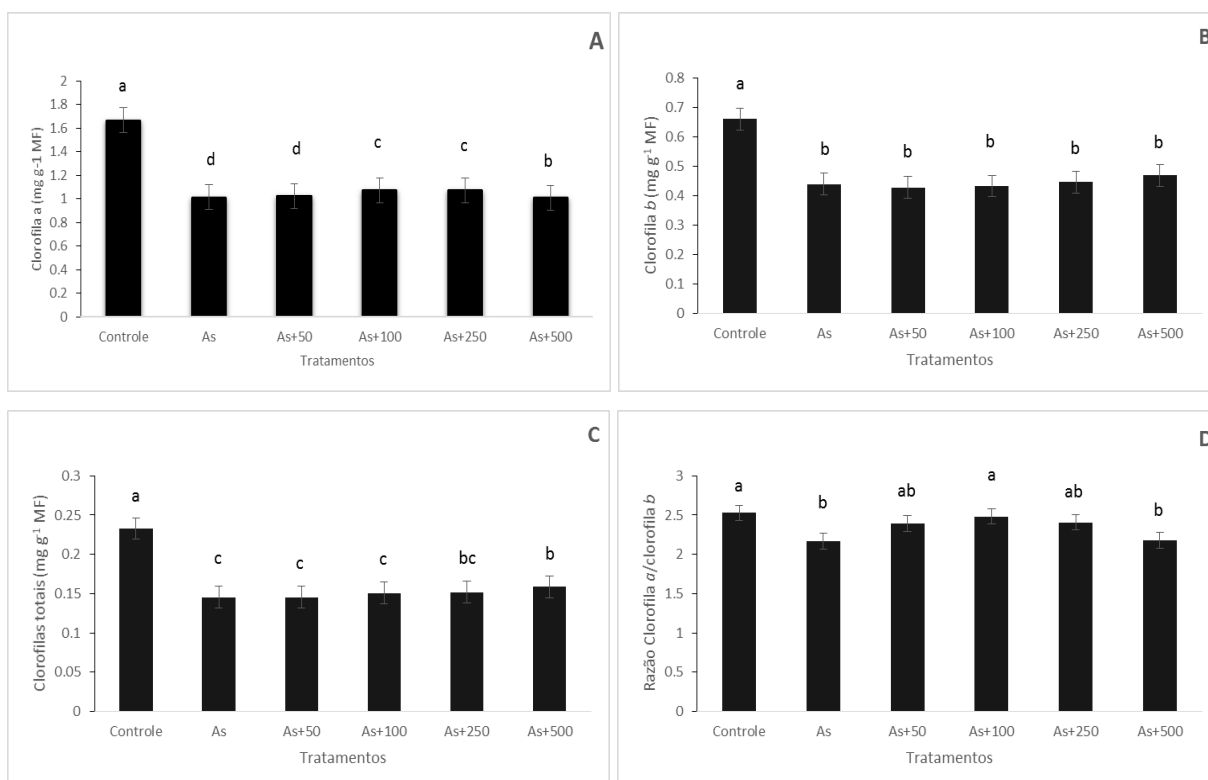


Figura 3. Efeito do arsênio, isolado ou combinado com diferentes doses de ácido jasmônico, sobre atividades das enzimas SOD (A), CAT (B), POX (C), APX (D), GPX (E), GR (F).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4 Efeito do arsênio e do ácido jasmônico sobre os pigmentos fotossintéticos

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais tiveram significativo decréscimo nos tratamentos contendo As. A presença da JA, juntamente com o As, não foi capaz de atenuar ou reverter esse dano, em todas as concentrações de JA utilizadas. A razão das clorofilas *a* e *b* diminuiu, indicando maior degradação da clorofila *a*, principal pigmento envolvido na coleta de luz no fotossistema I e um dos principais no fotossistema II, diminuindo assim a capacidade fotossintetizante das plantas. Os carotenoides, por sua vez, apresentaram significativo acréscimo nas plantas expostas ao As, com incremento de 18% em relação ao controle, indicativo de seu envolvimento em mecanismos de proteção contra o estresse desencadeado pelo poluente. Quando na presença de As e JA estes valores permaneceram, de modo geral, similares ao controle. Tal fato, provavelmente, esteja ligado à ação sinalizadora do ácido jasmônico, que aumentou a concentração de várias enzimas antioxidantes, diminuindo os danos causados pelo As.



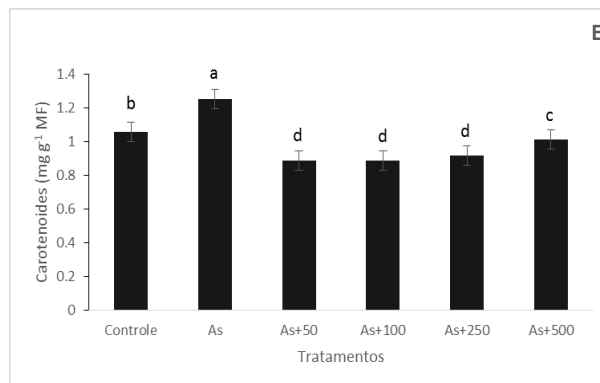


Figura 4. Concentração de pigmentos cloroplásticos, clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (C), razão clorofila *a*/clorofila *b* (D), e carotenoides (E) em plantas de *Lemna valdiviana* expostas ao arsênio, isolado ou combinado com diferentes doses de ácido jasmônico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Discussão

As respostas adequadas às mudanças ambientais são cruciais para o crescimento e desenvolvimento da planta. Nesse contexto, as espécies vegetais diferem enormemente em termos de mecanismos que são adotados para superar a ação de um agente tóxico.

A espécie *Lemna valdiviana*, família Araceae, apresentou capacidade de absorver tanto arsenato quanto arsenito presentes em solução e foi capaz de acumulá-los em altas concentrações, algo já observado nessa família de plantas aquáticas (Duman et al., 2010).

A exposição de *L. valdiviana* ao arsênio (As) desencadeou uma série de danos celulares como produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-), bem como a peroxidação lipídica, indicada pela produção de malondialdeído (MDA), danificando membranas e moléculas essenciais para o desenvolvimento vegetal (Mishra et al., 2014). Após o As ser absorvido pela planta, uma das estratégias utilizadas é o processo de oxirredução, onde o arsenato é reduzido a arsenito, mais tóxico, reação essa que faz parte do metabolismo da planta para tolerância a esse elemento (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). Na sequência da redução do arsenato a arsenito, o arsênio ainda pode ser metabolizado em espécies metiladas. Embora seja mais tóxico para as plantas,

o arsenito pode ser complexado por complexos arseno-tiol e ou fitoquelatina-As para posteriormente ocorrer o sequestro vacuolar (Pickering et al., 2001; Meharg, 2003).

Srivastava et al. (2015) utilizando plantas de *Brassica juncea*, identificaram que cerca de 1.285 genes mostraram alteração significativa no padrão de expressão após tratamento com arsenato, e que esses genes expressos foram categorizados para diversas vias de sinalização, incluindo hormônios (jasmonatos, ácido abscísico, auxina, etileno) e proteínas. Alguns trabalhos tem mostrado que existe grande liberação/formação de ROS após exposição aos jasmonatos (Kauss, 1994; Jung, 2004). As ROS em altas concentrações são tóxicas e, em baixas concentrações são verdadeiros sinalizadores para indução de uma série de compostos, inclusive induzem a rota octadecanoide, que produz compostos como o ácido jasmônico e seu éster aromático, o metil jasmonato (Orozco et al., 1999).

Perante a adição exógena de ácido jasmônico juntamente com um agente poluente, o arsênio (As), no presente trabalho observamos diferentes formas de ação do hormônio vegetal. Este aumentou a concentração de peróxido de hidrogênio, porém diminuiu a concentração do ânion superóxido para valores abaixo do controle, provavelmente para sinalização, uma vez que houve alto incremento da atividade da dismutase do superóxido (SOD), enzima de defesa relacionada com as etapas iniciais de produção das ROS. O aumento da SOD resulta em maiores concentrações de peróxido de hidrogênio e, por isso, deve ser também acompanhado de aumentos de outras enzimas antioxidantes, como catalase (CAT) e peroxidase da glutaciona (GPX), por exemplo (Mishra et al., 2010).

A SOD caracteriza um grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxidos (Scandalios, 1993). Jung (2004) verificou que a atividade total da SOD dobrou após tratamento com metil jasmonato em folhas de *Arabidopsis thaliana*. No que diz respeito à peroxidação lipídica, em presença de As apenas o MDA teve grande aumento. Corroborando com isso, Aflanie et al. (2015) identificaram grande aumento de MDA bem como avançada oxidação de proteínas quando expostas aos metais arsênio, cádmio e mercúrio. Na presença do JA a peroxidação lipídica foi atenuada, uma vez que o hormônio desencadeou estímulos para respostas antioxidantes, enzimáticas ou não.

O ácido jasmônico agiu também como indutor da atividade da enzima CAT que catalisa a decomposição de H_2O_2 em oxigênio e água. Ali et al. (2005) mostraram que a atividade da CAT diminuiu severamente em plantas de *Panax ginseng* e *Panax quinquefolium*

quando tratadas com metil jasmonato (MeJa), apontando para a inativação da atividade de CAT e expressão de isoenzimas. Em *Morinda elliptica*, a atividade da CAT também foi menor nos tratamentos com JA após 6 dias de exposição, como em *Catharanthus roseus* (Chong et al., 2005). Corroborando com os resultado desse trabalho, no tratamento com MeJa em morangueiro ocorreram aumentos significativos na atividade da enzima CAT e em *Cucumis melo L.*, células que estavam expostas a concentrações de JA também tiveram aumento significativo na atividade da CAT, provavelmente para neutralizar o aumento de H₂O₂ (Nafie et al., 2011; Wang, 1999).

Outras enzimas que foram influenciadas na presença de arsênio e de ácido jasmônico foram a POX, que aumentou tanto na presença apenas de arsênio quanto na combinação com ácido jasmônico, e a APX, que catalisa a conversão de H₂O₂ em água. Quando ocorre aumento da atividade da POX é sinal de que concentrações maiores de peróxido de hidrogênio estão sendo formadas, fato também observado em arroz exposto ao arsenato (Shri et al., 2009).

Tanto na presença de apenas arsênio, quanto no combinado arsênio + ácido jasmônico, a APX teve uma diminuição em sua atividade. Estudo realizado com *Lemna minor* mostrou que em baixas concentrações de arsênio ocorreu uma indução da atividade da APX, porém quando expostas a concentrações mais altas, a APX teve queda drástica em sua atividade (Duman et al., 2010). Mais uma vez, as concentrações de H₂O₂ ditarão se a catalase ou a peroxidase do ascorbato serão responsáveis pela desintoxicação desta ROS, e como existem outras isoformas dessas enzimas antioxidantes espalhadas pelos mais diferentes compartimentos celulares, ocorrerá uma influência mais pronunciada em uma ou outra enzima, dependendo assim do momento e do tipo de estresse gerado (Karyotou e Donaldson, 2005). Em *Morinda elliptica*, ocorreu um comportamento diferente da APX, que após tratamento com ácido jasmônico na concentração de 50 µM após 1 dia de tratamento não foi observado diferença na atividade, porém após 3 dias ocorreu aumento e após 6 dias queda drástica em sua atividade. Quando a dose de JA passou a 100 µM, após 3 dias ocorreu um pequeno aumento da APX, mas aos 6 dias outra queda, dessa vez maior que 50% de redução (Chong et al., 2005).

Com relação aos pigmentos fotossintéticos, clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais tiveram reduções na presença isolada de arsênio, devido ao seu efeito tóxico, como também na combinação com o ácido jasmônico, que aumentou a peroxidação de membranas dos

cloroplastos, conforme o trabalho apresentado por (Tewari et al., 2008). Os carotenoides tiveram aumento significativo, indicando que estão envolvidos em mecanismos de defesa contra o estresse desencadeado. Em *Arabidopsis thaliana*, Jung (2004) observou reduções significativas nos pigmentos cloroplastídicos nos tratamentos com metil jasmonato. Utilizando cobre (Cu) como metal e o hormônio metil jasmonato, Hanaka et al. (2015) observaram um aumento na proporção dos pigmentos cloroplastídicos na presença do Cu que induziu a produção de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides.

Ainda com relação ao metabolismo antioxidante, a GR é responsável pela redução da glutathiona oxidada através do NADPH que doa seus elétrons. Delnomdedieu et al. (1994) em um trabalho utilizando ressonância magnética nuclear observaram a redução do arsenato em arsenito in vitro através da ação da glutathiona. Após ser reduzida, a glutathiona será utilizada pela GPX como doadora de elétrons para que a mesma catalise a conversão da espécie reativa de oxigênio peróxido de hidrogênio em água, além de também ser usada no ciclo ascorbato-glutathiona (Noori, 2012; Skladanka et al., 2012; Apel e Hirt, 2004). No presente trabalho ambas tiveram aumento de sua atividade na presença apenas de arsênio e na combinação com JA. Tem sido evidenciado que o incremento de H₂O₂ ou ainda o seu fornecimento de forma exógena em tecido foliares, atua como um sinal indutor de genes para produção de enzimas como a CAT, APX e GPX (Janda et al., 1999; Polidoros e Scandalios, 1999; Breusegen et al., 2001).

Com isso, vemos que o arsenato tem efeito tóxico sobre espécimes de *Lemna valdiviana*, tanto na geração de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, quanto na degradação de pigmentos fotossintéticos e que o ácido jasmônico induz a elevação da maioria das enzimas antioxidantes.

Referências Bibliográficas

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

Anderson JV, Davis 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.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. Priority List of Hazardous substances. 2013. (disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>). Acesso em novembro 2014.

Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44:267-287.

Bleeker PM, Hakvoort HWJ, Blik M, Souer E, Schat H. 2006. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *The Plant Journal* 45: 917–929.

Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L. 2002. Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods in Enzymology*, 105:280-287.

Castrillo G, Sánchez-Bermejo E, de Lorenzo L, Crevillén P, Fraile-Escanciano A, Tc M, Mouriz A, Catarecha P, Sobrino-Plata J, Olsson S, Leo Del Puerto Y, Mateos I, Rojo E, Hernández LE, Jarillo JA, Piñeiro M, Paz-Ares J, Leyva A. 2013. WRKY6 transcription factor restricts arsenate uptake and transposon activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 2944-2957.

Chance B, Maehley AC. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2:764-775.

Chong TM, Abdullah, MA, Fadzillah NM, Lai OM, Lajis NH. 2005. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associates enzymic and non enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *Biochem. J.*, 36: 469–477.

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

Cramer GR. 2010. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 16:86-93.

Dave A, Graham IA. 2012. Oxylin signalling: a distinct role for the jasmonic acid precursor cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (cis-OPDA). *Frontiers in Plant Science*, 3. 42

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.

Delnomdedieu M, Basti MM, Otvos JD, Thomas DJ. 1994. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione - a magnetic resonance study. *Chemico-Biological Interactions*, 90: 139-155.

Djanaguiraman M, Sheeba JA, Devi DD, Bangarusamy U. 2009. Cotton leaf senescence can be delayed by nitrophenolate spray through enhanced antioxidante defense system. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195:213-224.

Djanaguiraman M, Sheeba JA, Devi DD, Bangarusamy U, Prasad PVV. 2010. Nitrophenolates spray can alter boll abscission rate in cotton through enhanced peroxidase activity and increased ascorbate and phenolics levels. *Journal of Plant Physiology*, 167:1-9.

Djanaguiraman M, Prasad PVV, Al-Khatib L. 2011. Ethylene perception inhibitor 1-MCP decreases oxidative damage of leaves through enhanced antioxidant defense mechanisms in soybean plants grown under high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 215-223.

Duman F, Urey E, Temizgul R, Bozok F. 2010. Biological responses of a non-target aquatic plant (*Nasturtium officinale*) to the herbicide, tribenuron-methyl. *Weed Biology and Management*, 10: 81-90.

Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gomez-Cadenas A. 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:8437-8442.

Figueiredo BR, Borba RP, Angélica RS. 2007. Arsenic occurrence in Brazil and human exposure. *Environmental Geochemistry and Health*, 29:109-118.

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.

Gadjev I, Stone JM, Gechev TS. 2008. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 270:87-144.

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.

Ghosh P, Banerjee M, Giri AK, Ray K. 2008. Toxicogenomics of arsenic: Classical ideas and recent advances. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659:293-301.

Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59:309-314.

Gonzaga MIS, Ma LQ, Pacheco EP, Santos WM. 2012. Predicting arsenic bioavailability to hyperaccumulator *Pteris vittata* in arsenic-contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation*, 14: 939-949.

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 chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 125:189-198.

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.

Jung, S. 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 225-231.

Karyotou K, Donaldson RP. 2005. Ascorbate peroxidase, a scavenger of hydrogen peroxide in glyoxysomal membranes *Arch. Biochem. Biophys*, 434: 248–257.

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 Grape and Wine Research* , 5:709-725.

Kauss H, Jeblick W, Zielger J, Kraber W. 1994. Pretreatment of parsley (*Petvoseelinum crispum* L.) suspension culture with methyl jasmonate enhances the elicitation of active oxygen species. *Plant Physiology*, 105: 89- 94.

Kombrink E. 2012. Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta*, 236:1351-1366.

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

Kumar A, Dwivedi S, Singh RP, Chakrabarty D, Mallick S, Trivedi PK. 2014a. Evaluation of amino acid profile in contrasting arsenic accumulating rice genotypes under arsenic stress. *Biol. Plant.* 58 733–742.

Kumar S, Dubey RS, Tripathi RD, Chakrabarty D, Trivedi. 2015. Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: Current updates and prospective. *Environment International* 74: 221-230.

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

Leão GA, Oliveira JO, Felipe RTA, Farnese FS, Gusman GS. 2014. Anthocyanins, thiols, and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. *Journal of Plant Interactions*, 9: 143-151.

Lichthenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In Colowick, S. P., e Kaplan, N. O. *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego.

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.

Lubin JH, Freeman LEB, Cantor KP. 2007. Inorganic Arsenic in Drinking Water: An Evolving Public. *Journal of the National Cancer Institute*, 99:906-907.

McCarty KM, Hanh HT, Kim KW. 2011. Arsenic geochemistry and human health in South East Asia. *Rev. Environ. Health*, 26: 71–78.

Maksymiec W, Wianowska D, Dawidowicz AL, Radkiewicz S, Mardarowicz M, Krupa Z. 2005. The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 162: 1338–1346.

Maksymiec W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 177–187.

Mandal A, Purakayastha TJ, Patra AK, Sanyal SK. 2012. Phytoremediation of arsenic contaminated soil by *Pteris vittata* L. I. Influence of phosphatic fertilizers and repeated haversts. *International Journal of Phytoremediation*, 14: 978-995.

McClintock TR, Chen Y, Bundschuh J, Oliver JT, Navoni J, Olmos V, Lepori EV, Ahsan, H, Parvez F. 2012. Arsenic exposure in Latin América: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science of the Total Environment*, 429:76-91.

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

Meharg AA. 2003. Variation in arsenic accumulation – hyperaccumulation in ferns and their allies. *New Phytologist*, 157: 25–31.

Mehranjani MS, Hemadi M. 2007. The effects of sodium arsenite on the testis structure and sex hormones in vasectomised rats, *Iran J Reprod Med*. 5:127-33.

Mendoza M. 2011. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. *Biotechnologia Vegetal*, Santa Clara, 2:67-75.

Mishra S, Starkb H-J, Kupper H. 2014. A different sequence of events than previously reported leads to arsenic-induced damage in *Ceratophyllum demersum* L. *Metallomics* 6: 444-454.

Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van BF. 2011. ROS signaling: the new wave? Trends in Plant Science, 16:300-309.

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

Molassiotis A, Fotopoulos V. 2011. Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree? Plant Signal and Behavior, 6:210-214.

Muller A, Duchting P, Weiller E W. 2002. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. Planta, 216:44-56.

Müller M, Munné-Bosch S. 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Plant Methods, 7:37.

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.

Pauwels L, Goossens A. 2011. The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. The Plant Cell, 23:3089-3100.

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.

Pieterse CMJ, van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28:489-521.

Pickering IJ, Prince RC, George MJ, Smith RD, George GN, Salt DE. 2000. Reduction and coordination of arsenic in Indian Mustard. *Plant Physiology*, 122: 1171–1177.

Rana SVS. 2008. Metals and apoptosis: Recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22:262-284.

Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49:317-343.

Roese HMP, Lena JC, Paiva JF, Friese K, Castro PTA. 2002. Arsênio no Quadrilátero Ferrífero: presente, passado e futuro. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 67p.

Schneider J, Labory CRG, Rangel WM, Alves E, Guilherme LRG. 2013. Anatomy and ultrastructure alterations of *Leucaena leucocephala* (Lam.) inoculated with mycorrhizal fungi in response to arsenic-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 262:1245-1258.

Serkedjieva J. 2011. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, SD. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, 13: 275-293.

Sharma VK, Sohn M. 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*, 35: 743–759.

Skirycz A, Inze D. 2010. More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, 21:197-203.

Srivastava S, Srivastava AK, Sablok G, Deshpande TU, Suprasanna P. 2015. Transcriptomics profiling of Indian mustard (*Brassica juncea*) under arsenate stress identifies key candidate genes and regulatory pathways. *Front Plant Sci*, 6: 646-659.

Wasternack C, Kombrink E. 2010. Jasmonates: Structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology*, 5:63-77.

WHO - World Health Organization. 2006. Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 1: 306-308 (3rd ed.).

Wolff G, Assis LR, Pereira GC, Carvalho JG, Castro EM. 2008. Effects of zinc toxicity on leaves of *Salvinia auriculata* cultivated in nutrient solution. *Planta Daninha*, 26: 315-325.

Yu LJ, Luo YF, Liao B, Xie L J, Chen L, Xiao S, Li J T, Hu SN, Shu WS. 2012. Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 195:97-112.

Conclusões Gerais

A exposição das plantas de *Lemna valdiviana* ao arsênio, tanto na forma arsenato quanto na forma arsenito, apresentaram semelhanças sobre os parâmetros avaliados, uma vez que a toxicidade das duas formas inorgânicas se mostrou similar, promovendo reduções na taxa de crescimento e índice de tolerância. A exposição ao As^{+3} e ao As^{+5} resultou em grande acúmulo de As nas plantas, com maior taxa de absorção para a forma +3. Ainda que tenham ocorrido tais alterações, as plantas permaneceram vivas, mantendo seu metabolismo. Mesmo que tenha tido a capacidade de se manter viva e absorver altas concentrações de arsênio, as plantas de *L. valdiviana* sofreram uma série de danos que comprometeram processos fisiológicos e bioquímicos. Tais efeitos são provavelmente resultado de uma maior geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). A adição exógena de ácido jasmônico (JA) atenuou os efeitos nocivos do As, uma vez que agiu como sinalizador para aumentos nas atividades de compostos antioxidantes, enzimáticos ou não. Assim, o JA é um sinalizador importante para a resposta de plantas ao estresse desencadeado por As, atuando em diversas vias.