

FERNANDA DOS SANTOS FARNESE

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE DESENCADEADO
POR ARSÊNIO EM *Pistia stratiotes* L. (ARACEAE)**

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

2011

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

T

F235e
2011

Farnese, Fernanda dos Santos, 1986-

Efeito do óxido nítrico na atenuação do estresse desencadeado por arsênio em *Pistia stratiotes* L. (Araceae) / Fernanda dos Santos Farnese. – Viçosa, MG, 2011. x, 58f. : il. ; 29cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Plantas - Metabolismo. 2. Óxido nítrico. 3. Arsênio - Efeito fisiológico. 4. Fitorremediação. 5. Stress oxidativo. 6. Antioxidantes. I. Universidade Federal de Viçosa.
II.Título.

CDD 22.ed. 572.42

FERNANDA DOS SANTOS FARNESE

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE DESENCADEADO
POR ARSÊNIO EM *Pistia stratiotes* L. (ARACEAE)**

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: 18 de fevereiro de 2011.

João Marcos de Araújo

Luzimar Campos da Silva

Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

Aos meus pais, como reconhecimento por todo apoio
e amor sem medidas, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Juraci, pela orientação ao longo de todos esses anos e, é claro, pelas boas conversas e pelos cafezinhos no Itaú.

Aos membros da banca João Marcos e Luzimar, pela disponibilidade em analisar este material.

À minha grande família, minha mãe, meu pai, Lucas e Mariana, por serem sempre tão essenciais em minha vida e por partilharem cada momento comigo de forma inesquecível.

À Gabriela, que tanto me auxiliou nesse e em outros trabalhos. E que foi muito além disso, trazendo luz e alegria para minha vida!

Aos colegas de mestrado e de laboratório, em especial à Grasi, sempre tão divertida e sempre tão pronta a ajudar. Vou sentir sua falta!

Ao meu querido Paulo, por fazer das minhas conquistas as suas conquistas, tornando-as ainda mais especiais.

A Deus.

BIOGRAFIA

Fernanda dos Santos Farnese, filha de Edmar Farnese e Zélia Santos Farnese, nasceu em 11 de abril de 1986, em Lagoa da Prata, MG.

Em fevereiro de 2009, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Minas Gerais e, no mesmo ano, iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa.

Em fevereiro de 2011 submeteu-se à defesa de dissertação.

CONTEÚDO

RESUMO	Vii
ABSTRACT	Ix
Introdução Geral	1
Artigo I	4
1. Introdução	5
2. Materiais e métodos	7
2.1 Cinética de absorção de arsênio	7
2.2 Efeito do NO sobre o metabolismo vegetal	8
2.2.1 Teor de arsênio e fator de translocação	8
2.2.2 Determinação da concentração de espécies reativas de oxigênio	8
2.2.3 Integridade de membrana	9
2.2.4 Sistema antioxidante enzimático	9
2.2.5 Sistema antioxidante não enzimático	10
2.3 Análises estatísticas	11
3. Resultados	11
3.1 Cinética de absorção de arsênio	11
3.2 Teor de arsênio absorvido e fator de translocação	11
3.3 Concentração de espécies reativas de oxigênio	12
3.4 Efeito do arsênio e do SNP na integridade da membrana	14
3.5 Efeito do arsênio e do SNP sobre o sistema antioxidante enzimático	14
3.6 Efeito do arsênio e do SNP na concentração de ascorbato e desidroascorbato	17
4. Discussão	18
5. Referências	21
Artigo II	27
1. Introdução	29
2. Materiais e métodos	31
2.1 Absorção de As, efeitos sobre o crescimento vegetal e nutrição mineral	31

2.1.1	Acúmulo de arsênio e seu efeito sobre o crescimento vegetal	31
2.1.2	Índice de tolerância ao arsênio	32
2.1.3	Determinação da concentração de nutrientes minerais	32
2.2	Avaliação das alterações metabólicas	32
2.2.1	Concentração de espécies reativas de oxigênio	32
2.2.2	Capacidade antioxidante total	33
2.2.3	Concentração dos pigmentos cloroplastídicos	33
2.2.4	Parâmetros de fluorescência	34
2.2.5	Trocas gasosas	34
2.3	Análises estatísticas	34
3.	Resultados	35
3.1	Acúmulo de arsênio e seu efeito sobre o crescimento vegetal	35
3.2	Índice de tolerância ao arsênio	37
3.3	Concentração de nutrientes minerais	37
3.4	Concentração de espécies reativas de oxigênio	38
3.5	Capacidade antioxidante total	39
3.6	Concentração dos pigmentos cloroplastídicos	40
3.7	Efeito do arsênio e do SNP sobre os parâmetros de fluorescência	41
3.8	Efeito do arsênio e do SNP sobre as trocas gasosas	41
4.	Discussão	45
5.	Referências	48
	Conclusões Gerais	54
	Referências	55

RESUMO

FARNESE, Fernanda dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Efeito do óxido nítrico na atenuação do estresse desencadeado por arsênio em *Pistia stratiotes* L. (Araceae)**. Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

O efeito do óxido nítrico na atenuação do estresse desencadeado pelo arsênio (As) foi avaliado em *Pistia stratiotes*, sendo o óxido nítrico suprido na forma de nitroprussiato sódico (SNP). As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, $\frac{1}{2}$ da força iônica, foram expostas a quatro tratamentos: controle (apenas solução nutritiva); SNP (0,1 mg L⁻¹); As (1,5 mg L⁻¹); As + SNP (1,5 e 0,1 mg L⁻¹, respectivamente). As plantas permaneceram nessas condições por sete dias, para análises de crescimento e absorção de As e nutrientes minerais, e por 24 horas, para análises de alterações metabólicas. A cinética de absorção de As foi analisada, utilizando-se para isso seis concentrações do poluente, nas quais as plantas permaneceram por duas horas: 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹. Os parâmetros de cinética de absorção de As por *P. stratiotes* indicam que a absorção do metalóide ocorre por transportadores de alta afinidade. O As absorvido foi acumulado nos tecidos vegetais, principalmente na raiz, conferindo a *P. stratiotes* baixo fator de translocação e o status de possível hiperacumuladora, características que não foram afetadas pela presença de SNP. O acúmulo de As desencadeou uma série de danos, como aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) e na peroxidação lipídica. Estes danos foram revertidos pelo SNP, que aparentemente atuou diretamente como antioxidante e como molécula sinalizadora, estimulando respostas antioxidantes enzimáticas (catalase, peroxidase e peroxidase do ascorbato) e não enzimáticas (estímulo do ciclo ascorbato-glutationa), o que se refletiu em aumentos na capacidade antioxidante total. Como consequência, o índice de tolerância ao As aumentou na presença de SNP. Os parâmetros fotossintéticos também foram afetados pela presença de As, sendo que os teores de pigmentos cloroplastídicos diminuíram, com exceção dos carotenóides, que apresentaram aumentos em suas concentrações. A presença de SNP restaurou os teores dos pigmentos à níveis normais. A eficiência fotoquímica máxima do FSII e o rendimento quântico do transporte de elétrons também foram afetados negativamente pelo As, enquanto coeficiente de extinção não fotoquímica apresentou incrementos significativos. A assimilação líquida de carbono decresceu significativamente na presença de As, enquanto g_s não se alterou e a razão Ci/Ca aumentou, indicando a ocorrência de limitações bioquímicas. A razão $\Phi_{FSII} / \Phi_{CO_2}$ foi

maior nas plantas expostas ao As. O SNP teve efeito protetor tanto sobre a fluorescência quanto sobre as trocas gasosas, restaurando estes parâmetros à níveis normais. Em relação aos teores de nutrientes minerais, a exposição ao As diminuiu os teores de ferro, magnésio, manganês e fósforo, não tendo afetado os teores de cálcio. Destes nutrientes, apenas os teores de fósforo não retornaram a valores semelhantes ao controle quando o As foi suprido em combinação com SNP. Desta forma o óxido nítrico, suprido na forma de SNP, foi eficaz na atenuação dos danos desencadeados pelo As, agindo tanto como antioxidante direto quanto como molécula sinalizadora.

ABSTRACT

FARNESE, Fernanda dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2011. **Effect of nitric oxide in amelioration of arsenic-induced stress in *Pistia stratiotes* L. (Araceae)**. Adviser: Juraci Alves de Oliveira.

Nitric oxide effect on attenuating the stress triggered by arsenic (As) was evaluated in *Pistia stratiotes*, being the nitric oxide supplied in the form of sodium nitroprusiate (SNP). The plants were cultivated in nutrient solution, pH 6.5, ½ ion force and exposed to four treatments: control (nutrient solution) SNP (0.1 mg L⁻¹); As (1.5 mg L⁻¹); As + SNP (1.5 and 0.1 mg L⁻¹, respectively). The plants remained in this condition for seven days to the analysis of growth and, As and mineral nutrients uptake and for 24 hours, to the analysis of metabolic changes. The As uptake kinetic was analyzed using six concentrations of this pollutant, in which the plants remained for two hours: 0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.5 mg L⁻¹. The parameters of As uptake kinetic in *P. stratiotes* indicate that this metalloid uptake occurs by the high affinity transporters. The absorbed As was accumulated in the vegetal tissues, mainly in the roots, which gave to *P. stratiotes* a low translocation factor and a status of probably hyperaccumulator, a characteristic that was not affected by SNP presence. The As accumulation triggered many damages, as the increment of reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide) and lipid peroxidation. These damages were reversed by SNP, which apparently acted directly as antioxidant and as a signaling molecule, stimulating enzymatic (catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase) and non-enzymatic (stimulating the ascorbato-glutathione cycle) antioxidant responses, which reflected in an increase in total antioxidant capacity. As a consequence, As tolerance index increased in the presence of SNP. The photosynthetic parameters were also affected, with the reduction in the chloroplastic pigments concentration in presence of As, except carotenoids that showed an increase in their concentration. The SNP presence restored pigments concentration to the normal levels. The maximum photochemical efficiency of PSII and the quantum yield of electron transport were also negatively affected by As, while the non-photochemical quenching (NPQ) presented significant increment. Carbon assimilation (A) decreased significantly in As presence whereas g_s did not alter and the Ci/Ca rate increased, indicating biochemical limitations. The $\Phi_{\text{FSII}} / \Phi_{\text{CO}_2}$ rate was higher in plants exposed to As. For the mineral nutrients concentration, As exposition decreased iron, magnesium, manganese and phosphorus concentration, but did not alter calcium concentration.

Of these nutrients, only phosphorus concentration did not show similar values than control when As was supplied in combination to SNP. Therefore, nitric oxide, supplied in the form of SNP, was efficient on attenuating damages triggered by As, acting as a direct antioxidant and as a signaling molecule.

INTRODUÇÃO

A água, apesar de encontrar-se amplamente distribuída em todos os ambientes, tem apresentado limitações de uso impostas, principalmente, por alterações em suas condições físico-químicas e microbiológicas. A contaminação da água por resíduos oriundos de diversos processos de origem antrópica é a principal causadora dessas alterações, colocando em risco a saúde e o bem-estar das populações. Dentre os vários tipos de resíduos químicos, aqueles contendo metais pesados e outros íons inorgânicos tóxicos são particularmente preocupantes, pois não são biodegradáveis. Uma vez liberados no sistema aquático, seus efeitos podem perpetuar-se por vários ciclos antes que se tornem biologicamente indisponíveis, o que normalmente ocorre por incorporação em sedimentos orgânicos e inorgânicos (Matschullat, 2000).

A contaminação do ambiente aquático com arsênio (As) tem despertado a atenção de pesquisadores e de órgãos governamentais em muitos países. A elevação das concentrações de As no ambiente aquático resulta do despejo direto de resíduos nos cursos d'água ou das atividades antrópicas que liberam o As presente no solo, possibilitando, assim, que esse elemento seja drenado e atinja rios, lagos e águas subterrâneas (Mandal e Suzuki, 2002).

A ingestão de água contaminada com As é a forma mais comum de exposição do homem à toxicidade desse elemento (Lee et al., 2006). A contaminação com As ocasiona diferentes patologias, podendo levar à morte. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a concentração máxima de As permitida em águas consideradas potáveis é de até $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 2000). Estima-se que existam pelo menos 18 milhões de pessoas bebendo água contaminada com As, oriunda de quatro milhões de poços subterrâneos, com concentrações de até 200mg L^{-1} de As

(Roese et al., 2002). Diante de tais fatos, tem-se buscado técnicas capazes de eliminar esse poluente do ambiente natural. Métodos físico-químicos, no entanto, envolvem alto capital e podem acarretar danos ao ambiente, além de serem específicos para cada metal (Mishra e Tripathi, 2008). Neste contexto a fitorremediação, técnica promissora e de baixo custo, se insere como uma alternativa para a descontaminação de ambientes contaminados com As (Susarla et al., 2002).

A fitorremediação é uma técnica que utiliza plantas para remover, transformar ou conter compostos tóxicos no solo, água ou atmosfera. Esta técnica está ganhando uma importância cada vez maior nos últimos anos e diversos estudos nessa área têm sido desenvolvidos. Os resultados obtidos até o momento demonstram que a fitorremediação apresenta grande potencial para tratamento eficaz e em larga escala de poluentes orgânicos e inorgânicos (Robinson et al., 2006; Harley e Lepp, 2008; Mishra e Tripathi, 2008). De fato, algumas plantas, denominadas hiperacumuladoras, possuem grande capacidade de acumular metais e podem ser utilizadas para extrair elementos tóxicos de áreas contaminadas. Mais de 400 plantas hiperacumuladoras de metais, pertencentes a 45 famílias, já foram documentadas. Entretanto, plantas hiperacumuladoras de As ainda são pouco conhecidas, sendo consideradas raras (Sun et al., 2008).

O As acumulado pelas plantas desencadeia uma série de alterações bioquímicas e fisiológicas, como inibições do processo fotossintético, respiratório e geração de espécies reativas de oxigênio (Sing et al., 2006; Rahman et al., 2007). Evidências indicam, no entanto, que o óxido nítrico (NO), molécula gasosa fundamental para a sinalização em plantas, pode atenuar os efeitos danosos de metais (Xiong et al., 2009). O NO tem papel significativo na modulação de várias funções bioquímicas e fisiológicas em plantas, estando também envolvido

na tolerância a diversos tipos de estresses abióticos (Crawford e Guo, 2005). O presente trabalho objetivou analisar o efeito do As sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos em plantas, enfocando o papel do NO, suprido de forma exógena, na atenuação dos efeitos deletérios deste poluente.

Artigo I

Óxido nítrico e seu papel como mediador na resposta de plantas ao estresse oxidativo induzido por arsênio

RESUMO

A toxicidade do arsênio (As) e o efeito do óxido nítrico, suprido na forma de nitroprussiato sódico (SNP), foram analisados em *Pistia stratiotes*. As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, ½ da força iônica, foram expostas a quatro tratamentos, por 24 horas: controle (apenas solução nutritiva); SNP (0,1 mg L⁻¹); As (1,5 mg L⁻¹); As + SNP (1,5 e 0,1 mg L⁻¹, respectivamente). A cinética de absorção de As foi analisada, utilizando-se para isso seis concentrações do poluente, nas quais as plantas permaneceram por duas horas: 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹. Os parâmetros de cinética de absorção de As por *P. stratiotes* indicam que a absorção do metalóide ocorre por transportadores de alta afinidade. O As absorvido foi acumulado principalmente na raiz, conferindo a *P. stratiotes* um baixo fator de translocação, características que não foram afetadas pela presença de SNP. O acúmulo de As desencadeou uma série de danos, como aumentos na produção de espécies reativas de oxigênio e na peroxidação lipídica. Estes danos foram atenuados pelo SNP, que no presente trabalho atuou diretamente como antioxidante, eliminando o ânion superóxido, e como sinalizador, desencadeando aumentos na concentração de antioxidantes enzimáticos e estimulando a ocorrência do ciclo ascorbato-glutationa.

Palavras-chave: enzimas antioxidantes, ascorbato, cinética de absorção, toxicidade, *Pistia stratiotes*, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Arsenic (As) toxicity and nitric oxide effect, supplied in the form of sodium nitroprussiate (SNP), were analyzed in *Pistia stratiotes*. The plants were cultivated in nutrient solution, pH 6.5, and exposed to four treatments, for 24 hours: control (nutrient solution) SNP (0.1 mg L⁻¹); As (1.5 mg L⁻¹); As + SNP (1.5 and 0.1 mg L⁻¹, respectively). The As uptake kinetic was analyzed

using six concentrations of this pollutant, in which the plants remained for two hours: 0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.5 mg L⁻¹. The parameters of As uptake kinetic in *P. stratiotes* indicate that this metalloid uptake occurs by the high affinity transporters. The absorbed As was accumulated in the vegetal tissues, mainly in the roots, which gave to *P. stratiotes* a low translocation factor, a characteristic that was not affected by SNP presence. The As accumulation triggered many damages, as the increment of reactive oxygen species and lipid peroxidation. These damages were reversed by SNP, which in this study, acted directly as antioxidant, eliminating superoxide anion and also as a signaling molecule, increasing the synthesis of enzymatic and stimulating the occurrence of ascorbato-glutathione cycle.

Keywords: antioxidant enzymes, ascorbate, uptake kinetic, toxicity, *Pistia stratiotes*, reactive oxygen species.

1. Introdução

O arsênio (As) é um elemento carcinogênico que, embora ocorra naturalmente na crosta terrestre, tem se acumulado em concentrações tóxicas na água e no solo devido a ações antrópicas. Este acúmulo, associado a sua alta toxicidade, tem resultado em diversas pesquisas que visam à retirada do poluente do ambiente (Singh et al., 2010; Shri et al., 2009; Zabłudowska et al., 2009). Plantas apresentam mecanismos adaptativos para acumular ou tolerar altas concentrações de poluentes, sendo capazes de, em muitos casos, remediar o ambiente de forma mais econômica e vantajosa que as demais técnicas existentes (Yang et al., 2005). Dentre essas plantas ressalta-se aqui a macrófita aquática *Pistia stratiotes* L. (Araceae), a qual apresenta grande potencial para a fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados com xenobióticos (Xian et al., 2010).

A disponibilidade do poluente para a planta depende de sua forma química, sendo que no ambiente aquático superficial, que representa a principal fonte de contaminação com As, o

metalóide ocorre predominantemente na forma de arsenato (Mandal e Suzuki, 2002). O arsenato, devido a sua analogia química com o fosfato, é facilmente absorvido pelas plantas, podendo ocasionar uma série de danos, como o estresse oxidativo (Singh et al., 2009).

O estresse oxidativo decorre do aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em danos celulares e mesmo na morte celular. Estes danos podem ser evitados ou minimizados pela atuação de mecanismos antioxidativos enzimáticos, como as enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidases (POX), catalases (CAT) e peroxidases do ascorbato (APX), e mecanismos não enzimáticos, como a glutatona e o ascorbato (Singh et al., 2009). Estes sistemas antioxidativos representam mecanismos de defesa das plantas e aparentemente são estimulados por moléculas sinalizadoras, como por exemplo, o óxido nítrico (NO).

O NO é uma molécula gasosa, pequena e bioativa, a qual tem recebido grande atenção dos pesquisadores devido a sua participação em diversos processos celulares, incluindo a tolerância a vários tipos de estresse (Leitner et al., 2009). De fato, o NO tem um papel central em várias respostas a estresses bióticos e abióticos, incluindo metais pesados, agindo principalmente como uma molécula sinalizadora (Wojtakzek, 2000). Já foi demonstrado que o NO suprido de forma exógena pode aumentar a tolerância de plantas à toxicidade de alguns metais pesados como cobre, alumínio e cádmio (Xue et al., 2008). Este efeito do NO é devido a aumentos na atividade de enzimas antioxidantes, bem como à eliminação direta de ROS e à diminuição da translocação do poluente da raiz para a parte aérea (Xiong et al., 2010). No entanto, existem poucas informações disponíveis sobre o papel do NO na regulação do estresse induzido por As (Singh et al., 2009). Desta forma, o objetivo deste artigo foi examinar o papel do NO na mediação do estresse oxidativo induzido pelo As em espécimes de *P. stratiotes*, avaliando-se alterações na produção de ROS e no metabolismo antioxidativo.

2. Material e métodos

Espécimes de *Pistia stratiotes* L. (Araceae) foram coletados no horto florestal da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil) e transferidos para solução nutritiva de Clark (1975), $\frac{1}{2}$ da força iônica, pH 6,5, sendo mantidas em sala de crescimento de plantas, com luz e temperatura controladas, e fotoperíodo de 16 horas. As plantas permaneceram nestas condições por três dias para aclimação.

2.1 Cinética de absorção de arsênio

Um método de depleção modificado foi utilizado para determinar os parâmetros da cinética de absorção de As (Zhang et al., 2009). As plantas aclimatadas foram transferidas para recipientes de vidro contendo solução nutritiva de Clark, $\frac{1}{2}$ da força iônica, pH 6,5, contendo ou não As nas seguintes concentrações: 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹. Cada recipiente foi pesado no início e no fim do experimento para calcular a perda de água por evapotranspiração. A solução foi amostrada e as plantas foram coletadas após duas horas de exposição ao metalóide. As raízes foram separadas das folhas, secas em estufa até obtenção do peso seco, sendo então digeridas em ácido nítrico-perclórico (Marin et al., 1993). A concentração de As nas raízes e nas soluções amostradas foi determinada por espectrofotometria de emissão em plasma (Shimadzu, model AA-6701FG). A taxa de absorção foi calculada pela medida da depleção de As da solução (Tylova-Munzarova et al., 2005). Valores para V_{\max} e K_m foram estimados pela equação de Michaelis-Menten modificada em duplos recíprocos (Lineweaver e Burk, 1934).

2.2 Efeito do NO sobre o metabolismo vegetal

As plantas aclimatadas foram submetidas a quatro tratamentos: controle (apenas solução nutritiva); SNP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$); As ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e As + SNP ($1,5$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). O SNP (nitroprussiato de sódio) é uma substância comumente utilizada em estudos bioquímicos como doadora de NO. As plantas permaneceram nestas condições por 24 horas.

2.2.1 Teor de arsênio absorvido e fator de translocação

Após o período de exposição aos tratamentos as plantas foram separadas em folhas e raízes, lavadas em água desionizada e mantidas em estufa convencional a 80°C , até a obtenção do peso seco constante. O material vegetal seco foi triturado e digerido em ácido nitro-perclórico (Marin et al., 1993), sendo a concentração de As determinada através de espectrofotômetro de emissão em plasma (Shimadzu, model AA-6701FG). O fator de translocação foi calculado através da razão entre a concentração do As nas folhas e sua concentração nas raízes (Mishra et al., 2007).

2.2.2 Determinação da concentração de espécies reativas de oxigênio

Para determinação da concentração de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), amostras de 50 mg de ápices radiculares e de folhas foram incubadas em meio de extração constituído de sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) $100 \mu\text{M}$, NADH $20 \mu\text{M}$ e tampão fosfato de sódio 20 mM , pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). A reação foi iniciada pela introdução de $100 \mu\text{L}$ de epinefrina $25,2 \text{ mM}$ em HCl $0,1 \text{ N}$. As amostras foram incubadas a 28°C , sob agitação, por 5 min. A leitura da absorvância foi feita a 480 nm , durante 5 minutos (Boveris et al., 2002; Misra e Fridoovich, 1971). A produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi avaliada pela determinação do adenocromo

acumulado, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Boveris et al., 2002).

Para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), amostras de 200 mg de tecido radicular e de folhas foram homogeneizadas em meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, e centrifugadas a 10.000 xg, por 15 minutos, a 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Aliquotas de 50 μL do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo FeNH_4SO_4 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorvância determinada a 560 nm. As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 .

2.2.3 Integridade de membrana

A integridade das membranas celulares foi avaliada através da análise do extravasamento de eletrólitos, realizada de acordo com Lima et al. (2002). A condutividade foi medida com o auxílio de um condutivímetro (DM31, Digimed, Santo Amaro, Brasil), e expressa como a porcentagem da condutividade total.

2.2.4 Sistema antioxidante enzimático

Para avaliar a atividade de enzimas do metabolismo antioxidante, 0,3 g de amostras da raiz e das folhas foram homogeneizadas, separadamente, em meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (Peixoto et al., 1999). O extrato enzimático

bruto foi utilizado para determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD), peroxidases (POX), peroxidases do ascorbato (APX) e catalases (CAT).

A atividade da SOD (SOD, EC 1.15.1.1) foi medida nas folhas e raízes de *P. stratiotes* através do método proposto por Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do p-nitro tetrazólio (NBT) (Beauchamp e Fridovich, 1971).

A atividade da POX (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 mmol⁻¹ L cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μmol de purpurogalina min⁻¹ g⁻¹ MF.

A atividade da APX (APX, EC 1.11.1.11) foi medida pelo método de Nakano e Asada (1981), estimando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. A atividade foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mmol⁻¹ L cm⁻¹ e expressa em μmoles de ácido ascórbico min⁻¹ g⁻¹ MF.

A atividade da CAT (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada conforme descrito por Havir e McHale (1987), estimando-se o consumo de H₂O₂ no primeiro minuto de reação, a 240 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 mol⁻¹ L cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e expressa em μmoles de H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ MF.

2.2.5 Sistema antioxidante não-enzimático

Para determinação dos teores de ascorbato reduzido e ascorbato total, 0,3 g de amostras de folhas e de raízes foram homogeneizadas em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6% e centrifugadas por 5 min, a 4°C, para obtenção do extrato bruto. A seguir, 500 μL do extrato

enzimático bruto foram adicionados a dois meios de extração para determinação do ascorbato total e do ascorbato reduzido, sendo incubados a 42°C, por 15 min, segundo proposto por Kampfenkel et al. (1995). A leitura da absorvância foi feita a 525 nm. A concentração de desidroascorbato foi calculada pela diferença entre ascorbato total e ascorbato reduzido. A concentração de ascorbato foi determinada por meio de curva de calibração.

2.3 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo os dados submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. 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 Cinética de absorção de arsênio

O influxo de As apresentou aumento linear com o aumento da concentração de As na solução (Fig. 1). A cinética de absorção de As foi adequadamente descrita pela equação de Michaelis-Menten, com valores de K_m e V_{max} para componentes saturáveis de 2,94 μM e 94,34 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$, respectivamente.

3.2 Teor de arsênio absorvido e fator de translocação

As plantas acumularam grandes quantidades de As, sendo que a maior parte do poluente ficou retido nas raízes (Fig. 2). A capacidade das plantas em translocar poluentes das raízes para

as folhas é medida pelo cálculo do fator de translocação, sendo que valores menores que 1 indicam forte retenção na raiz. Em *P. stratiotes* o fator de translocação do As foi igual a 0,16 (tabela 1), não tendo sido observadas alterações significativas na taxa de acúmulo de As nem no fator de translocação quando o metalóide foi fornecido isoladamente ou em combinação com o SNP.

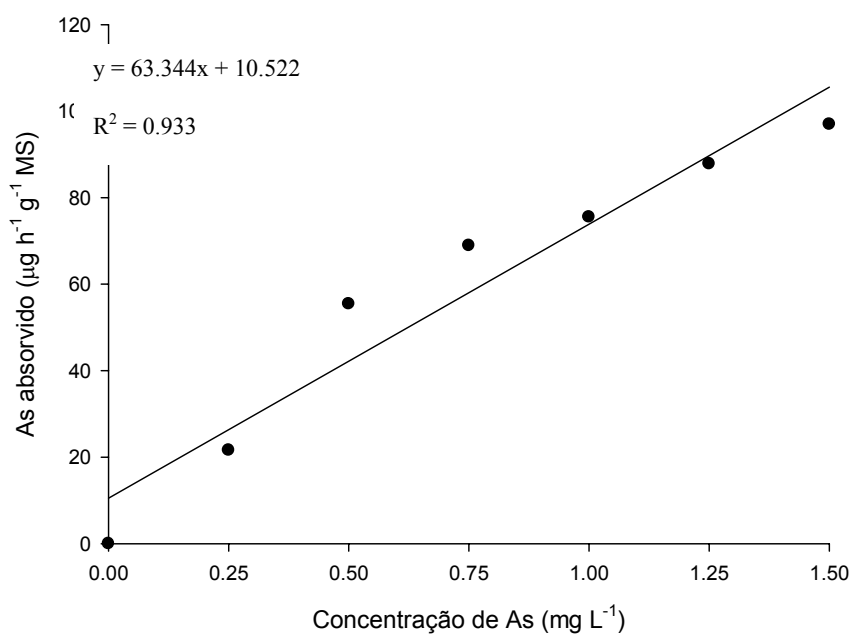


Fig. 1. Taxa de absorção de As em *P. stratiotes* em função da concentração de As em solução.

3.3 Concentração de espécies reativas de oxigênio

A concentração de O_2^- nas folhas e nas raízes de *P. stratiotes* aumentou significativamente em resposta à exposição ao As, indicando que a planta estaria sofrendo estresse oxidativo. A presença de SNP, no entanto, manteve as concentrações de O_2^- em níveis semelhantes aqueles encontrados no controle (Fig. 3A). De fato, no tratamento contendo

As+SNP, a concentração do radical nas folhas e nas raízes decresceu, respectivamente, 31,8 e 10,7%, em relação às concentrações observadas nas plantas expostas apenas ao As.

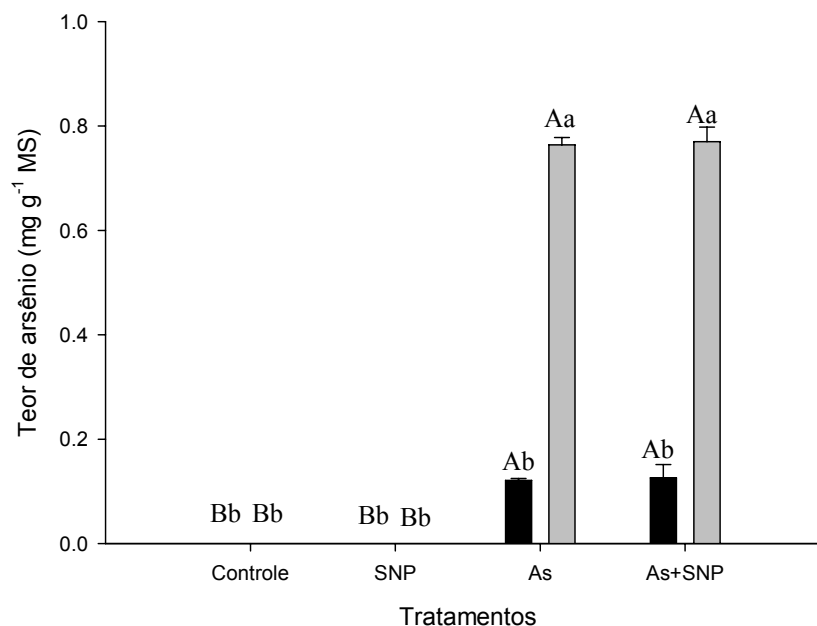


Fig. 2. Acúmulo de As em *Pistia stratiotes* nas folhas (■) e raízes (□). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo órgão, e pela mesma letra minúscula, entre órgãos para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Tabela 1. Fator de translocação em plantas de *P. stratiotes* submetidas ao arsênio de forma isolada ou em combinação com SNP.

<i>Tratamentos</i>	<i>Fator de translocação</i>
As	0,160 a
As+SNP	0,148 a

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

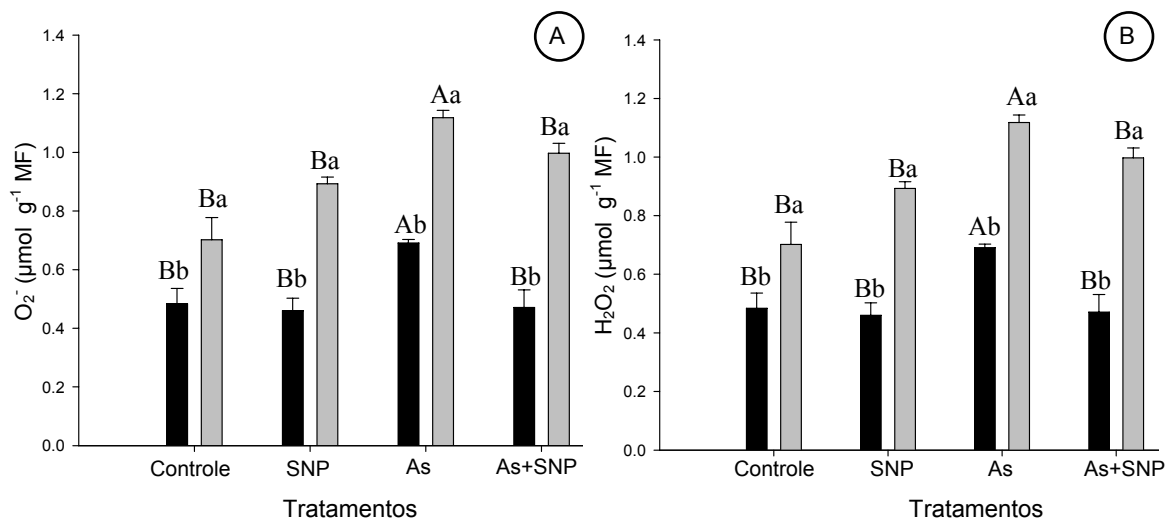


Fig. 3. Alterações na concentração de ânion superóxido (A) e peróxido de hidrogênio (B) em folhas (■) e raízes (■) de *Pistia stratiotes* expostas ao As e ao SNP. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo órgão, e pela mesma letra minúscula, entre órgãos para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Paralelamente à geração de O₂⁻, a concentração de H₂O₂ também aumentou nas raízes e nas folhas em resposta à exposição ao As (Fig. 3B). A presença de SNP teve um efeito atenuante sobre o estresse oxidativo, diminuindo as concentrações de H₂O₂ nas folhas e nas raízes à teores normais.

3.4 Efeito do arsênio e do SNP na integridade de membrana

A geração de ROS no tratamento com As resultou em aumentos significativos no extravasamento de eletrólitos nas folhas e nas raízes de *P. stratiotes*, indicando danos oxidativos às membranas celulares (Fig. 4). Não houve diferença significativa entre os danos gerados na raiz e aqueles gerados nas folhas, apesar do maior acúmulo do poluente e maior produção de ROS na raiz. O efeito tóxico do poluente sobre as membranas foi atenuado pela presença de SNP, onde os valores obtidos foram estatisticamente iguais aos observados no controle,

demonstrando um efeito protetor do SNP contra a peroxidação lipídica induzida pelo As, provavelmente pela diminuição na concentração de ROS.

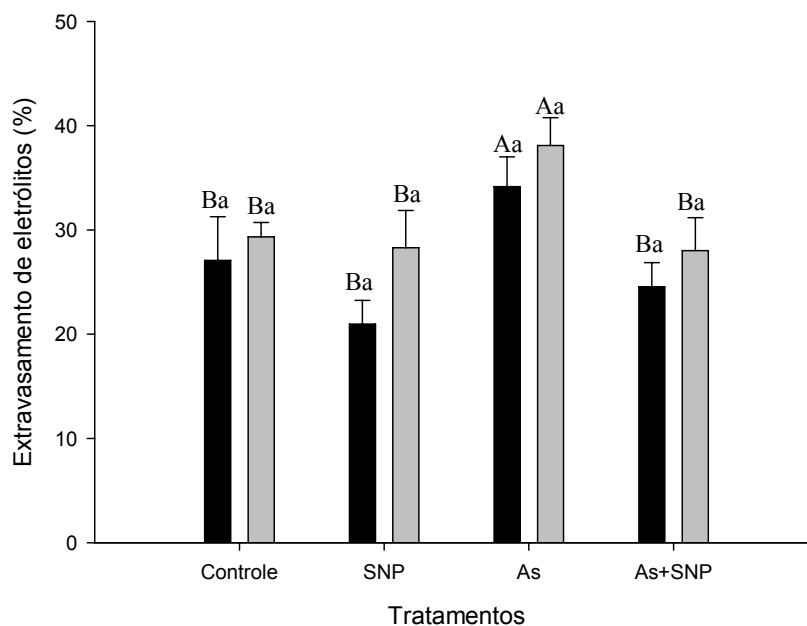


Fig. 4. Efeito do As e do SNP sobre a integridade de membranas celulares em folhas (■) e raízes (▒) de *Pistia stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo órgão, e pela mesma letra minúscula, entre órgãos para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.5 Efeito do arsênio e do SNP sobre o sistema antioxidante enzimático

A atividade das enzimas SOD, POX e CAT aumentou significativamente nas folhas devido à exposição ao As, sendo que nas raízes observou-se aumento apenas na atividade da SOD. No tratamento com As+SNP, por sua vez, as enzimas apresentaram comportamentos diferentes entre si, indicando diferentes formas de atuação do SNP. A atividade da SOD, por exemplo, embora tenha aumentado substancialmente na presença de As, não diferiu estatisticamente do controle quando exposta ao As em combinação com SNP (Fig. 5A). De fato, a atividade da SOD no tratamento As+SNP apresentou queda de 34,45 e 35,55% em relação ao

tratamento com As, nas folhas e nas raízes, respectivamente. Tal resultado indica que o SNP estaria agindo diretamente como antioxidante, eliminando o substrato da enzima, o ânion superóxido.

Embora a exposição ao As tenha aumentado a atividade da POX apenas nas folhas de *P. stratiotes* (Fig. 5B), a presença de SNP, suprido em conjunto com As, desencadeou aumentos na atividade desta enzima tanto nas raízes quanto nas folhas. É provável, portanto, que o SNP atue como sinalizador para aumentos na atividade da POX em *P. stratiotes*.

A atividade da APX aumentou apenas no tratamento contendo As em combinação com o SNP, tanto nas raízes quanto nas folhas (Fig. 5C). Nos demais tratamentos a atividade enzimática permaneceu estatisticamente igual àquela observada no controle.

A CAT, por sua vez, não só foi a enzima mais ativa na parte aérea, como também foi a que apresentou maiores incrementos na atividade, tanto na presença de As quanto na presença de As+SNP (Fig. 5D). De fato, a presença de As em combinação com SNP aumentou a atividade enzimática da CAT em 675,12% em relação ao controle e em 234,78% em relação ao tratamento com As. Nas raízes, no entanto, não se detectou atividade da CAT em nenhum dos tratamentos analisados.

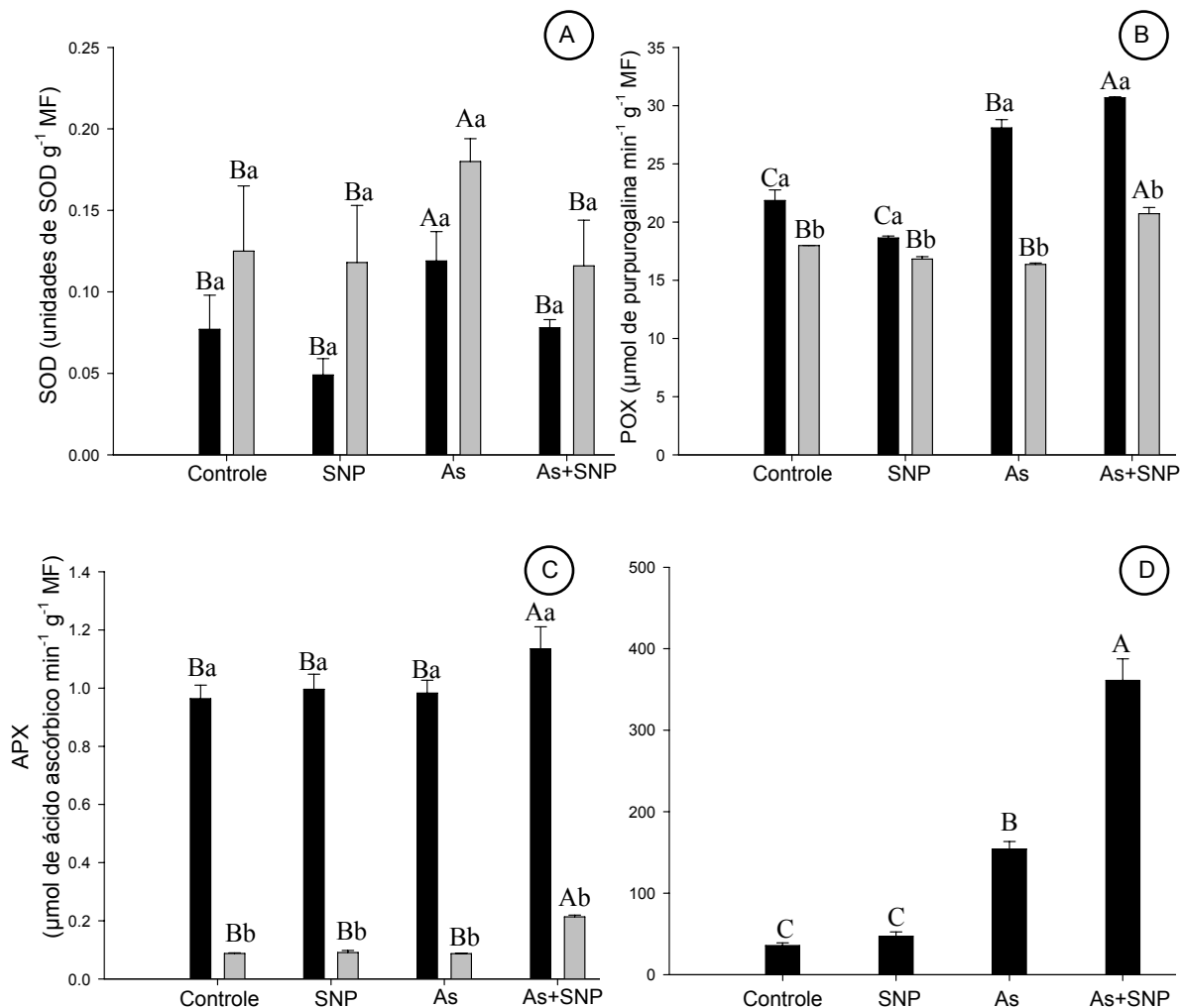


Fig. 5. Efeito do As e do SNP sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidante em folhas (■) e raízes (■) de *Pistia stratiotes*. (A) SOD, (B) POX, (C) APX e (D) CAT. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo órgão, e pela mesma letra minúscula, entre órgãos para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.6 Efeito do arsênio e do SNP na concentração de ascorbato e desidroascorbato

A concentração de ascorbato reduzido nas raízes e nas folhas apresentou queda significativa no tratamento As+SNP (Fig. 6A), demonstrando relação inversa com a atividade da

enzima APX. Tal resultado, provavelmente, é consequência da maior atividade enzimática da APX neste tratamento, a qual utiliza o ascorbato como substrato para eliminação de peróxido de hidrogênio, produzindo água e desidroascorbato. O teor de desidroascorbato, tal qual observado para o ascorbato, também apresentou queda em relação ao controle nas folhas e nas raízes no tratamento As+SNP (Fig. 6B). Este resultado pode ser um indicativo de que o ciclo ascorbato-glutationa, através do qual o desidroascorbato é convertido em ascorbato reduzido, estaria ativo. No tratamento contendo apenas As foi possível observar nas folhas aumentos na concentração de ascorbato reduzido, não tendo sido observadas alterações correspondentes no teor de desidroascorbato nem na atividade da APX, indicando que, nesse caso, o ascorbato estaria agindo independentemente do ciclo ascorbato-glutationa. Nos demais tratamentos não se observaram alterações nos teores de ascorbato ou de desidroascorbato.

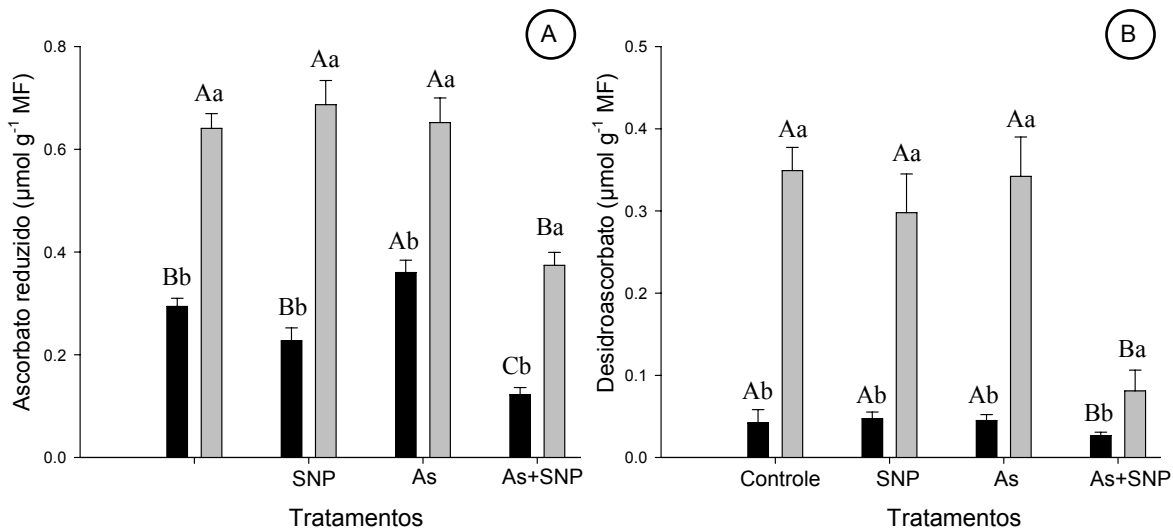


Fig. 6. Efeito do As e do SNP sobre a concentração de antioxidantes não enzimáticos em folhas (■) e raízes (■) de *Pistia stratiotes*. (A) Ascorbato reduzido ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) e (B) Desidroascorbato ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo órgão, e pela mesma letra minúscula, entre órgão para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

4. Discussão

Características da cinética de absorção de determinado poluente constituem importantes critérios para a seleção de plantas que possam ser usadas na fitorremediação. Baseado nesses critérios, *Pistia stratiotes* revelou-se como potencial fitorremediadora de As, uma vez que o K_m observado foi bem menor do que aqueles registrados para outras espécies vegetais (Wang et al., 2002; Zhang et. al, 2008), indicando um eficiente sistema de absorção de As (Zhang et. al, 2008). Na maioria das plantas esta absorção ocorre através de transportadores de alta afinidade, o que aparentemente também ocorre em *P. stratiotes*, uma vez que os parâmetros V_{max} e K_m apresentaram valores típicos de cinética de absorção de alta afinidade (Abedin et al., 2002).

Além dos parâmetros de cinética de absorção, elevado fator de translocação é outra importante característica requerida em plantas utilizadas na fitorremediação (Mishra et al., 2007). Os valores deste fator, no entanto, variam muito de acordo com a planta, o poluente e a disponibilidade do poluente para a planta. A translocação do As absorvido para as folhas de *P. stratiotes* não ocorreu de forma intensa, fazendo com que o fator de translocação fosse menor do que aquele observado em plantas expostas a outros poluentes, como o mercúrio (Mishra et al., 2009). A maior retenção de As nas raízes faz parte dos mecanismos de defesa da planta, sendo que, em altas concentrações de As, ocorre inclusive a queda das raízes. Além disso, as raízes de *P. stratiotes* são, aparentemente, mais tolerantes à toxicidade do As que as folhas, já que não apresentaram alterações significativas na peroxidação de lipídeos em relação à parte aérea, apesar de terem acumulado maiores quantidades de As. A maior retenção do metalóide nas raízes pode estar associada ao desenvolvimento de mecanismos capazes de complexar o As na raiz, como moléculas ricas em grupamentos -SH, impedindo a translocação do poluente para as folhas (Singh e Agrawal, 2007).

A exposição de *P. stratiotes* ao As desencadeou a ocorrência de estresse oxidativo, o que foi evidenciado pelo aumento na concentração de ROS e na peroxidação lipídica. Nas plantas, a geração de ROS desencadeada pelo As geralmente é consequência da conversão do arsenato em arsenito, reação que faz parte do mecanismo de tolerância das plantas a este poluente (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). O As pode ainda reduzir diretamente o oxigênio molecular ou alterar proteínas das mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, levando à desequilíbrios no potencial redox celular e à formação de ROS (Zhang and Quiu, 2007). Este efeito tóxico do As, no entanto, foi atenuado no presente estudo pela adição de NO, suprido na forma de SNP, o qual agiu tanto como antioxidante direto, eliminando o O_2^- , quanto como molécula sinalizadora, aumentando a resposta dos mecanismos antioxidantes.

Em alguns tipos de estresses abióticos o SNP diminui a concentração de O_2^- através da sinalização para aumentos na atividade da SOD (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007). Em *P. stratiotes*, no entanto, a redução na concentração de O_2^- não ocorreu mediante este modo de ação, uma vez que a atividade enzimática da SOD não sofreu alterações significativas na presença de As e SNP. É provável, portanto, que o SNP tenha agido diretamente como um antioxidante, eliminando o O_2^- (Singh et al., 2009; Xiong et al., 2010). O SNP agiu ainda como agente indutor das atividades das enzimas CAT, POX e APX, o que resultou em significativas reduções na concentração de H_2O_2 . Desta forma o SNP, como agente de liberação de NO, participa ativamente na sinalização para aumentos na atividade de enzimas do sistema antioxidante (Singh et al., 2008; Singh et al., 2009).

Os resultados obtidos para a concentração de ascorbato reduzido, desidroascorbato e para a atividade da APX indicam que, possivelmente, o NO está envolvido na ativação do ciclo ascorbato-glutationa, o qual participa da eliminação de ROS, regula a homeostase redox

intracelular e regenera o ascorbato reduzido, permitindo que a APX continue a atuar (Xiong et al., 2010). Já foi observado que, em células de mamíferos, o NO suprido na forma de SNP pode contribuir para a regeneração do ascorbato reduzido a partir de sua forma oxidada, o desidroascorbato (Spagnuolo et al., 2006).

Aparentemente o ciclo ascorbato-glutationa não é um mecanismo que esteja naturalmente envolvido na defesa contra o estresse oxidativo induzido por As em *P. stratiotes*, sendo ativado apenas na presença de NO. É provável, portanto, que o aumento na concentração de ascorbato reduzido nas folhas, na presença de As, esteja relacionado com a eliminação direta de ROS ou com a regeneração do α -tocoferol, o qual está envolvido na eliminação de radicais peróxido-lipídicos e oxigênio singlete (Smirnoff, 2000).

Diante dos presentes dados é possível concluir que o NO, suprido na forma de SNP, foi capaz de atenuar os danos causados pelo As. Os efeitos benéficos do NO para as plantas de *P. stratiotes* estão relacionados tanto com a eliminação direta de ROS quanto com a sinalização para aumento nas atividades de antioxidantes enzimáticos e ativação do ciclo ascorbato-glutationa.

Referências

Abedin, M.J., Feldmann, J., Meharg, A.A., 2002. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiol.* 128, 1120-1128.

- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R., 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109, 1247-1257.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J., 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* 172, 876-887.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 267-287.
- Boveris, A., Alvarez, S., Bustamante, J., Valdez, L., 2002. Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Method. Enzymol.* 105, 280-287.
- Chance, B., Maehley, A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764-775.
- Clark, R.B., 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J Agric. Food Chem.* 23, 458-460.
- Gay, C., Gebicki, J.M., 2000. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Anal. Biochem.* 284, 217-220.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314.
- Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84, 450-455.
- Kampfenkel, K., Montagu, M.V., Inzé, D., 1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal. Biochem.* 225, 165-167.

- Kuo, M.C., Kao, C.H., 2003. Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biol. Plantarum* 46, 149-152.
- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D., Delledonne, M., 2009. Nitric oxide signaling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 451-458.
- Lima, A.L.S., DaMatta, F.M., Pinheiro, H.A., Totola, M.R., Loureiro, M.E., 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.* 47, 239-247.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-666.
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T.O., 2002. Arsenic around the world: a review. *Talanta* 58, 201-235.
- Marin, A.R., Pezeshki, S.R., Masschelen, P.H., Choi, H.S., 1993. Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. *J. Plant Nutr.* 16, 1532-4807.
- Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol.* 154, 29-43.
- Mishra, V.K., Tripathi, B.D., Kim, K-H., 2009. Removal and accumulation of mercury by aquatic macrophytes from an open cast coal mine effluent. *J. Hazard. Mater.* 172, 749-754.
- Mishra, V.K., Upadhyaya, A.R., Pandey, S.K., Tripathi, B.D., 2007. Heavy metal pollution induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic ecosystem and its management through naturally occurring aquatic macrophytes. *Bioresour. Technol.* 99, 930-936.

Misra, H.P., Fridovich, I., 1971. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J. Biol. Chem.* 246, 6886-6890.

Mohammadi, M., Karr, A.L., 2001. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *J. Plant Physiol.* 158, 1023-1029.

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

Peixoto, P.H.P, Cambraia, J., Sant'ana, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A., 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11, 137-143.

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

Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, G., Arora, K., Kohli, R.K., 2008. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environ. Exp. Bot.* 63, 158-167.

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

Singh, N., Raj, A., Khare, P.B., Tripathi, R.D., Jamil, S., 2010. Arsenic accumulation pattern in 12 Indian ferns and assessing the potential of *Adiantum capillus-veneris*, in comparison to *Pteris vittata*, as arsenic hyperaccumulator. *Bioresour. Technol.* 1001, 8960-8968.

- Singh, R.P., Agrawal, M., 2007. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. *Chemosphere* 67, 2229-2240.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 229-235.
- Spagnuolo, M.S., Carlucci, A., Cigliano, L., Abrescia, P., 2006. Nitric oxide stimulates the erythrocyte for ascorbate recycling. *Nitric Oxide* 14, 272-277.
- Tylova-Munzarova, E., Lorenzen, B., Brix, H., Votrubova, O., 2005. The effects of NH_4^+ and NO_3^- on growth, resource allocation and nitrogen uptake kinetics of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *Aquat. Bot.* 81, 326-342.
- Wang, J., Zhao, F., Meharg, A.A., Raab, A., Feldmann, J., McGrath, P., 2002. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol.* 130, 1552-1561.
- Wojtazek, P., 2000. Nitric oxide in plants: To No or not to NO. *Phytochemistry* 54, 1-4.
- Xian, Q., Hu, L., Chen, H., Chang, Z., Zou, H., 2010. Removal of nutrients and veterinary antibiotics from swine wastewater by a constructed macrophyte floating bed system. *J Environ Manage* 91, 2657-2661.
- Xiong, J., Fu, G., Tao, L., Zhu, C., 2010. Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 497, 13-20.
- Xue, P., Li, G., Liu, W., Yah, C., 2008. Copper uptake and translocation in a submerged aquatic plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Chemosphere* 81, 1098-1103.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 339-353.

Zabludowska, E., Kowalska, J., Jedynek, L., Wojas, S., Sklodowska, A., Antosiewicz, D.M., 2009. Search for a plant phytoremediation – what can we learn from field and hydroponic studies? *Chemosphere* 77, 301-107.

Zang, X., Lin, A., Zhao, F., Xu, G., Duan, G., Zhu, Y., 2008. Arsenic accumulation by the aquatic fern *Azolla*: Comparison of arsenate uptake, speciation and efflux by *A. caroliniana* and *A. filiculoides*. *Environ. Pollut.* 156, 1149-1155.

Zhang, X., Zhao, F., Huang, Q., Williams, P.N., Sun, G., Zhu, X., 2009. Arsenic uptake and speciation in the rootless duckweed *Wolffia globosa*. *New Phytol.* 182, 421-428.

Zhang, Z., Qiu, B., 2007. Reactive oxygen species metabolism during the cadmium hyperaccumulation of a new hyperaccumulator *Sedum alfredii* (Crassulaceae). *J. Environ. Sci.* 19, 1311-1317.

Artigo II

Óxido nítrico e seu efeito antioxidante: implicações sobre o processo fotossintético em condições de estresse desencadeado por arsênio

RESUMO

O efeito do óxido nítrico na atenuação do estresse desencadeado pelo arsênio (As) foi avaliado em *Pistia stratiotes*, sendo o óxido nítrico suprido na forma de nitroprussiato sódico (SNP). As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, ½ da força iônica, foram expostas a quatro tratamentos: controle (apenas solução nutritiva); SNP (0,1 mg L⁻¹); As (1,5 mg L⁻¹); As + SNP (1,5 e 0,1 mg L⁻¹, respectivamente). As plantas permaneceram nessas condições por sete dias, para análises de crescimento e absorção de As e nutrientes minerais, e por 24 horas, para análises de alterações metabólicas. *P. stratiotes* acumulou grandes quantidades de As, o qual ficou retido principalmente na raiz, sendo que a presença de SNP não alterou estes parâmetros. O índice de tolerância da planta ao As, por sua vez, foi maior na presença de SNP. A exposição ao As não alterou os teores de cálcio, mas diminuiu os teores de ferro, magnésio, manganês e fósforo. Destes nutrientes, apenas os teores de fósforo não retornaram a valores semelhantes ao controle quando o As foi suprido em combinação com SNP. Embora o As tenha aumentado as concentrações de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio, o SNP foi capaz de reverter este efeito tóxico, provavelmente através dos aumentos observados na capacidade antioxidante total, os quais foram maiores no tratamento contendo As+SNP. O As afetou quase os parâmetros fotossintéticos analisados. Os teores de pigmentos cloroplásticos diminuíram na presença de As, com exceção dos carotenóides, que apresentaram aumentos em suas concentrações. A presença de SNP restaurou os teores dos pigmentos à níveis normais. A eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) e o rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}) também foram afetados negativamente pelo As, enquanto coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) apresentou incrementos significativos. A assimilação líquida de carbono (A) decresceu significativamente na presença de As, enquanto g_s não se alterou. Estes dados, associados ao aumento na razão Ci/Ca, indicam que o As inibiu a fixação de CO₂ principalmente por limitações bioquímicas, e não por limitações estomáticas. A razão Φ_{FSII}/Φ_{CO_2} foi maior nas plantas

expostas ao As. Todas as alterações observadas nos parâmetros fotossintéticos, no entanto, foram revertidas pela presença de SNP, sendo que no tratamento contendo As+SNP os valores destes parâmetros foram estatisticamente iguais ao controle. Desta forma, a presença de SNP apresentou efeito protetor sobre o processo fotossintético em *P. stratiotes*, sendo capaz de atenuar os danos desencadeados pelo As.

Palavras-chave: estresse oxidativo, capacidade antioxidante, toxicidade, *Pistia stratiotes*, fitorremediação.

ABSTRACT

The nitric oxide effect on attenuating the stress caused by arsenic (As) was evaluated in *Pistia stratiotes*, being the nitric oxide supplied in the form of sodium nitroprusiate (SNP). The plants were cultivated in nutrient solution, pH 6.5, ½ ion force, and exposed to four treatments: control (nutrient solution) SNP (0.1 mg L⁻¹); As (1.5 mg L⁻¹); As + SNP (1.5 and 0.1 mg L⁻¹, respectively). The plants remained in this condition for seven days to the analysis of growth and As and mineral nutrients uptake, for 24 hours, to the analysis of metabolic changes. *P. stratiotes* accumulated significant amounts of As, which was retained, mainly, in the roots, and SNP presence did not alter these parameters. The plants tolerance index to As, in turn, was higher in the presence of SNP. The As exposition did not alter calcium concentration but decreased iron, magnesium, manganese and phosphorus concentration. Of these nutrients, only phosphorus concentration did not show similar values than control when As was supplied in combination to SNP. Although As has increased superoxide anion and hydrogen peroxide concentrations, the SNP was able to reverse these toxic effects, probably through the increment observed in the total antioxidant capacity, which were higher in the treatment containing As+SNP than in the treatment containing only As. The As generated changes in all the analyzed photosynthetic parameters. The chloroplastic pigments concentration decreased in As presence, except carotenoids, which showed an increment in their concentrations. The SNP presence restored pigments concentration to the normal levels and increased. The maximum photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m), and the quantum yield of electron transport (Φ_{FSII}) were also negatively affected by As, while the non-photochemical quenching (NPQ) presented significant increment. Carbon assimilation (A) decreased significantly in As presence whereas g_s

did not alter. These results associated to the increase in C_i/C_a rate, indicate that As inhibited CO_2 fixation, mainly by biochemical limitations. The Φ_{FSII}/Φ_{CO_2} rate was higher in plants exposed to As. All the changes caused by As in the photosynthetic parameters were reversed by SNP presence, while in the treatment containing As+SNP these parameters values were statistically identical to control. Thus, the presence of SNP showed a protective effect on the photosynthetic process in *P. stratiotes*, being able to mitigate the damage triggered by As.

Keywords: oxidative stress, antioxidant capacity, toxicity, *Pistia stratiotes*, phytoremediation.

1. Introdução

A contaminação ambiental com arsênio (As) representa um dos principais problemas de saúde pública do mundo. Embora este elemento ocorra naturalmente na crosta terrestre, sendo encontrado em mais de 245 minerais, atividades humanas como mineração, queima de combustíveis fósseis e aplicação de pesticidas são as principais causas das concentrações tóxicas de As na água e no solo [1]. Apesar de não ser um nutriente essencial, o As pode ser absorvido e acumulado por plantas, o que possibilita a utilização destes organismos na remoção do poluente do ambiente, através do processo denominado fitorremediação [2].

Plantas utilizadas em processos de fitorremediação demonstram grande variabilidade em suas respostas ao As, sendo que algumas espécies são capazes de acumular altos níveis do metalóide em seus tecidos [3,4]. Como exemplo de plantas com alto potencial para a fitorremediação cita-se *Pistia stratiotes* L. (Araceae), uma macrófita aquática capaz de absorver grandes quantidades de metais tóxicos, além de apresentar alta produção de biomassa [5], ambas características fundamentais para utilização de plantas na extração de poluentes [6].

Respostas típicas de plantas ao As incluem aumentos na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), inibição da fotossíntese e do crescimento [7]. Em relação ao processo

fotossintético, os efeitos do As podem variar de acordo com a espécie estudada e com a concentração de As às quais as plantas são expostas, sendo que o metalóide pode afetar tanto a etapa fotoquímica quanto a etapa bioquímica do processo [8]. O As pode ainda afetar a fotossíntese de forma indireta, interferindo na absorção de nutrientes que são essenciais para o processo fotossintético, como manganês, ferro e magnésio [9].

A compreensão de como ocorrem alterações fisiológicas desencadeadas pelo As é de fundamental importância para a aplicação do processo de fitorremediação. Neste contexto o óxido nítrico (NO), molécula gasosa e altamente reativa, tem sido o foco de pesquisas que investigam os efeitos tóxicos dos poluentes e a tolerância em plantas [10,11]. O NO é uma molécula pequena, classificada por alguns autores como fitohormônio [12], e que age como sinalizadora em vários processos bioquímicos e fisiológicos nas plantas, incluindo a fotossíntese, estando diretamente envolvida na cadeia transportadora de elétrons [13]. Esta molécula também participa da resposta de plantas a estresses abióticos, já tendo sido demonstrado que o suprimento exógeno de NO pode atenuar o estresse causado por poluentes, principalmente pelo aumento na concentração de antioxidantes capazes de eliminar ROS [12]. Embora a fotossíntese seja um processo central no metabolismo vegetal, trabalhos enfocando este processo na presença de As ainda são escassos, bem como trabalhos que abordem a influência do NO sobre o metabolismo fotossintético. Tendo como base estes fatos, o presente trabalho objetivou analisar a influência do As e o efeito atenuante do óxido nítrico sobre parâmetros fotossintéticos e de crescimento em *P. stratiotes*.

2. Material e Métodos

Espécimes de *Pistia stratiotes* L. (Araceae) foram coletados no horto florestal da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil) e transferidas para solução nutritiva de Clark [14], $\frac{1}{2}$ da força iônica, pH 6,5, sendo mantidas em sala de crescimento de plantas, com luz e temperatura controladas, e fotoperíodo de 16 horas. As plantas permaneceram nestas condições por três dias para aclimatação.

As plantas aclimatadas foram submetidas a quatro tratamentos: controle (apenas solução nutritiva); SNP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$); As ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$); As + SNP ($1,5$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). SNP (nitroprussiato de sódio) é uma substância comumente utilizada em estudos bioquímicos como doadora de NO. As plantas permaneceram nestas condições por sete dias, para análises de absorção de As, efeitos sobre o crescimento vegetal e nutrição mineral, e 24 horas, para análise de alterações metabólicas.

2.1 Absorção de As, efeito sobre o crescimento vegetal e nutrição mineral

2.1.1 Acúmulo de arsênio e seu efeito sobre o crescimento vegetal

Após o período de exposição aos tratamentos, folhas e raízes de *P. stratiotes* foram separadas, lavadas em água desionizada e mantidas em estufa convencional a 80°C , até a obtenção do peso seco constante. O material vegetal seco foi triturado e digerido em ácido nitroperclórico [15], sendo as concentrações de As determinadas através de espectrofotômetro de emissão em plasma (Shimadzu, model AA-6701FG).

O fator de bioacumulação de As foi calculado a partir de valores das concentrações de As nos órgãos vegetais (folha e raiz) e na solução nutritiva. Os cálculos foram realizados segundo proposto por Huang et al. [16]. A taxa de crescimento relativo foi calculada usando-se a equação proposta por Hunt [17], utilizando massa seca e fresca das folhas e das raízes.

2.1.2 Índice de tolerância ao arsênio

A tolerância de *P. stratiotes* ao As foi estimada através do cálculo do índice de tolerância, segundo proposto por Wilkins [18]. No cálculo considerou-se a taxa de crescimento da planta na solução sem As e com As, de forma isolada e em combinação com SNP.

2.1.3 Determinação da concentração de nutrientes minerais

Para determinar a influência do As e do SNP sobre a concentração de nutrientes minerais, folhas de *P. stratiotes* foram separadas das raízes, lavadas em água desionizada e mantidas em estufa convencional a 80°C, até a obtenção do peso seco constante. O material vegetal seco foi triturado e digerido em ácido nitro-perclórico [16], sendo as concentrações de ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), cálcio (Ca) e fósforo (P) determinadas através de espectrofotômetro de emissão em plasma (Shimadzu, model AA-6701FG).

2.2 Avaliação das alterações metabólicas

2.2.1 Concentração de espécies reativas de oxigênio

Para determinação da concentração de ânion superóxido (O_2^-), amostras de 50 mg de folhas foram incubadas em meio de extração constituído do sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100 μ M, NADH 20 μ M e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 [19]. A reação foi iniciada pela introdução de 100 μ L de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 min. A leitura da absorvância foi feita a 480 nm, durante 5 minutos. A produção de O_2^- foi avaliada pela determinação do adenocromo acumulado, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ [20].

A determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi feita a partir de amostras de 200 mg de folhas, as quais foram homogeneizadas em meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1mM, e centrifugadas a 10.000 xg, por 15 minutos, a 4 °C [21]. Aliquotas de 50 μ L do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo $FeNH_4SO_4$ 100 μ M, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μ M e sorbitol 100 mM [22]. As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorvância determinada a 560 nm. As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 .

2.2.2 Capacidade antioxidante total

A fim de se avaliar a capacidade antioxidante das folhas de *P. stratiotes*, amostras de aproximadamente 0,3 g foram homogeneizadas com 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, contendo EDTA 0,1mM e centrifugadas por 5 min., a 12000 g. Aliquotas de 50 μ L foram retiradas do sobrenadante e adicionadas a 1,5 mL de meio de reação composto por 2,4,6-tripiridil triazina 10mM, cloreto férrico 20 mM e tampão acetato de sódio 300 mM, pH 3,6 . Após cinco minutos, a absorvância foi lida a 593 nm. A capacidade antioxidante total foi expressa em μ M g^{-1} MF [23].

2.2.3 Concentração de pigmentos cloroplastídicos

Para determinação da concentração dos pigmentos cloroplastídicos clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenóides, dois discos foliares de 0,5 cm de diâmetro foram coletados, pesados e incubados em 5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), saturado com carbonato de cálcio, por 24 horas [24]. Após este período a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro

nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm, para determinação da clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides, respectivamente. Os teores dos pigmentos foram calculados segundo as equações propostas por Arnon [25]. Os resultados expressos em mg g^{-1} MF.

2.2.4 Parâmetros de fluorescência

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram medidos na folha mais jovem totalmente expandida, usando-se fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). A fluorescência inicial (F_0), a fluorescência máxima (F_m), a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), o rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}) e o coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) foram medidos entre 08:00 e 09:00 horas, sob irradiância de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo estimados como descrito em DaMatta et al. [26] e Lima et al. [27].

2.2.5 Trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (g_s) e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) foram medidas entre 08:00 e 09:00 horas, em sistema aberto, sob luz saturante ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração ambiente de CO_2 , com um analisador de gases a infravermelho (LCpro+, Analytical Development Company, Hoddesdon, Reino Unido). As medidas foram realizadas na folha mais jovem totalmente expandida. A razão $\Phi_{\text{FSII}}/ \Phi_{\text{CO}_2}$ foi calculada segundo proposto por Maxwell e Johnson [28].

2.3 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo os resultados submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo

teste de Tukey, a 5% de probabilidade. 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 Acúmulo de arsênio e seu efeito sobre o crescimento vegetal

As plantas expostas ao As foram capazes de absorver e acumular quantidades significativas do poluente em seus tecidos, sendo que este acúmulo não foi afetado pela presença de SNP (Fig. 1). O As absorvido foi acumulado principalmente nas raízes, onde o fator de bioacumulação, que é utilizado para avaliar a habilidade da planta em acumular determinado poluente, foi cerca de 15 vezes maior do que nas folhas (Tabela 1). Este comportamento é típico de plantas aquáticas, sendo que a retenção de As nas raízes constitui um dos mecanismos de defesa destas plantas.

O acúmulo de As desencadeou quedas drásticas no crescimento vegetal (Fig. 2), sendo que no tratamento contendo apenas As a taxa de crescimento relativo foi 62,7% menor do que a taxa de crescimento das plantas no controle. Embora a adição de SNP tenha promovido incrementos no crescimento em relação às plantas expostas apenas ao As, esses valores foram significativamente menores que o controle, indicando que a presença de SNP foi capaz de atenuar, mas não de eliminar todos os efeitos tóxicos do As. De fato, no tratamento contendo As+SNP a taxa de crescimento relativo foi 42,26% menor do que a observada no controle.

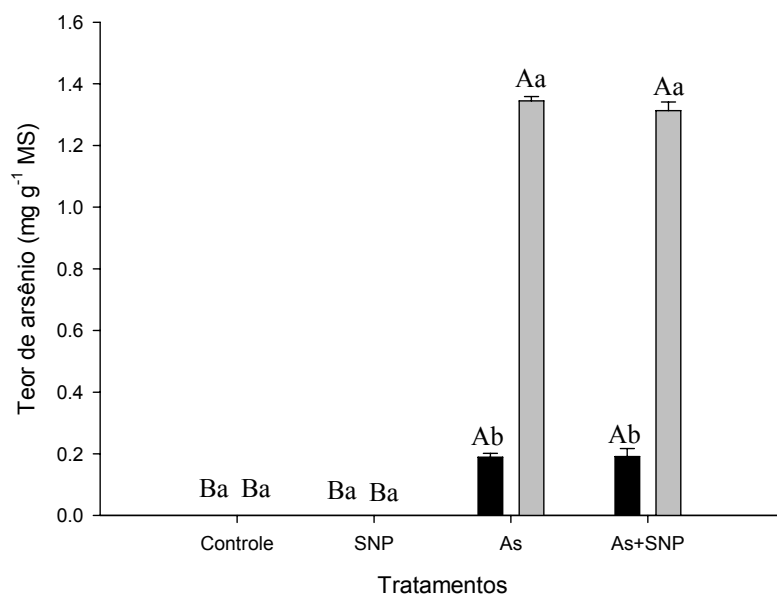


Figura 1. Teor de As absorvido nas folhas (■) e raízes (■) de *Pistia stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo órgão, e pela mesma letra minúscula, entre órgãos para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

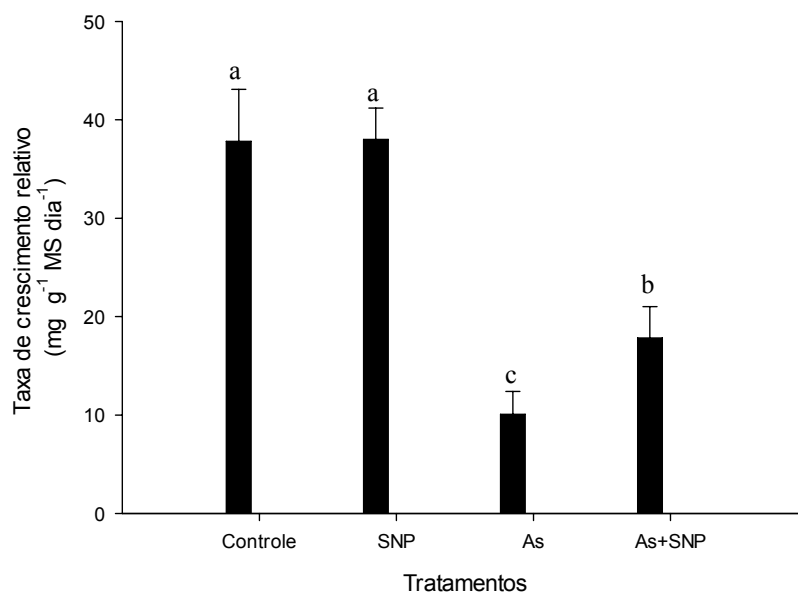


Figura 2. Taxa de crescimento relativo de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.2 Índice de tolerância ao As

O índice de tolerância nos espécimes de *P. stratiotes* expostos ao As foi significativamente maior quando o poluente foi suprido em combinação com o SNP (tabela 1). De fato, quando submetidas apenas ao As, as plantas apresentaram índice de tolerância igual a 26,68%, enquanto na presença de As+SNP este índice aumentou para 47,16%, indicando que o SNP está envolvido na tolerância das plantas ao estresse desencadeado por este metalóide. O índice de tolerância, juntamente com o fator de bioacumulação, fornecem importantes informações sobre as respostas das plantas aos poluentes, sendo importantes ferramentas no processo de fitorremediação.

Tabela 1. Fator de bioacumulação e índice de tolerância em plantas de *Pistia stratiotes* submetidas ao arsênio de forma isolada ou em combinação com SNP.

<i>Tratamentos</i>	<i>Fator de bioacumulação</i> <i>(folhas)</i>	<i>Fator de bioacumulação</i> <i>(raízes)</i>	<i>Índice de</i> <i>tolerância (%)</i>
As	126 Ab	879 Aa	26,68 B
As+SNP	132 Ab	907,83 Aa	47,16 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo órgão, e pela mesma letra minúscula, entre órgãos para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.3 Concentração de nutrientes minerais

A exposição ao As afetou negativamente a concentração de Fe, Mn, Mg e P em *P. stratiotes*. Os teores de Ca permaneceram inalterados em todos os tratamentos (Tabela 2). Embora a presença de As tenha diminuído a concentração de Mn, Mg e Fe, a adição de SNP manteve os teores desses nutrientes em níveis normais, semelhantes aos encontrados no controle.

O mesmo não foi observado para o P, cuja concentração na presença de As foi inferior à encontrada no controle mesmo quando o As foi suprido em combinação com o SNP.

Tabela 2. Concentração de nutrientes minerais em espécimes de *P. stratiotes* submetidos ao arsênio de forma isolada ou em combinação com SNP.

<i>Tratamentos</i>	<i>Ca*</i>	<i>Fe*</i>	<i>Mn*</i>	<i>Mg*</i>	<i>P*</i>
Controle	26,478a	0,380a	0,365a	5,264a	1,869a
SNP	27,520a	0,367a	0,331a	5,327a	1,792a
As	26,504a	0,302b	0,248b	4,174b	1,524b
As+SNP	26,981a	0,376a	0,342a	5,060a	1,578b

* Valores em mg g⁻¹ MS.

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

3.4 Concentração de espécies reativas de oxigênio

Paralelamente às alterações observadas no crescimento e na concentração de nutrientes, as plantas expostas ao As apresentaram aumentos significativos na concentração do ânion superóxido (O₂⁻) (Fig. 3A). O O₂⁻ é a primeira espécie reativa de oxigênio formada durante o estresse oxidativo, a qual pode reagir com diversos substratos e originar novas ROS, levando ao desencadeamento de severos danos celulares, incluindo a morte celular. A presença de SNP, no entanto, foi capaz de atenuar este efeito tóxico do As, mantendo os níveis de O₂⁻ semelhantes ao controle.

Assim como observado para o O₂⁻, os teores de H₂O₂ também aumentaram significativamente nas plantas expostas ao As (Fig. 3B). Este aumento pode ser resultado tanto da dismutação do ânion superóxido em H₂O₂ quanto da conversão de arsenato em arsenito. Quando o As foi suprido em combinação com o SNP, entretanto, os teores de H₂O₂ foram

mantidos em níveis normais, semelhantes aos encontrados no controle, indicando envolvimento do SNP no controle do estresse oxidativo.

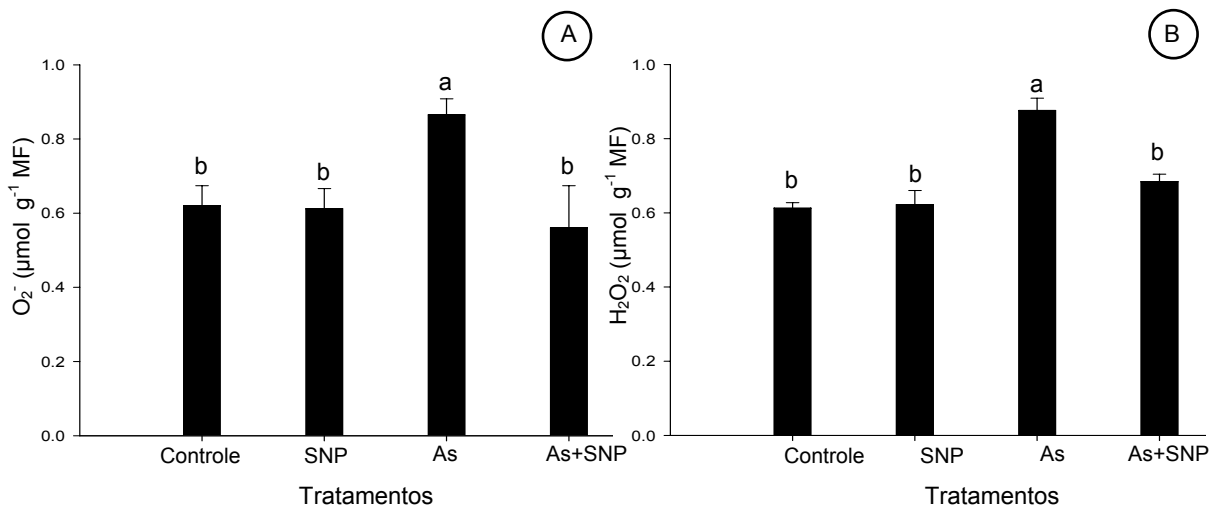


Figura 3. Efeito do arsênio, isolado ou em combinação com SNP, sobre a concentração de ânion superóxido (A) e peróxido de hidrogênio (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.5 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total das folhas de *P. stratiotes* aumentou significativamente nas plantas expostas apenas ao As (Fig. 4), indicando o desencadeamento de mecanismos antioxidantes envolvidos na eliminação do excesso de ROS gerado pela exposição ao metalóide. Quando o As foi suprido juntamente com o SNP este aumento foi ainda maior, provavelmente devido ao envolvimento desta molécula na sinalização de mecanismos celulares antioxidantes.

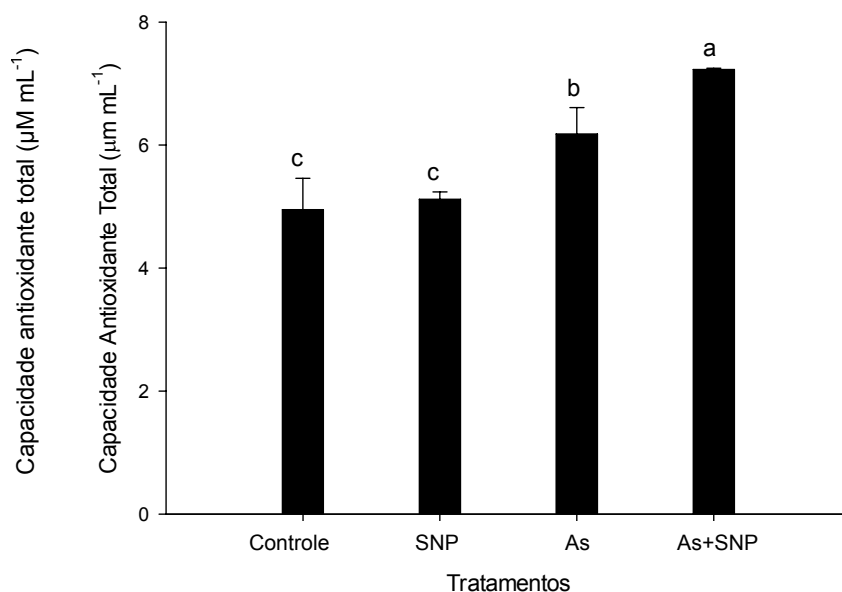


Figura 4. Efeito do arsênio, isolado ou em combinação com SNP, sobre a capacidade antioxidante total em folhas de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.6 Concentração dos pigmentos cloroplastídicos

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais apresentaram significativos decréscimos nas plantas expostas ao As (Fig. 5A, B e C), sendo estes decréscimos mais marcantes na concentração clorofila *b* (39,08%) do que na concentração de clorofila *a* (13,15%). Desta forma, a razão clorofila *a*/clorofila *b* aumentou significativamente no tratamento contendo As (Fig. 5D), indicando a ocorrência de danos ao FSII. O acréscimo de SNP, no entanto, foi capaz de atenuar os efeitos tóxicos do As sobre os pigmentos cloroplastídicos, os quais apresentaram valores estatisticamente iguais ao controle no tratamento contendo As+SNP.

A exposição ao As desencadeou aumentos significativos na concentração de carotenóides nas folhas de *P. stratiotes* (Fig. 5E). No tratamento contendo apenas As a concentração de carotenóides foi 42,19% maior do que no controle, indicando o envolvimento desta molécula em mecanismos protetores contra o estresse desencadeado pelo As. Nos tratamentos contendo As em

combinação com SNP a concentração de carotenóides apresentou valores semelhantes aos encontrados no controle, provavelmente devido ao envolvimento do SNP na atenuação dos danos desencadeados pelo As.

3.7 Efeito do arsênio e do SNP sobre os parâmetros de fluorescência

Nas plantas expostas ao As foi possível observar reduções na eficiência fotoquímica máxima do FSII, avaliada pela razão F_v/F_m , bem como alterações correspondentes em Φ_{FSII} (Fig. 6A e B), dados que sugerem perda de eficiência do FSII, geralmente associada à fotoinibição. Os valores de NPQ nos tratamentos contendo apenas As apresentaram aumentos significativos (Fig. 6C), os quais provavelmente estão relacionados com o aumento de carotenóides observado neste tratamento, indicando o desencadeamento de mecanismos fotoprotetores em resposta ao poluente. O mesmo não ocorreu nas plantas tratadas com As em combinação com SNP, onde o SNP aparentemente teve um efeito protetor sobre o FSII, impedindo a ocorrência de alterações nos parâmetros medidos.

3.8 Efeito do arsênio e do SNP sobre as trocas gasosas

Assim como observado para a fluorescência da clorofila *a*, que reflete os processos da etapa fotoquímica da fotossíntese, a exposição ao As também desencadeou alterações na etapa bioquímica do processo fotossintético, causando significativas reduções na taxa de assimilação líquida de carbono (Fig. 7A). Os efeitos do As sobre a assimilação de carbono, no entanto, foram mais severos do que os observados para a eficiência fotoquímica máxima do FSII (40 e 3,7%, respectivamente), indicando que provavelmente a etapa bioquímica da fotossíntese é mais sensível aos danos desencadeados pelo metalóide.

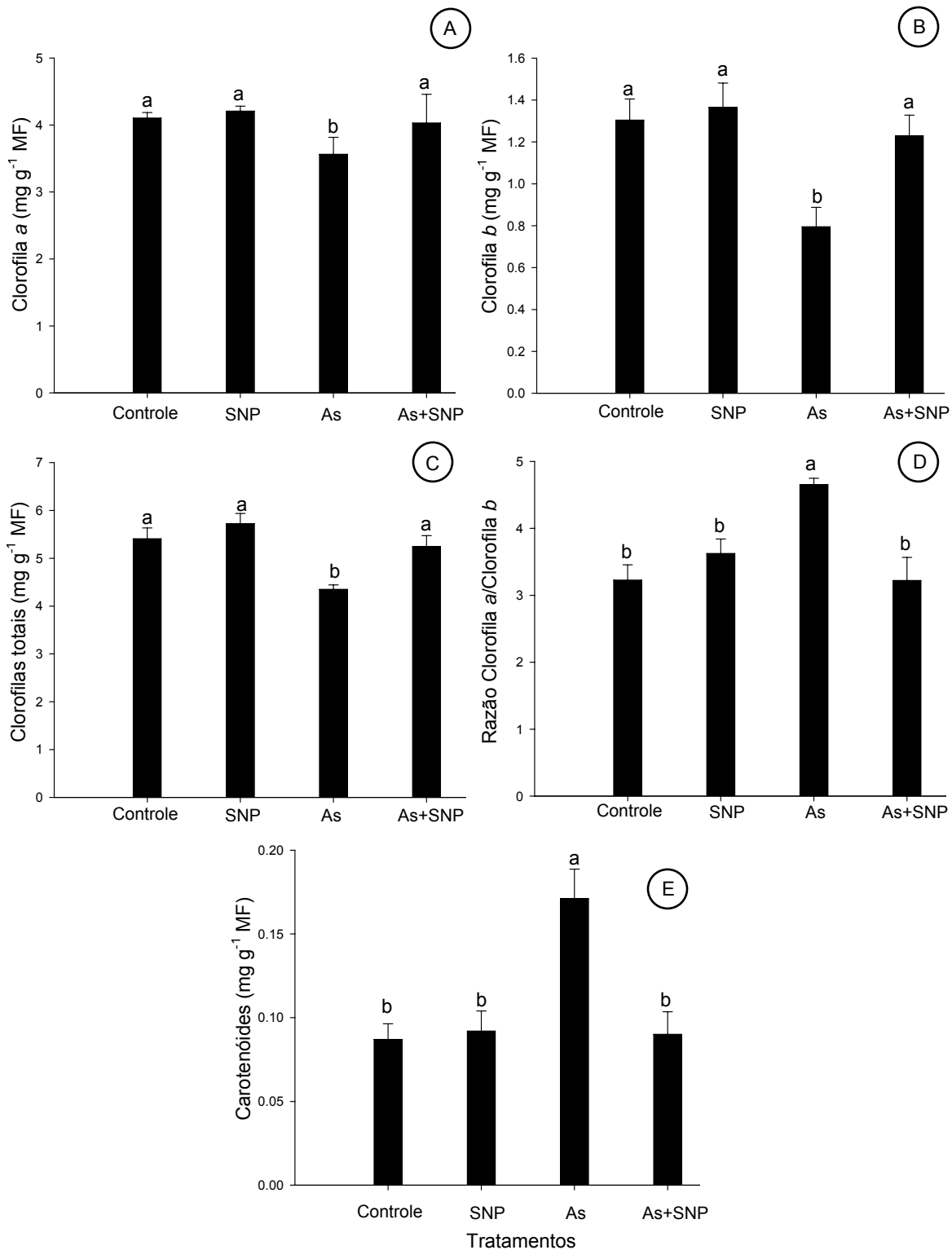


Figura 5. Efeito do arsênio, isolado ou em combinação com SNP, sobre a concentração de pigmentos cloroplastídicos em *Pistia stratiotes*. (A) Clorofila *a*, (B) clorofila *b*, (C) clorofilas totais, (D) razão clorofila *a*/clorofila *b* e (E) carotenóides. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

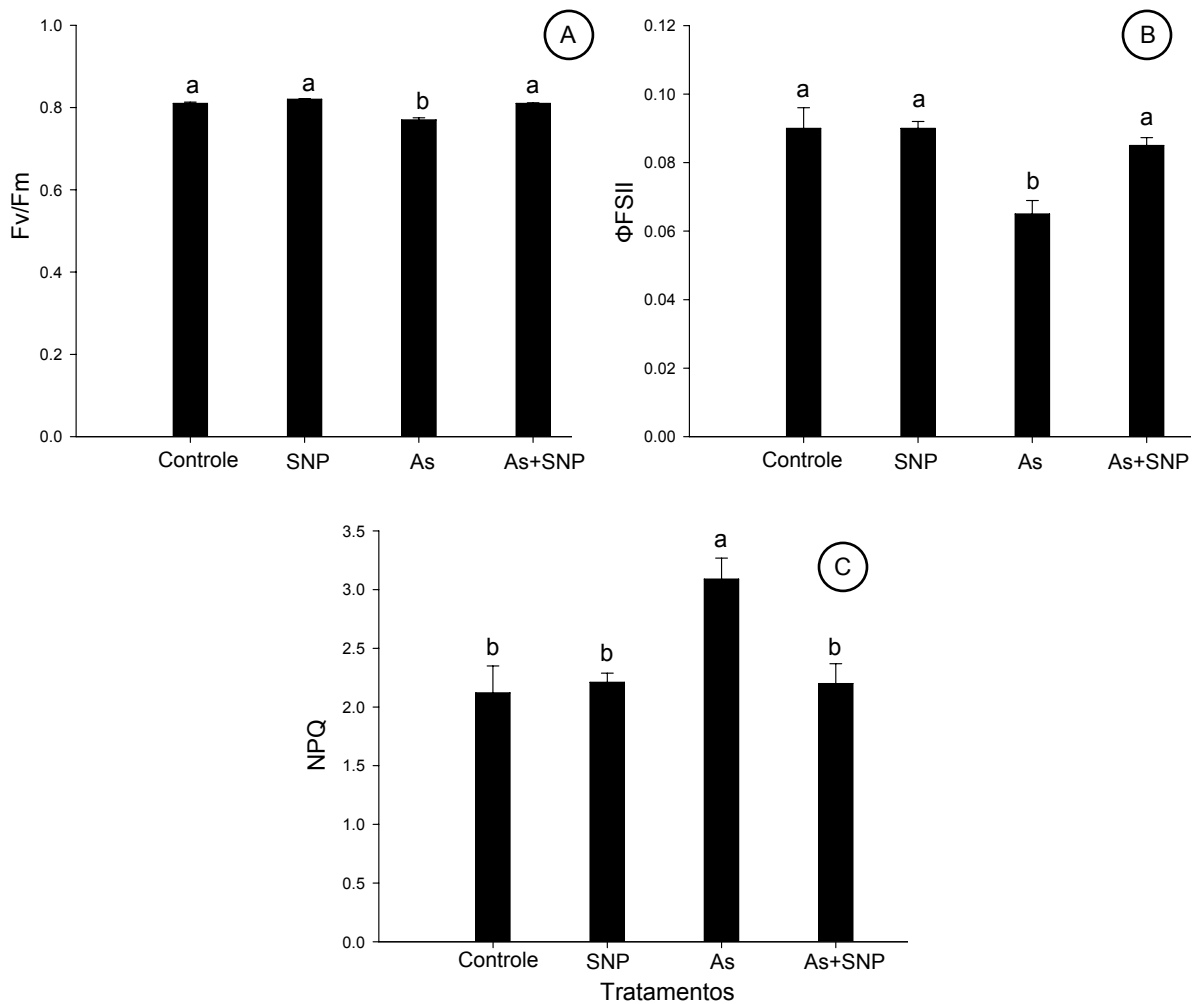


Figura 6. Efeito do arsênio, isolado ou em combinação com SNP, sobre parâmetros de fluorescência da clorofila *a*: (A) Eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), (B) Rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}) e (C) Coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

A razão C_i/C_a , por sua vez, aumentou no tratamento com As (Fig. 7B), sendo estatisticamente igual ao controle nos demais tratamentos. Como não foram observadas alterações em g_s (Fig. 7C), os maiores valores para C_i/C_a no tratamento com As indicam que a diminuição na assimilação líquida de CO_2 ocorreu principalmente devido a alterações bioquímicas desencadeadas pelo poluente, não tendo ocorrido limitações estomáticas. A razão Φ_{FSII}/Φ_{CO_2} também foi maior nas plantas expostas ao As (Fig. 7D), sugerindo que elétrons

estariam envolvidos em outros processos além da fixação de CO₂, o que poderia ocasionar a formação de ROS. Esta hipótese foi corroborada pelo aumento observado no teor do O₂⁻ nas folhas expostas ao As, bem como pelo aumento na capacidade antioxidante total, indicando que as plantas estavam sob condições de estresse oxidativo. A presença de SNP, no entanto, foi capaz de eliminar este efeito tóxico do As sobre o processo fotossintético, uma vez que no tratamento contendo As+SNP os parâmetros fotossintéticos foram estatisticamente iguais ao controle.

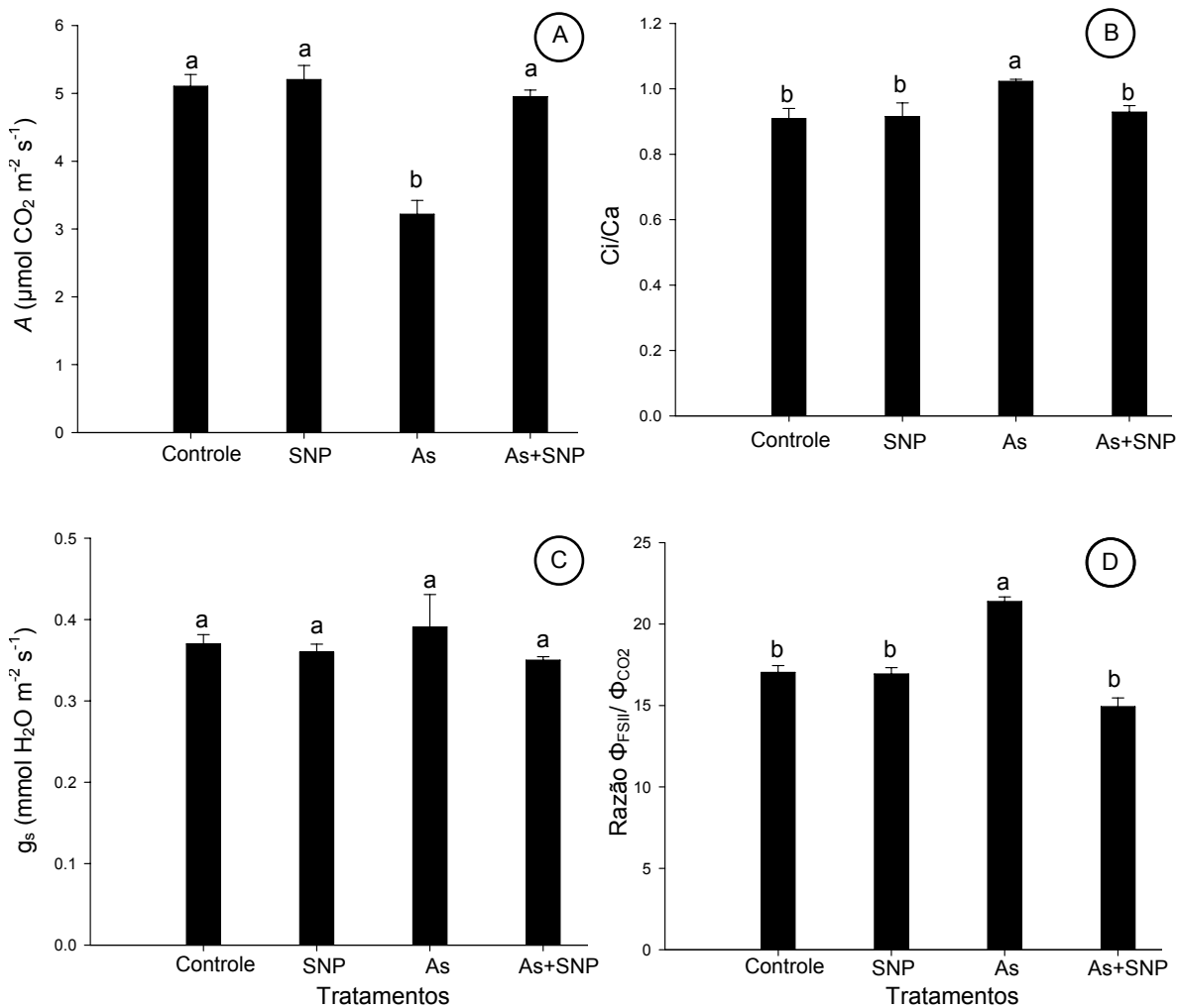


Figura 7. Efeito do arsênio, isolado ou em combinação com SNP, sobre as trocas gasosas em *P. stratiotes*: (A) Assimilação líquida de carbono (A), (B) Razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a), (C) Condutância estomática (g_s) e (D) razão $\Phi_{\text{FSII}}/\Phi_{\text{CO}_2}$. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

4. Discussão

Os espécimes de *Pistia stratiotes* expostos ao As acumularam teores deste metalóide semelhantes aos que foram observados para outras plantas consideradas hiperacumuladoras, como *Brassica rapa* [29] e *Tamarix gallica* [30], sendo superior a $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ MS. Caso este teor de As também seja acumulado em ambientes naturais, *P. stratiotes* passará a ser classificada como uma espécie hiperacumuladora de As [31]. Espécies vegetais hiperacumuladoras de elementos tóxicos são importantes para fitorremediação, haja vista ser a fitoextração um dos processos mais importantes na recuperação de locais contaminados. A diminuição na taxa de crescimento como resposta a este acúmulo, por sua vez, pode ser considerada uma resposta típica das plantas à toxidez do As [32]. Essa diminuição parece estar relacionada, principalmente, com decréscimos na fotossíntese e no processo respiratório [33,34].

O índice de tolerância é o fator que permite analisar a capacidade global da planta em tolerar estresses desencadeados por poluentes. Quando exposta apenas ao As, *P. stratiotes* apresentou índices de tolerância menores do que aqueles observados quando a planta foi exposta a outros poluentes [35], o que provavelmente está relacionado com a alta toxicidade do As. O NO provido na forma de SNP, no entanto, devido às suas características antioxidantes e por ser uma um sinalizador em condições de estresse [12], aumentou o índice de tolerância em *P. stratiotes*.

Os principais danos desencadeados pelo As ocorrem como consequência da maior produção de ROS, o que leva a um desbalanço no potencial redox celular e aumenta a capacidade oxidante da célula, desencadeando danos em vários processos fisiológicos [36]. Este efeito tóxico do As, entretanto, foi revertido em *P. stratiotes* pela presença de SNP, provavelmente devido ao aumento da capacidade antioxidante total. De fato, o SNP pode agir

como mensageiro celular e desencadear sinais para aumentos na atividade do sistema antioxidante nas células. É possível que, adicionalmente ao seu efeito como molécula sinalizadora, o SNP tenha agido também como antioxidante, eliminando diretamente o excesso de ROS [37].

Os efeitos do SNP sobre a concentração de ROS e sobre a capacidade antioxidante total tiveram efeito protetor sobre *P. stratiotes*, possibilitando que os parâmetros fotossintéticos analisados não apresentassem alterações significativas em relação ao controle. Nos tratamentos contendo apenas As, no entanto, foram observadas diversas alterações. A diminuição na concentração de clorofilas devido ao efeito tóxico do As é atribuída ao desencadeamento de vários fatores, como peroxidação das membranas do cloroplasto, aumento da atividade da clorofilase e interação do metal ao grupo –SH de enzimas envolvidas na síntese de clorofila [38]. Já foi relatado, no entanto, que o NO é capaz de prevenir a perda de clorofila em situações de estresse [39], assim como foi observado no presente trabalho. O aumento na concentração de carotenóides no tratamento com As, por sua vez, provavelmente se deve à capacidade antioxidante desta molécula, representando um mecanismo de defesa da planta [38].

O aumento na razão clorofila *a*/clorofila *b* nas plantas expostas ao As pode indicar possíveis mudanças na razão FSI/FSII, em função de mecanismos de adaptação dos cloroplastos ao estresse. Clorofila *a* é o principal pigmento envolvido na coleta de luz no PSI, enquanto tanto a clorofila *a* quanto a clorofila *b* estão presentes no PSII. Desta forma, altas razões clorofila *a*/clorofila *b* podem indicar aumentos na razão FSI/FSII [40]. Aumentos na concentração do FSI incrementam o transporte cíclico de elétrons, o qual está envolvido com a dissipação do excesso de energia, evitando assim a ocorrência danos adicionais ao FSII [41].

Os valores obtidos para F_v/F_m e para o Φ_{FSII} em *P. stratiotes* indicam que a planta sofreu uma leve fotoinibição devido à exposição ao As. Os aumentos na produção de ROS desencadeados pelo metalóide podem ser os responsáveis por esta fotoinibição, uma vez que ROS podem atacar diretamente o centro de reação do FSII e causar a clivagem de fragmentos específicos da proteína DI [42]. Desta forma, o aumento na concentração de antioxidantes diminui a fotoinibição, razão pela qual na presença de SNP os parâmetros de fluorescência foram estatisticamente iguais ao controle.

A capacidade de ROS em gerar fotoinibição, no entanto, é motivo de controvérsia entre vários grupos de pesquisa, sendo que alguns estudos indicam que ROS agem primariamente inibindo os mecanismos de reparo de fotodanos no FSII, não causando danos ao FSII diretamente [43]. A fotoinibição observada em *P. stratiotes* pode, portanto, ser consequência da diminuição na capacidade de assimilação do CO_2 induzida pelo As, o que levaria à excessos de redução na cadeia transportadora de elétrons [44]. A diminuição da capacidade de assimilação do CO_2 nas plantas expostas ao As ocorreu principalmente devido a limitações bioquímicas, provavelmente em função de alterações da atividade de enzimas do ciclo de Calvin [8].

Outros fatores podem ter contribuído para as menores taxas fotossintéticas observadas em *P. stratiotes* exposta ao As, como a alteração desencadeada por este poluente na concentração de nutrientes minerais essenciais para a fotossíntese, como Fe, Mg e Mn, assim como já foi observado para outras plantas [45]. O SNP, ao manter a concentração desses nutrientes em níveis normais, contribuiu para a manutenção do processo fotossintético. As alterações observadas na concentração de fósforo, por sua vez, provavelmente estão relacionadas aos mecanismos de absorção de arsenato, já que ambos os elementos competem pelo mesmo transportador [46].

O menor efeito do As sob a etapa fotoquímica em relação à fixação de CO₂ provavelmente se deve à ativação de mecanismos fotoprotetores. Plantas podem evitar a fotoinibição pela diminuição na absorção de luz ou pelo aumento na dissipação da luz absorvida, através de mecanismos fotoquímicos e não fotoquímicos [47]. Mecanismos fotoprotetores já foram relatados como sendo adaptações a diversos tipos de estresse, sendo que aumentos na fotorrespiração e na dissipação termal são as principais respostas fotoprotetoras para evitar a fotoinibição [48]. A hipótese de que estes mecanismos estejam ocorrendo em *P. stratiotes* submetida ao As é corroborada pelos aumentos observados no NPQ, um indicador da dissipação termal na antena do FSII, e na razão $\Phi_{\text{FSII}} / \Phi_{\text{CO}_2}$, que indica um desvio de elétrons para outras rotas metabólicas como, por exemplo, a fotorrespiração.

Com base nos dados apresentados é possível concluir que o As tem efeito deletério sobre os parâmetros fotossintéticos em *P. stratiotes*, provavelmente pelo aumento na produção de ROS, e que o NO está envolvido nos mecanismos de resposta a este poluente. Desta forma o NO, suprido na forma de SNP, é capaz de atenuar o estresse desencadeado pelo As, restaurando os parâmetros fotossintéticos a níveis normais.

Referências

- [1] B.M. Kumar, K.T. Suzuki, Arsenic round the world: a Review, *Talanta* 58 (2002) 201-235.
- [2] S. Tu, L.Q. Ma, Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions, *Environ. Exp. Bot.* 50 (2003) 243-251.

- [3] W-X. Li, T-B. Chen, Z-C. Huang, M. Lei, X-Y. Liao, Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L., *Chemosphere* 62 (2006) 803-809.
- [4] A.A. Meharg, J. Hartley-Whitaker, Arsenic uptake and metabolism in arsenic-resistant and nonresistant plant species, *New Phytol.* 154 (2002) 29-43.
- [5] M.N.V. Prasad, M. Greger, B. Smith, Aquatic macrophytes. In: M.N.V. Prasad, *Metals in the Environment: Analysis by biodiversity*, New York, Marcel Dekker (2001) 259-288.
- [6] E.E.C. Melo, C.W.A. Nascimento, A.C.Q. Santos, Solubilidade, fracionamento e fitoextração de metais pesados após aplicação de agentes quelantes, *Rev. Bras. Ci. Solo* 30 (2006) 1051-1060.
- [7] M.A. Rahman, H. Hasegawa, M.M. Rahman, M.N. Islam, M.A. Majid-Miah, A. Tasmen, Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh, *Chemosphere* 67 (2007) 1072-1079.
- [8] K.L.F. Silva, Avaliações de biomarcadores anatômicos e fisiológicos em plantas expostas ao arsênio, Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (2008) 97 p.
- [9] Q. Liu, C. Hu, Q. Tan, X. Sun, J. Su, Y. Liang, Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions, *J. Environ. Sci.* 20 (2008) 326-331.
- [10] P. Wojtazek, Nitric oxide in plants: To No or not to NO, *Phytochemistry* 54 (2000) 1-4.
- [11] M. Leitner, E. Vandelle, F. Gaupels, D. Bellin, M. Delledonne, Nitric oxide signaling in plant defence, *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (2009) 451-458.
- [12] S. Hayat, M. Mori, J. Pichtel, A. Ahmad, *Nitric Oxide in Plant Physiology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim (2010) p.15.

- [13] S. Hayat, S.A. Hasan, M. Mori, Q. Fariduddin, A. Ahmad, Nitric oxide: chemistry, biosynthesis, and physiological role, in: S. Hayat, M. Mori, J. Pichtel, A. Ahmad (Eds.), Nitric Oxide in Plant Physiology, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim (2010) p.15.
- [14] R.B. Clark, Characterization of phosphatase of intact maize roots, *J. Agric. Food* 23 (1975) 458-460.
- [15] A.R. Marin, S.R. Pezeshki, P.H. Masschelen, H.S. Choi, Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants, *J. Plant Nutr.* 16 (1993) 1532-4807.
- [16] R-Q. Huang, S-F. Gao, W-L. Wang, S. Staunton, G. Wang, Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, southeast China, *Sci. Total Environ.* 368 (2006) 531-541.
- [17] R. Hunt, *Plant growth analysis*, McGraw-Hill Book, New York (1978) p. 74.
- [18] D.A. Wilkins, The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth, *New Phytol.* 80 (1978) 623–633.
- [19] M. Mohammadi, A.L. Karr, Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules, *J. Plant Physiol.* 158 (2001) 1023-1029.
- [20] A. Boveris, S. Alvarez, J. Bustamante, L. Valdez, Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles, *Method. Enzymol.* 105 (2002) 280-287.
- [21] M.C. Kuo, C.H. Kao, Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves, *Biol. Plantarum* 46 (2003) 149-152.

- [22] C. Gay, J.M. Gebicki, A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay, *Anal. Biochem.* 284 (2000) 217-220.
- [23] R. Szóllósi, I.S. Varga, L. Erdei, E. Mihalik, Cadmium induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds, *Ecotox. Environ. Safe.* 72 (2009) 1337-1342.
- [24] A.R. Wellburn, The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *Plant Physiol.* 144 (1994) 307-313.
- [25] D.I. Arnon, Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.* 24 (1949) 1-15.
- [26] F.M. DaMatta, R.A. Loos, E.A. Silva, M.E. Loureiro, Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability, *J. Plant Physiol.* (2002) 975-981.
- [27] A.L.S. Lima, F.M. DaMatta, H.A. Pinheiro, M.R. Totola, M.E. Loureiro, Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions, *Environ. Exp. Bot.* 47 (2002) 239-247.
- [28] K. Maxwell, G.N. Johnson, Chlorophyll fluorescence – a practical guide, *J. Exp. Bot.* 51 (2000) 659-668.
- [29] M.R. Shaibur, S. Kawai, Effect of arsenic on visible symptom and arsenic concentration in hydroponic Japanese mustard spinach, *Environ. Bot.* 70 (2009) 65-70.
- [30] E. Moreno-Jiménez, E. Esteban, R.O. Capena Ruiz, J.M. Peñalosa, Arsenic- and Mercury-induced phytotoxicity in the Mediterranean shrubs *Pistacia lentiscus* and *Tamarix gallica* grown in hydroponic culture. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 72 (2009) 1781-1789.

- [31] R.D. Revees, Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction, *Plant Soil* 249 (2003) 57-65.
- [32] E.A. Aira, A. Paivoke, L.S. Lisa, Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: Mineral nutrient, chlorophyll content, and phytase activity, *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 49 (2001) 111-121.
- [33] V.K. Misra, B.D. Tripathi, Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes, *Bioresource Technol.* 99 (2008) 7091-7097.
- [34] R. Mascher, B. Lippmann, S. Holzinger, H. Bergmann, Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci.* 163 (2002) 961-969.
- [35] V.J. Odjegba, I.O. Fasidi, Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation, *Ecotoxicology* 13 (2004) 637-646.
- [36] H.P. Singh, S. Kaur, D.R. Batish, N. Sharma, Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice), *Nitric Oxide* 20 (2009) 289-297.
- [37] J. Xiong, G. Fu, L. Tao, C. Zhu, Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants, *Arch. Biochem. Biophys.* 497 (2010) 13-20.
- [38] A. Tewari, R. Singh, N.K. Singh, U.N. Rai, Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals, *Bioresource Technol.* 18 (2008) 8715-8721.
- [39] S. Shi, G. Wang, Y. Wang, L. Zhang, L. Zhang, Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation, *Nitric Oxide* 13 (2005) 1-9.
- [40] A. Takabayashi, M. Kishine, K. Asada, T. Endo, F. Sato, Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO₂-concentration mechanism in C₄ photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 898-903.

- [41] X-G. Li, J-P. Zhao, P-L. Xu, J-J. Meng, Q-W. He, Effects of cyclic electron flow inhibitor (antimycin a) on photosystem photoinhibition of sweet pepper leaves upon exposure to chilling stress under low irradiance, *Agr. Sci. China* 7 (2006) 506-511.
- [42] E. Yyystjärvi, Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster, *Coord. Chem. Rev.* 252 (2008) 361-376.
- [43] N. Murata, S. Takahashi, Y. Nishiyama, S.I. Allakhverdiev, Photoinhibition of photosystem II under environmental stress, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 414-421.
- [44] C. Lu, J. Zhang, Photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants, *Plant Sci.* 151 (2000) 135-143.
- [45] C. Wang, S.H. Zhang, P.F. Wang, J. Qian, J. Hou, W.J. Zhang, J. Lu, Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle, *Chemosphere* 76 (2009) 938-945.
- [46] M.A. Rahman, H. Hasegawa, K. Ueda, T. Maki, M.M. Rahman, Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrhiza* L.: Interactions with phosphate and iron, *J. Hazard. Mater.* 160 (2008) 356-361.
- [47] O. Björkman, B. Demmig-Adams, Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants, In: E-D. Schulze, M.M. Caldwell (Eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*, Springer Verlag, Berlin (1994) 17-47.
- [48] J. Flexas, H. Medrano, Energy dissipation in C₃ plants under drought, *Funct. Plant Biol.* 29 (2002) 1209-1215.

CONCLUSÕES GERAIS

Embora tenha acumulado elevadas quantidades de arsênio (As), sendo possivelmente uma planta hiperacumuladora deste elemento, o acúmulo do poluente comprometeu vários parâmetros fisiológicos e bioquímicos de *Pistia stratiotes*, o que se refletiu em queda na fotossíntese e, conseqüentemente, no crescimento. O óxido nítrico suprido de forma exógena, no entanto, foi capaz de atenuar estes danos, diminuindo a ocorrência de estresse oxidativo e, por conseguinte, aumentando a tolerância de *P. stratiotes* ao As. Os efeitos benéficos do NO para as plantas de *P. stratiotes* estão relacionados tanto com eliminação direta de ROS quanto com a sinalização para aumento nas atividades de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. No entanto, mais estudos são necessários para determinar a exata cascata de alterações em nível molecular e os genes particulares que possam estar envolvidos nestes processos.

Referências

- Crawford, N.M., Guo, F.Q, 2005. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* 10, 195-200.
- Harley, W., Lepp, N.W., 2008. Remediation of arsenic contaminated soils by iron-oxide application, evaluated in terms of plant productivity, arsenic and phytotoxic metal uptake. *Sci. Total Environ.* 390, 35-44.
- Lee, H.S., Cho, Y.H., Park, S.O., Kye, S.H., Kim, B.H., Hahm, T.S., Kim, M., Lee, J.O., Kim, C.I., 2006. Dietary exposure of the Korean population to arsenic, cadmium, lead and mercury. *J. Food Compos. Anal.* 19, 125-138.
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T.O. , 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58, 201-235.
- Matschullat, J., 2000. Arsenic in the geosphere. *Sci. Total Environ.* 249, 297-309.
- Mishra, V.K., Tripathi, B.D., 2008. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technol.* 99, 7091-7097.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1971. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J. Biol. Chem.* 246, 6886-6890.
- Mohammadi, M., Karr, A.L., 2001. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *J. Plant Physiol.* 158, 1023-1029.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Peixoto, P.H.P, Cambraia, J., Sant'ana, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A., 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11, 137-143.

- Rahman, M.A., Hasegwa, M., Rahman, M., Islam, M.N., Miah, M.A.M, Tasmen, A., 2007. Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. *Chemosphere* 67, 1072-1079.
- Robinson, B., Kimb, N., Marchetti, M., Monid, C., Schroeter, L., Dijssel, C.V.D., Milne, G., Clothier, B., 2006. Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Environ. Exp. Bot.* 58, 206-215.
- Roese, H.M.P, Lena, J.C., Paiva, J.F., Friese, K., Castro, P.T.A., 2002. Arsênio no Quadrilátero Ferrífero: presente, passado e futuro. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 67 p.
- Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, P.K.T., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Tuli, R., 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1102-1110.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, G., Arora, K., Kohli, R.K., 2008. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environ. Exp. Bot.* 63, 158-167.
- Singh, H.P., Kaur, S., Batish, D.R., Sharma, V.P., Sharma, N., 2009. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* 20, 289-297.
- Singh, N., Lena, Q.M., Srivastava, M., Rathinasabapathi, B., 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci.* 170, 274-282, 2006.
- Singh, N., Raj, A., Khare, P.B., Tripathi, R.D., Jamil, S., 2010. Arsenic accumulation pattern in 12 Indian ferns and assessing the potential of *Adiantum capillus-veneris*, in comparison to *Pteris vittata*, as arsenic hyperaccumulator. *Bioresour. Technol.* 1001, 8960-8968.

- Singh, R.P., Agrawal, M., 2007. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. *Chemosphere* 67, 2229-2240.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 229-235.
- Spagnuolo, M.S., Carlucci, A., Cigliano, L., Abrescia, P., 2006. Nitric oxide stimulates the erythrocyte for ascorbate recycling. *Nitric Oxide* 14, 272-277.
- Sun, Y., Zhou, Q., Diao, C., 2008. Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technol.* 99, 1103-1110.
- Susarla, S., Medina, V.F., McCutcheon, A., 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* 18, 647-658.
- Tylova-Munzarova, E., Lorenzen, B., Brix, H., Votrubova, O., 2005. The effects of NH_4^+ and NO_3^- on growth, resource allocation and nitrogen uptake kinetics of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *Aquat. Bot.* 81, 326-342.
- USEPA, 2000. National Primary Drinking Water Regulations, Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring: Proposed Rule. *Federal Register* 65,38888-38983.
- Wang, J., Zhao, F., Meharg, A.A., Raab, A., Feldmann, J., McGrath, P., 2002. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol.* 130, 1552-1561.
- Wojtazek, P., 2000. Nitric oxide in plants: To No or not to NO. *Phytochemistry* 54, 1-4.

Xian, Q., Hu, L., Chen, H., Chang, Z., Zou, H., 2010. Removal of nutrients and veterinary antibiotics from swine wastewater by a constructed macrophyte floating bed system. *J Environ Manage* 91, 2657-2661.

Xiong, J., Fu, G., Tao, L., Zhu, C., 2010. Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 497, 13-20.

Xiong, J., Lingyao, A., Lu, H., Zhy, C., 2009. Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. *Planta* 230, 755-765.

Xue, P., Li, G., Liu, W., Yah, C., 2008. Copper uptake and translocation in a submerged aquatic plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Chemosphere* 81, 1098-1103.

Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 339-353.