

GUTENBERG DE ALMEIDA NASCIMENTO

**ENXOFRE E ARSÊNIO EM *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms:
METABOLÔMICA, FITOHORMÔNIOS, TIÓIS E FITORREMEDIAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

N244e
2017 Nascimento, Gutenberg de Almeida, 1976-
Enxofre e arsênio em *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms :
Metabolômica, fitohormônios, tióis e fitorremediação /
Gutenberg de Almeida Nascimento. – Viçosa, MG, 2017.
xiii, 154 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Aguapé (Planta). 2. Aguapé (Planta) - Metabolismo.
3. Plantas - Efeito do enxofre. 4. Plantas - Efeito do arsênio.
5. Glutathione. 6. Fitorremediação. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 584.35

GUTENBERG DE ALMEIDA NASCIMENTO

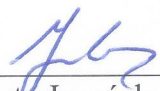
**ENXOFRE E ARSÊNIO EM *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms:
METABOLÔMICA, FITOHORMÔNIOS, TIÓIS E FITORREMEDIAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

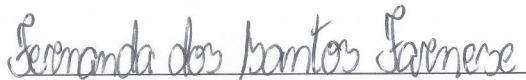
APROVADA: 25 de outubro de 2017.



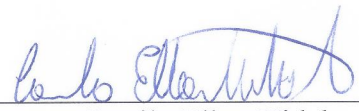
Dimas Ribeiro




Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)



Fernanda dos Santos Farnese



Camilo Elber Vidal



Juraci Alves Oliveira
(Orientador)

Juraci Alves Oliveira
(Orientador)

DEDICATÓRIAS

A minha amada e saudosa mãe, Maria Nilza de Almeida Nascimento (*In memorian*), por ter tido paciência e não ter desistido de investir em um futuro melhor para seus filhos e filha.

A minha querida avó Cecília de Oliveira Valle (*In memorian*), pelo carinho, pelo exemplo de superação e amor ao longo de todos os anos que passamos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu pai Osmar Honório do Nascimento e a minha mãe, Maria Nilza de Almeida Nascimento (*In memoriam*), aos meus irmãos, Déborah e Leonardo e minha saudosa avó Cecília, a qual a vida me presenteou. É impossível dimensionar o que vocês representam e o quanto me serviram de “gás” ao longo desses anos. Tenho muito orgulho de ter vocês em minha vida. Isso mesmo mãe e vó, continuo com vocês vivas em meu coração e na minha mente. Obrigado por tudo.

A Maiana Reis Pimenta, obrigado por aceitar dividir comigo parte de sua vida. Pela companhia, por todo aprendizado dentro e fora da academia. Pelo amor, pelo carinho, pela paciência e generosidade. Aos seus familiares, sua mãezona Glória, Dr. Marcos, Uirá e Maíra por terem me recebido tão bem em sua família e me auxiliado em vários momentos difíceis. E é claro, por você ter me dado a oportunidade de viver a coisa mais intensa e maravilhosa da minha vida: ser pai. Arthur e Gael (próximo da fila), papai ama muito vocês, mais que o infinito!

A todos os meus professores e professoras, em especial aos professores da Escola Estadual Juscelino Manso e Cisipho Campos, destacando o professor Paulo Henrique de Almeida (*In memoriam*), que junto com minha amada mãe e professora, me auxiliou a encontrar a direção a seguir na busca por dar continuidade aos estudos quando ainda a Universidade me parecia um sonho muito distante.

Ao professor Dr. Juraci Alves de Oliveira, pela orientação, pela confiança, pela paciência e principalmente, por me mostrar que generosidade e humanidade são características ainda vivas e presentes num ambiente tão competitivo, e por muitas das vezes, desleal. Agradeço-lhe imensamente por todos os ensinamentos e por todo apoio recebido ao longo das dificuldades que surgiram.

A todos os servidores e servidoras (TAEs) e professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Muitíssimo obrigado. Em especial, ao professor e Coordenador do Programa de Pós-Graduação, Dr. Fábio Murilo DaMatta por todo apoio ao longo desta jornada, por disponibilizar a infraestrutura de seu Laboratório e auxílio na realização das análises moleculares. Aos professores Dr. Wagner Araújo e Dr. Adriano Nunes Nesi, por todo auxílio recebido

para realização de parte das análises e infraestrutura concedida. Obrigado professores Rolf, Raimundo, Marcelo, Cambraia e Loureiro por todo o aprendizado e conhecimento compartilhados.

Aos professores do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), professora Dra. Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela autorização para utilização de parte da infraestrutura do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Inseto-Praga (INCT) na condução deste trabalho; ao professor Dr. Cléberon Ribeiro pela amizade, confiança, por também compartilhar a infraestrutura do Laboratório de Genética Molecular de Plantas e todo o seu apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho; ao professor Dr. Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa, coordenador do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas por também compartilhar a infraestrutura para realização de parte das atividades.

Ao amigo, professor e co-orientador Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos, ou simplesmente Zoca. Obrigado por toda a amizade, por todo o auxílio, pela paciência, por ter aberto as portas do Núcleo de Análises de Biomoléculas da UFV, pelas suas ponderações à cerca deste trabalho, pelo auxílio durante as dificuldades pessoais que surgiram, pelo incentivo para dar continuidade aos estudos após a tormenta.

À amiga e servidora Técnica Administrativa em Educação Taline Gonçalves, por todo auxílio ao longo das inúmeras atividades no Laboratório de Biofísica Ambiental. Aos servidores (TAEs) do NUBIOMOL/UFV, Edvaldo e Nívea por todo o auxílio durante a realização das análises.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, que com suas contribuições pertinentes permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho, especialmente ao Dr. Camilo Vidal, pelo auxílio também durante todo o processo de análises no NUBIOMOL/UFV.

Aos amigos de Pós-Graduação, Dalton Júnior, João Alisson, Vivianny Nayse, Eduardo Pacca e Fernanda Sartor. Aos amigos da Biofísica Ambiental, especialmente Renan Rocha e Adinan Alves. Valeu pelos inúmeros “helps”. Agradeço ainda às amigas de laboratório Fernanda Vidal, Fernanda Farnese, Carolina Montano, Micaela Queiroz, Mayara Pereira e Letícia pelos bons momentos de bancada, por todo auxílio e colaboração. À Maria Joana, eterna estagiária, por me auxiliar nos momentos mais difíceis, permitindo-me direcionar a energia para aquilo que realmente importava.

Aos amigos Gustavo Rosado e Cláudia Braga, Luciana Rosado, Cleydson Silva e Otávio, Genáina e Alex, Evair e Eudes Souza, Clauber (Baresi) e Sabrina, Hervê e Maria Luiza, Reige, Rodrigo e Rita Firmino, Afonso Campos, Bruno Brasileiro, Pedro

Augusto, Virgílio Loriato, Antônio Júnior, Hugo Escandinavo, Kaio Kaue, Patrick Ouger, Wagner Sampaio, Cláudio Lima, Edvan Lana, Juscelino (Capitão), Marco Antônio Joli, Geovane Camburão, Helinho Forasteiro, e tantos outros pelos bons momentos vividos em Viçosa, além de suas preciosas e versáteis contribuições.

Aos amigos Vilmar José da Silva (Cassiteti), Carlos Alberto (Betinho) e José Francisco Sobrinho, que sutilmente nos deixaram ao longo deste período (*In memoriam*), mas que tenho certeza que vibraram comigo a cada obstáculo vencido.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, às servidoras técnicas administrativas (TAEs) e aos professores e professoras da Coordenadoria de Química e Biologia do *Campus* Vitória, especialmente à professora MSc.Edy Maria e professor Dr. José Marcos; aos professores Hudson Cogo e Ricardo Paiva; à servidora (TAE) Kátia Galvão. Agradeço imensamente a todos vocês por todo apoio durante este período.

Aos professores MSc. Adolfo Oleare, MSc. Tiago Araújo Camillo, MSc. Antônio de Freitas, Dr. Reginaldo Corteletti, Dr. Juliano de Souza, MSc., MSc. Hudsson Cássio e MSc. Eduardo Cassani e Antelmo Júnior, pela Resistência!! Há luta!!

Em caráter mais do que especial, agradeço também a todo o povo brasileiro.

BIOGRAFIA

GUTENBERG DE ALMEIDA NASCIMENTO, filho de Maria Nilza de Almeida Nascimento e Osmar Honório do Nascimento, nasceu em Barbacena, Minas Gerais, no dia 08 de dezembro de 1976.

Morando no município de Bias Fortes, Minas Gerais, cursou o ensino primário e fundamental, tendo estudado na Escola Estadual Juscelino Manso e na Escola Estadual Cisipho Campos. Entre os anos de 1992 e 1994, cursou o Técnico em Agropecuária pela antiga Escola Agrotécnica Federal de Barbacena, hoje Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais.

Em fevereiro de 1999, iniciou a graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora em Minas Gerais, colando grau em setembro do ano de 2003. Durante o mês de março de 2004, iniciou o mestrado em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Lavras, tendo concluído durante o ano de 2006.

Aprovado em processo seletivo no início de 2006, iniciou como professor substituto no Colégio de Aplicação João XXIII, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Em junho de 2008, após o encerramento do ciclo no Colégio de Aplicação, tornou-se professor do Colégio Tiradentes da Polícia Militar do Estado de Minas Gerais.

Após concurso público realizado no Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, assumiu o cargo de Professor de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico no *Campus* Vitória em janeiro de 2009.

Em novembro de 2012 iniciou o doutorado junto ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Em outubro de 2017 foi sua defesa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Introdução Geral.....	1
1.2 A escolha da espécie	2
1.3 Arsênio em plantas.....	3
1.4 Arsênio e o metabolismo do enxofre.....	3
1.5 Arsênio e seus efeitos sobre o metabolismo do carbono e nitrogênio.....	6
1.6 Fitohormônios em resposta ao estresse	7
1.7 Metabolômica e metais pesados	7
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivos específicos.....	9
3. REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 1.....	17
RESUMO.....	17
METABOLOME REVEALS MULTIPLES DEFENSE STRATEGIES IN LEAVES OF <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart) Solms DUE TO THE DIFFERENTIATED SUPPLY OF SULFUR AND ARSENIC.	18
Abstract.....	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Obtenção do Material Vegetal.....	21
2.2 Pré-Tratamento do Material Vegetal.....	21
2.3 A Aplicação do stress por Arsênio.....	22
2.4 Determinação dos Teores de Arsênio.....	22
2.5 Determinação dos Teores de Aminoácidos e Proteínas	22
2.6 Histoquímica para Avaliar a Estabilidade de Membranas Celulares	22
2.7 Perfil Metabólico.....	23
2.6.1 Análise Qualitativa e Quantitativa dos Metabólitos Extraídos por GC-MS.....	23
2.8 Determinação dos Teores de Cisteínas e Glutathione Total.....	25
2.9 Monitoramento e Quantificações de Tióis por LC/MS/QqQ	25
2.10 Respiração	26
2.11 Delineamento experimental e análises estatísticas de dados de perfil metabólico.....	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

3.1- Absorção, assimilação, transporte de enxofre em <i>E. crassipes</i> e fitorremediação do arsênio	27
3.2- Arsenato e a oferta de enxofre induzem a uma intensa reprogramação metabólica diferenciada em folhas de <i>E. crassipes</i>	29
3.2- A análise de enriquecimento de vias metabólicas	40
3.4- Fitohormônios e aminoácidos atuam na percepção e resposta ao estresse ocasionado por arsenato em folhas de <i>E. crassipes</i>	42
3.5- Arsênio e a disponibilidade de enxofre afetam diretamente o metabolismo energético em <i>E. crassipes</i>	43
3.6- Danos a membranas celulares em folhas de <i>E. crassipes</i> submetidas ao estresse ocasionado por arsenato são influenciados pela oferta de enxofre.....	44
4- Discussão.....	45
4.1-O metabolismo de aminoácidos em folhas de <i>E. crassipes</i> estressadas por arsenato nos permite conectandar diferentes vias alteradas e metabólitos.....	46
4.2- A acumulação de glutamina tem papel fundamental na resposta rápida ao estresse por arsênio e desencadeia mudanças sobre a remobilização de nitrogênio.	47
4.3- Arsênio e o pool de glutamina afetam drasticamente o metabolismo da alanina, do aspartato e do glutamato	48
4.4- Ácidos graxos atuam na percepção e/ou resposta ao estresse em folhas de <i>E. crassipes</i>	52
4.5- Poliaminas são importantes na resposta ao estresse ocasionado por arsênio em <i>E. crassipes</i>	53
4.6 - Enxofre e arsênio alteram o metabolismo do glioxilato e a fixação de carbono	55
4.7- Acúmulo de açúcares é essencial na resposta ao estresse.....	57
4.8- Metabólitos secundários ajudam a compreender a reprogramação metabólica em folhas de <i>E. crassipes</i>	58
5 - Considerações Finais	62
6- Referências	63
7- Material Suplementar	76
Capítulo 2	90
Abstract	90
Resumo	91
1-Introdução	93
2. Metodologia	95
2.1- Obtenção do material vegetal	95
2.2 – Pré-Tratamento	95
2.2.1- Aplicação do stress por Arsênio em plantas contendo ou não a suplementação de enxofre	95
2.3 – Determinação do teor de arsênio (As) enxofre (S) e fósforo (P)	95
2.4- Determinação da taxa de crescimento relativo (TCR)	96
2.5 -Determinação do fator de transferência (FT)	96

2.6- Determinação de Malondialdeído (MDA)	96
2.7- Determinação teor de Peróxido de Hidrogênio	97
2.8- Determinação dos teores de Tióis e Hormônios Vegetais	97
2.8.1- Monitoramento e quantificações de hormônios	97
2.9- Extração e determinação da atividade das redutases da glutatona (GR)	98
2.10- Determinação de parâmetros de trocas gasosas	98
2.11- Determinação dos teores de Clorofilas e carotenoides	98
2.12- Determinação dos teores de amido e sacarose	99
2.13- Delineamento experimental e Análises estatísticas	99
3-Resultados	100
3.1- O reabastecimento de enxofre potencializa a translocação de arsênio para folhas de <i>Eichhornia crassipes</i> pré-tratadas com fome de enxofre	100
3.2- Maior disponibilidade de enxofre aumenta o crescimento foliar e reduz a perda de biomassa radicular em <i>E. crassipes</i>	103
3.3- A absorção e a translocação de arsênio afetam a integridade das membranas celulares	104
3.4- O impacto sobre o Metabolismo Fotossintético em folhas de <i>Eichhornia crassipes</i> ajuda a compreender os efeitos deletérios do arsênio.	106
3.5- Arsênio afeta negativamente o pool de amido e sacarose enquanto a maior disponibilidade de enxofre permite o aumento das reservas energéticas em folhas de <i>E. crassipes</i>	109
3.6- O acúmulo de cisteínas em <i>E. crassipes</i> é potencializado com a maior oferta de enxofre e acumulação de arsênio.	110
3.7- Arsenato eleva os teores de γ -glutamil-cisteína (γ GC) em <i>E. crassipes</i> , impactando a rota de biossíntese de glutatona.	111
3.8- Glutaciona redutase (GR) é essencial na tentativa de manutenção da homeostase redox em <i>E. crassipes</i> após o estresse por arsenato, contribuindo para alterar a disponibilidade de GSH.	112
3.9- Fitormônios atuam na percepção e resposta ao estresse por arsenato em <i>E. crassipes</i> ...	113
3.10- Arsênio afeta drasticamente a parte aérea de <i>E. crassipes</i> , levando a necrose e senescência foliar	118
4-Discussão	120
4.1- Reabastecimento de enxofre após fome induzida ativa a via de assimilação de enxofre, permitindo uma maior acumulação de enxofre e arsênio.	121
4.2- Citocininas são essenciais para a acumulação de enxofre e fitorremediação do metal ...	122
4.3- Auxinas participam da sinalização do estresse e na regulação do crescimento.....	124
4.4- A biossíntese de ABA é essencial na percepção do estresse e ajuda a compreender os efeitos sobre o metabolismo central, a acumulação de arsênio e o crescimento de <i>E. crassipes</i>	126
4.5- Acumulação de Tióis: Defesa, tolerância e sua relação com o controle hormonal em <i>E. crassipes</i>	130
5. Considerações finais	135
6. Referências	136

RESUMO

NASCIMENTO, Gutenberg de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2017. **Enxofre e arsênio em *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms: Metabolômica, fitohormônios, tióis e fitorremediação.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientador: Humberto Josué Ramos de Oliveira.

Plantas de *Eichhornia crassipes* foram submetidas a uma privação de enxofre e um posterior reabastecimento com sulfato, quando foram então estressadas por arsenato. Buscou-se investigar como a oferta diferenciada de enxofre após uma restrição de enxofre em *E. crassipes* e a presença de arsênio afetam o seu crescimento, o acúmulo de arsênio e as interações com fitormônios na percepção e resposta ao estresse. Além disso, avaliou-se os efeitos da disponibilidade diferencial de enxofre sobre a acumulação de metabólitos, buscando identificar novos biomarcadores de stress, avaliando a interconexão de respostas entre o metabolismo primário e secundário em folhas de aguapé, em busca de estratégias mais eficientes para a fitorremediação e tolerância ao metal. Plantas foram aclimatadas em solução nutritiva de Clark por 7(sete) dias, contendo 1/4 da força iônica, com baixa disponibilidade de enxofre no meio ($2,5\mu\text{M SO}_4^{-2}$), trocada a cada 48h. O MgCl_2 foi usado como fonte de magnésio em detrimento do MgSO_4 . Após esse período, foram transferidas para frascos de vidro contendo diferentes concentrações de enxofre em solução. No primeiro tratamento, $2,5\mu\text{M SO}_4^{-2}$ foram adicionados, já no segundo e terceiros, 200 e $600\mu\text{M SO}_4^{-2}$, respectivamente. A esses tratamentos foram adicionados $8\mu\text{M}$ de arsenato (As(V)) por 24h, onde posteriormente o material foi coletado, e as análises processadas com auxílio de espectrometria de massas. A privação e posterior reabastecimento se mostrou uma estratégia extremamente eficaz quando se trata de novas possibilidades em programas de fitorremediação de arsênio usando a espécie, demonstrando inclusive que a maior oferta de enxofre no reabastecimento, potencializou a capacidade de acumulação do metal. A presença do metal afeta o crescimento vegetal, sendo que plantas cultivadas sobre baixa disponibilidade de enxofre, acumularam menores teores de metal, o que pode ter contribuído para um menor decréscimo em sua TCR. O acúmulo de cisteínas foi potencializado com a maior oferta de enxofre e acumulação de arsênio. Metabólitos responsivos aos diferentes tratamentos foram identificados com auxílio de diferentes técnicas de espectrometria de massas. Arsenato e a oferta diferenciada de enxofre

induziram a uma reprogramação metabólica intensa em folhas de aguapé. Cerca de 111 metabólitos se mostraram significativos. Dentre eles, fitormônios como ácido abscísico, ácido jasmônico, citocininas, auxinas, ácido salicílico e o precursor do etileno, ACC. A análise de vias metabólicas afetadas mostra a complexidade de respostas e o papel fundamental que o metabolismo de aminoácidos, da glutatona e do ciclo do glioxilato tem na resposta ao estresse promovido pelo metal, atingindo em cheio o metabolismo energético, seja por alterações na fixação do carbono, seja pelo impacto gerado sobre o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Após o reabastecimento de enxofre, plantas translocaram a maior parte do enxofre absorvido e do metal para a parte aérea, sendo que a bioacumulação foi maior em folhas crescendo em meio com maior oferta de enxofre (HS). Após a análise dos danos irreversíveis ao aparato respiratório e membranas celulares provocados pelo metal, a hipótese de que a maior oferta de enxofre em solução promove uma menor amplitude de danos celulares relacionados a morte celular pode ser confirmada. Além disso, diferentes grupos de metabólitos secundários respondem diferencialmente ao enxofre e arsênio, ajudando a compreender a reprogramação metabólica em folhas de aguapé.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Gutenberg de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2017. **Sulfur and arsenic in *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms: Metabolomics, phytohormones, thiols and phytoremediation.** Advisor: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisor: Humberto Josué Ramos de Oliveira.

Plants of *Eichhornia crassipes* were submitted to a sulfur deprivation and a later refueling with sulphate, when they were then stressed by arsenate. We sought to investigate how the differentiated supply of sulfur after a sulfur restriction in *E. crassipes* and the presence of arsenic affect its growth, the arsenic accumulation and the interactions with phytohormones in the perception and response to stress. In addition, we evaluated the effects of differential sulfur availability on the accumulation of metabolites, seeking to identify new stress biomarkers, evaluating the interconnection of responses between primary and secondary metabolism in leaves of water hyacinth, in search of more efficient strategies for phytoremediation and metal tolerance. Plants were acclimatized in Clark's nutrient solution for 7 (seven) days, containing 1/4 of the ionic strength, with low sulfur availability in the medium ($2.5\mu\text{M SO}_4^{2-}$), changed every 48h. MgCl_2 was used as a source of magnesium over MgSO_4 . After that period, they were transferred to glass vials containing different concentrations of sulfur in solution. In the first treatment, $2.5\mu\text{M SO}_4^{2-}$ were added, already in the second and third, 200 and $600\mu\text{M SO}_4^{2-}$, respectively. To these treatments were added $8\mu\text{M}$ of arsenate (As (V)) for 24h, where later the material was collected, and the analyzes processed with the help of mass spectrometry. Deprivation and subsequent replenishment proved to be an extremely effective strategy when it comes to new possibilities in arsenic phytoremediation programs using the species, even showing that the higher supply of sulfur in the refueling, potentiated the accumulation capacity of the metal. The presence of the metal affects the vegetal growth, being that plants cultivated on low availability of sulfur, accumulated smaller contents of metal, which may have contributed to a smaller decrease in its TCR. The accumulation of cysteines was enhanced with the higher sulfur supply and arsenic accumulation. Metabolites responsive to different treatments were identified using different mass spectrometry techniques. Arsenate and the differentiated supply of sulfur induced intense metabolic reprogramming in leaves of water hyacinth. About 111 metabolites were significant. Among them, phytohormones such as abscisic

acid, jasmonic acid, cytokinins, auxins, salicylic acid and the precursor of ethylene, ACC. The analysis of the affected metabolic pathways shows the complexity of responses and the fundamental role that amino acid, glutathione and glyoxylate cycle metabolism play in the response to the stress promoted by the metal, reaching the energetic metabolism in full, either by changes in the fixation of the carbon, or the impact generated on the tricarboxylic acid (TCA) cycle. After sulfur replenishment, plants translocated most of the absorbed sulfur and metal to the aerial part, and the bioaccumulation was higher in leaves growing in medium with higher sulfur (HS). After the analysis of the irreversible damage to the respiratory tract and cell membranes provoked by the metal, the hypothesis that the greater sulfur supply in solution promotes a smaller amplitude of cellular damages related to cell death can be confirmed. In addition, different groups of secondary metabolites respond differentially to sulfur and arsenic, helping to understand the metabolic reprogramming in leaves of water hyacinth.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral

Embora os metais sejam constituintes naturais de solos e ocorram naturalmente no meio ambiente, hoje em dia, a contaminação dos solos e águas por metais tóxicos e metalóides é de grande preocupação em todo o mundo (Villiers *et al* 2011; Rascio & Navari-Izzo 2011). Isto tem levado a uma intensificação em pesquisas relacionadas a fitotoxicidade destes contaminantes e sobre os mecanismos utilizados pelas plantas para reverter os seus efeitos prejudiciais (Hossain *et al* 2010).

O Arsênio (As) é um metaloide não essencial de grande preocupação ambiental, devido à sua contaminação cada vez maior. As fontes de arsênio incluem tanto processos naturais (por meio de dissolução de compostos contendo arsênio adsorvido em minérios pirita na água por fatores geoquímicos – Arsenopirita) como antrópicos (por exemplo, através do uso de inseticidas, herbicidas e fertilizantes fosfatados, e por meio da indústria de semi-condutores) (Srivastava. *et al* 2010).

O Arsênio (As) também encontra o seu caminho para a cadeia alimentar. Em todo o mundo, um esforço substancial tem sido dirigida para a remoção de arsênio da água e solos contaminados através de processos de remediação químicos e físicos, mas estes são caros e, portanto, têm limitado a aplicabilidade em muitas áreas onde a contaminação por arsênio e pobreza coexistem. Como resultado, o consumo de água e comida contaminadas continua a ser a principal via de exposição ao arsênio em seres humanos. (Yong-Guan & Rosen 2009).

Em décadas recentes, no sul e sudeste da Ásia, milhões de pessoas têm sofrido de envenenamento pelo consumo de água contaminada por arsênio. Um caso dramático no Brasil está relacionado à crescente atividade de mineração no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais (Araújo 2011). Borba *et al* (2000) ressaltam que nos últimos três séculos pelo menos 390 toneladas de arsênio devem ter sido liberadas para o ambiente. Tecnologias alternativas e ambientalmente adequadas são, uma necessidade urgente para combater a contaminação global por arsênio. Atualmente entre as várias tecnologias disponíveis até agora ou em desenvolvimento, a fitoremediação é considerada a mais ambientalmente adequada e de baixo custo (Yong-Guan & Rosen, 2009).

1.2 A escolha da espécie

Muitos pesquisadores têm utilizado diferentes espécies de plantas como o aguapé (*Eichhornia crassipes*) (Jamuna & Noorjahan, 2009; Valipou *et al.*, 2011; Dar *et al.*, 2011; Farnese *et al.*, 2013), alface d'água (*Pistia stratiotes* L.) (Farnese *et al.*, 2014; Gusman *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2011; Awuah *et al.*, 2004), lentilha-d'água ou erva de pato (*Lemna*) (Leão *et al.*, 2014; Khellaf & Zerdaoui, 2009), Junco ou taboa (*Typha*) (Sasmaz *et al.* 2008; Manios *et al.*, 2003), capim Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) (Roongtanakiat *et al.*, 2009; Chen Yahua *et al.*, 2004) e caniço d'água (*Phragmites Australis*) (Bonanno & Giudice, 2010; Southichak *et al.*, 2006) para o tratamento de diferentes tipos de contaminantes das águas.

Eichhornia crassipes, vulgarmente conhecida como aguapé ou jacinto d'água ("Water Hyacinth") é uma macrófita aquática perene, de rápido crescimento e de proliferação livre e flutuante (Reddy & Sutton, 1984), membro da família Pontedeira - Pontederiaceae (Pontederia é endêmica das Américas, distribuída a partir de Canadá até Argentina) (Priya & Selvan, 2014).

Tem sido demonstrado em pesquisas com o aguapé, que essa planta é uma boa candidata para remoção de poluentes ou até mesmo como um bioindicador de metais pesados em ecossistemas aquáticos, apresentando altas taxas de remoção para vários materiais corantes de indústrias têxteis e de metais pesados como o ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), cromo (Cr), cádmio (Cd), manganês (Mn), o mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) a partir de soluções aquosas (Priya & Selvan, 2014; Jayaweera *et al.*, 2008; Jayaweera *et al.*, 2007; Sekomo *et al.*, 2012; Módenes *et al.*, 2011). *Eichhornia crassipes* tem sido utilizada para também minimizar alguns outros parâmetros físico-químicos, como TSS (sólidos suspensos totais), TDS (sólidos totais dissolvidos), DQO (demanda química de oxigênio) e DBO (demanda biológica de oxigênio) em águas residuais industriais (Priya & Selvan, 2014).

Misbahuddin & Fariduddin (2002) descobriram que apenas as raízes de jacintos de água retiram 81% de uma solução de 400 ppb de arsênio. A planta de aguapé inteira (raízes, folhas, caules, etc) foi relatada no mesmo estudo com cem por cento de remoção do arsênico, e tê-lo feito entre três a seis horas. Na Venezuela, *Eichhornia crassipes* e *Lemna minor* foram testadas para avaliar a capacidade de ambas em bioacumular arsênio. Alvarado *et al.* (2008), ao comparar *L. minor* e *Eichhornia crassipes* encontraram uma taxa de remoção de arsênio em *L. minor* menor (140 mg AS / ha d)

enquanto que o aguapé teve uma taxa de remoção de 600 mg de AS / ha d sob condições do ensaio. A eficiência de remoção do aguapé foi maior devido a sua biomassa. Andrade *et al.* (2012) ao investigar o papel do óxido nítrico sobre a sinalização e tolerância ao stress por arsênio em *E. crassipes*, observou que este aumenta a tolerância do aguapé ao metal. Pereira (2010), ao avaliar características anatômicas e fisiológicas do aguapé exposto ao arsênio, encontrou um aumento na taxa fotossintética, na densidade estomática e no parênquima esponjoso relacionando-as com seu potencial para fitorremediação em áreas contaminadas pelo metal(oide).

1.3 Arsênio em plantas

Plantas podem se desintoxicar por Arsênio ao quelá-lo através de ligantes que contenham enxofre, tais como a glutatona (GSH) e fitoquelatinas (PCs; polímeros de GSH) (Bleeker *et al.*, 2006), seguido por captura desses complexos nos vacúolos (Raab *et al.*, 2005). Muitas plantas respondem a altas concentrações de AsIII, aumentando a síntese de uma gama de compostos contendo tiol (Raab *et al.*, 2005), incluindo fitoquelatinas (PCs) (Schmöger *et al.*, 2000 ; Hartley-Whitaker *et al.*, 2001 ; Cao *et al.*, 2004 ; Srivastava *et al.*, 2007).

De acordo com Reidi *et al.* (2013), as altas concentrações de arsênio encontradas nos tecidos de muitas plantas, exige uma maior absorção de enxofre para a síntese de tióis, e que ainda não está claro se o limite de tolerância é determinado pela taxa de absorção de enxofre, pela taxa de absorção de espécies de arsênio, pela taxa em que os compostos de tiol podem ser sintetizados, ou se é pela taxa na qual os complexos de tiol-arsênio possam ser compartimentalizados.

Rother *et al.* (2008) afirma que a exposição das plantas ao As pode conduzir a uma deficiência de enxofre e pode imitar as respostas induzidas pela inanição de enxofre em plantas. Assim, seria coerente a sugestão de Reidi *et al.* (2013) de que a elevada permeabilidade e afinidade por tióis poderia causar uma rápida redução no teor de tiol livre, mesmo em plantas com reservas abundantes de enxofre, provocando assim, uma resposta de deficiência de enxofre. Neste sentido, alguns autores apontam que algumas dessas respostas observadas dem ser influenciadas por fitormônios.

1.4 Arsênio e o metabolismo do enxofre

O enxofre é absorvido pelos vegetais na forma de sulfato (SO_4^{2-}) e distribuído por todo o tecido vegetal por uma intrincada rede de transportadores de sulfato. Eles

pertencem a uma família de proteínas de membrana que diferem em localização e afinidade por sulfato (Takahashi *et al* 2011). Em *Arabidopsis thaliana*, AtSULTR 1;1, AtSULTR 1;2 e AtSULTR 1;3 pertencem a uma família de transportadores de membrana em raízes (HASulT), sendo que AtSULTR 1;1 é estimulado apenas em condições de limitações na oferta de enxofre, apesar da homologia com AtSULTR 1;2, principal transportador de sulfato, de alta afinidade e expresso na membrana plasmática da epiderme, no córtex da raiz e no ápice radicular (Takahashi *et al* 2000; Shibagaki *et al* 2002; Yoshimoto *et al* 2002). O transportador AtSULTR 1;3 é expresso em células do floema, realizando o transporte entre fonte-dreno (Yoshimoto *et al* 2003). Outras duas subfamílias importantes de transportadores, são AtSULTR 2;1 e AtSULTR 2;2 pertencentes a uma família de transportadores de baixa afinidade (LASulT), que são expressos em células do parênquima do xilema e responsável pelo transporte a longas distâncias (Takahashi *et al* 1997; Kataoka *et al* 2004) e AtSULTR 4;1 e AtSULTR 4;2, localizados em membranas do tonoplasto, sugeridos como envolvidos na remobilização de sulfato do vacúolo para o citosol, sendo AtSULTR 4;2 mais expresso também em condições de limitações na disponibilidade de enxofre (Kataoka *et al* 2004).

De acordo com Iqbal *et al* (2013), uma boa parte da S incorporados em moléculas orgânicas em plantas está localizada em grupos tiol (-SH) em proteínas (Cis-resíduos) ou tióis não-protéicos, (GSH). Essas ligações são importantes para a estabilização da estrutura da proteína. A biossíntese de GSH e PC que normalmente é induzida por exposição ao As requer um fornecimento adequado dos blocos de construção GSH-Glu, Cys e Gly. Em ambos, parte aérea e raízes do tipo selvagem em *Arabidopsis*, as proporções em massa de livre Glu: Gly: Cys foram cerca de 20:03:01 (Muñoz-Bertomeu *et al* 2009).

Para Noctor *et al* (2012) as plantas não podem sobreviver sem glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine) ou γ - glutamylcisteína contendo homólogos. As razões pelas quais esta pequena molécula seja indispensável ainda não são completamente compreendidas, mas pode deduzir-se que a glutathione tem funções no desenvolvimento das plantas que não podem ser realizados por outros tióis ou antioxidantes. As funções conhecidas de glutathione incluem papéis em vias biossintéticas, desintoxicação, bioquímica, antioxidante e homeostase redox (Fig. 1).

A glutathione pode interagir de várias maneiras com as proteínas através de troca tiol-dissulfeto e processos relacionados. A sua posição estratégica entre oxidantes como

as espécies reativas de oxigênio e redutores celulares torna o sistema glutaciona perfeitamente configurado para funções sinalização.

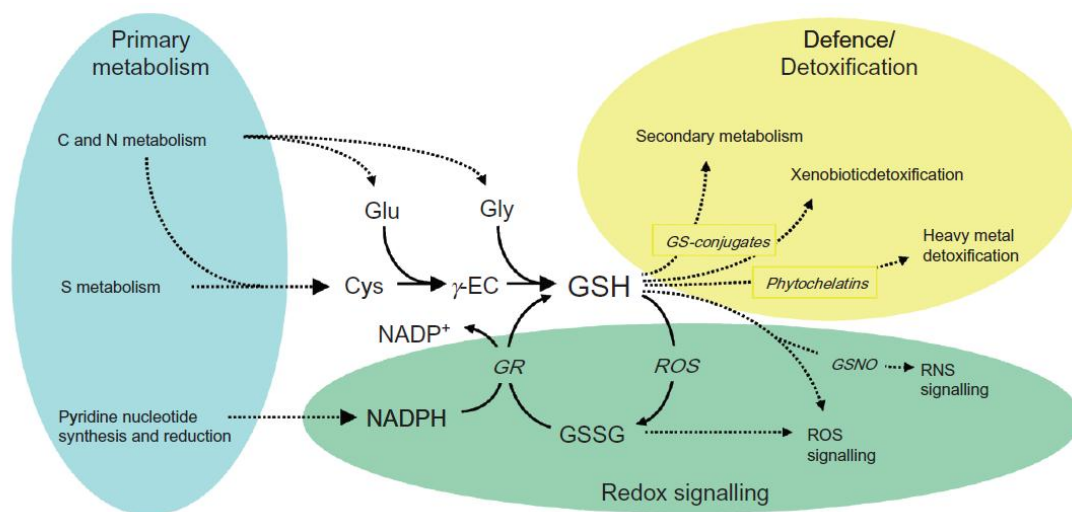


Figura 1- E Visão geral de algumas das funções mais importantes de glutaciona (síntese, o “turnover” redox, metabolismo, sinalização) (Fonte: Noctor *et al* 2012).

Tióis podem atuar como chaperonas no citoplasma para evitar a ligação AsIII às proteínas (Zhao *et al.* de 2003), embora o arsênio seja subsequentemente armazenado como espécies inorgânicas no vacúolo (Raab *et al* de 2005). Srivastava & D’Souza (2010) ao avaliarem os efeitos da suplementação de enxofre em plantas de *Hydrilla verticillata* submetidas ao stress por As (V) e As (III) verificaram que plantas reforçam a sua capacidade para acumular As, presumivelmente, através de sua quelatção eficiente através de aumento significativo no nível total de tióis.

Em um trabalho para avaliar os efeitos do sulfato e da glutaciona reduzida (GSH) sobre a absorção de arsenato em *Pteris vittata* descreveram que tanto GSH como sulfato não impactaram a bioamassa e que a indução do sulfato na acumulação de arsênio por *P. vittata* pode ser parcialmente atribuída ao aumento de GSH (Wei *et al* 2010). Sakai e colaboradores. (2010) demonstraram que os tióis de baixo peso molecular (LMWTs) como a glutaciona e as fitoquelatinas contribuem para a tolerância ao arsênio em *P. vittata*, aumentando sua síntese durante o stress. Além disso, demonstraram que a localização celular de arsênio nas folhas de *P. vittata* coincide com o local de acúmulo de LMWTs.

Recentemente, Watanabe *et al.* (2014) ao avaliar os efeitos do arsênio sobre a absorção e distribuição de enxofre em *P. vittata*, observou que a aplicação de arsênio

aumentou a concentração de enxofre nas folhas. Além disso, com o auxílio de técnicas de localização subcelular de isótopos de enxofre com imagens de microscopia eletrônica de varredura, Watanabe e colaboradores mostraram a localização de LMWTs em vacúolos de células epidérmicas de *P. vittata* pela primeira vez, mostrando que não apenas as fitoquelatinas, mas que os LMWTs são de extrema importância em seu mecanismo de hiperacumulação.

1.5 Arsênio e seus efeitos sobre o metabolismo do carbono e nitrogênio

Numa recente revisão, Finnegan & Chen, 2012 mencionam que para diversos autores (Srivastava *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2006 ; Khan *et al.*, 2009), um dos principais efeitos sobre o metabolismo do carbono, o acúmulo de ascorbato, parece ser o principal efeito do arsenato, muito provavelmente para reforçar a proteção contra o dano oxidativo produzido por ROS. Mencionam ainda que de acordo com Foyer *et al.* (2011), o arsênio ao estimular a produção de ROS, pode ser considerado o motor da toxicidade deste metaloide, sendo que a produção destas moléculas requer aclimações metabólicas, incluindo o desvio metabólico de carbono, nitrogênio, enxofre e energia metabólica para o crescimento e desenvolvimento normais da planta (Noctor *et al.*, 2012).

Arsênio promove a redução na fotossíntese líquida, além de afetar a biossíntese de clorofilas e a atividade do fotossistema II (Singh *et al.*, 2006 ; Duman *et al.*, 2010). Tem-se ainda que o arsênio pode reduzir o fluxo de elétrons através das membranas tilacóides, diminuindo o potencial de produzir ATP e NADPH, sendo que ambos são necessários para alimentar as reações de fixação de carbono. Araújo *et al.* (2011), sugerem que a clorofila poderia ser usada como uma fonte de carbono metabólica quando a disponibilidade de hidratos de carbono é baixa. Sobre o processo respiratório, o principal efeito pode ser o desacoplamento ASV-dependente da síntese de ATP a partir do transporte de elétrons, que resulta da síntese de ADP-AsV altamente instável (Moore *et al.*, 1983).

O AsV também parece perturbar a assimilação de Nitrogênio (N). Não-leguminosas captam o N do solo predominantemente como nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+). O N inorgânico na forma de NH_4^+ é assimilado pela ação combinada da glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) para a entrada no *pool* de moléculas orgânicas como glutamato (Foyer *et al.*, 2011). Em raízes de arroz tratadas com AsV havia diminuição da quantidade de transcritos para um transportador de NO_3^- e para um transportador de

NH₄⁺. Dwivedi *et al.* (2010) também relataram que a exposição ao arsênio pode causar mudanças dramáticas nos pools de aminoácidos e que a medida em que ocorre mudanças nas quantidades destes aminoácidos, isto ocorreria devido a mudanças na biossíntese de aminoácidos ou se isso poderia advir de alterações no metabolismo de proteínas.

1.6 Fitohormônios em resposta ao estresse

Ácido jasmônico, auxinas, citocininas e etileno estão envolvidos na percepção e sinalização em função do estresse ocasionado pela exposição de *Brassica juncea* ao arsênio (Srivastava *et al* 2012; Srivastava *et al* 2009).

Huang e colaboradores (2012) observaram que a expressão de genes da biossíntese e sinalização de ácido jasmônico (JA), ácido abscísico (ABA), do etileno, de GA 2-oxidase foram fortemente aumentadas em plantas de arroz submetidas ao arsenato. Além disso, os genes da biossíntese citocinina e genes de sinalização foram positivamente regulados (aumentaram sua expressão) e que os genes de inativação foram também regulados de maneira positiva por As(V).

Hossain, *et al* (2013) afirma que *a aplicação exógena de ácido salicílico aliviou a toxicidade por arsênio em Arabidopsis thaliana*. Shih-Feng *et al* (2014) ao realizarem um transcriptoma para análise de perfil de genes e caminhos associados a toxicidade do arsênio e tolerância em *Arabidopsis* encontraram genes relacionados com o ABA e principalmente, etileno, *regulados* de maneira positiva em acessos tolerantes Col-0.

Recentemente, novos trabalhos tem demonstrado o envolvimento de ácido jasmônico e seus derivados (Faroq *et al* 2016; Ahmad *et al* 2016; Srivastava *et al* 2015), auxinas (Bucker-Neto *et al* 2017; Bielach *et al* 2017; Wang *et al* 2015), citocininas (Bielach *et al* 2017; Zwack, *et al* 2016; Mohan, *et al* 2016), etileno (Keunen *et al* 2016; Müller & Munné-Bosch 2015; Van de Poel *et al* 2014), ácido abscísico (ABA) (Vishwakarma *et al* 2017; Srivastava *et al* 2015; Danquah *et al* 2014) e ácido salicílico (Chandrakar *et al* 2016; Khan *et al* 2015), em diferentes espécies vegetais, tais como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Brassica juncea*, em resposta a diferentes estresses abióticos.

1.7 Metabolômica e metais pesados

De acordo com Shing *et al.*, (2015), metabolômica busca identificar e quantificar metabólitos de baixo peso molecular nos diferentes organismos, sendo que muitos já foram identificados como sendo envolvidos em estratégias de tolerância a metais

pesados em plantas, muitos destes relacionados ao metabolismo do carbono, enxofre e nitrogênio como por exemplo: ácidos orgânicos, malato, citrato e oxalato podem transportar metais através do xilema; aminoácidos e seus derivados foram relacionados a mecanismos de tolerância a metais pesados.

Alguns desses metabólitos já identificados em plantas em resposta a metais podem estar envolvidos em sequestro de íons em vacúolos (Shing *et al.*, 2015; Kerkeb & Krämer 2003). Os metabólitos são os produtos finais dos processos regulatórios celulares e seus níveis podem ser considerado como a resposta final dos sistemas biológicos a aspectos genéticos ou mudanças ambientais (Králová *et al.*, 2012).

Abordagens analíticas recentes de alta sensibilidade, como ICP-MS, QqQ-TOF-MS ou GC-TOF-MS e a integração dessas técnicas fornece resultados com alto valor agregado, representando um novo ângulo para avaliar a resposta de plantas sobre diferentes estresses ocasionados por metais pesados. (Ariza *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

Ciente de que desastres ambientais oriundos de atividades antrópicas como a mineração tem se tornado cada vez mais frequentes, trazendo inúmeros danos ao meio ambiente, especialmente, contaminando lençóis freáticos e leitos de rios, ou até mesmo ganhando maiores proporções como ocorrido recentemente na bacia do Rio Doce, chegando a lama tóxica a contaminar inclusive ecossistemas marinhos, cada vez mais se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias capazes de auxiliar na imobilização e/ou remoção destes poluentes, de uma forma mais sustentável possível. Assim, a fitorremediação vem ganhando a cada dia mais espaço dentre as tecnologias alternativas sustentáveis.

A busca pelo conhecimento de organismos capazes de remover e acumular poluentes, bem como mecanismos eficientes na realização destas tarefas requer o uso de múltiplas estratégias de abordagens, incluindo fisiologia, bioquímica, biologia molecular, bioinformática e ômicas. Diante do exposto, pareceu ser promissor o estudo sobre a disponibilidade de enxofre para plantas de *E. crassipes*, frequentemente utilizada em estudos com metais pesados, com ampla distribuição geográfica, em busca de compreender melhor os mecanismos de toxicidade e tolerância ao estresse ocasionado pela exposição ao arsênio, analisando diferentes estratégias de percepção, defesa e tolerância ao metal em condições de reabastecimento de enxofre diferenciadas.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da suplementação de enxofre sobre o acúmulo de tióis buscando determinar um nível de S que confira maior acúmulo dessas moléculas em *E. crassipes* permitindo uma maior eficiência na remoção de arsênio;

- Identificar metabólitos e vias metabólicas relacionadas ao enxofre a ao stress por arsênio em plantas submetidas a diferentes concentrações de enxofre, buscando analisar possíveis alterações no metabolismo primário e secundário em folhas de *E. crassipes*;

- Avaliar mudanças na fisiologia de folhas de *E. crassipes* que auxiliem na compressão dos mecanismos que permitem acumular arsênio em condições de oferta diferenciada de enxofre e possíveis mecanismos de tolerância ao metal;

- Investigar a participação de hormônios vegetais ácido abscísico, jasmonatos, ácido salicílico, auxinas e etileno na percepção e resposta ao stress em *E. crassipes*.

3. REFERÊNCIAS

ALVARADO S.; GUÉDEZ M.; MARCÓ P. LUÉ-MERÚ, G.; NELSON A. A.; ARROYO C. J.; ZÁRAY G. (2008). Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). *Bioresource Technology* 99- 8436–8440

ANDRADE HM; OLIVEIRA JA; NETTO, JL; CAMBRAIA J & FARNESE FS (2012). Does nitric oxide activate antioxidant enzymes in plants exposed to arsenic?. *Proceedings of the ICCB - Cell Biology*, v. 1, p. 91-94,

ARAÚJO SHC (2011). Tolerância de *Brassica juncea* ao arsênio e seu potencial para a fitoestabilização de solos contaminados. Dissertação de Mestrado. TEDE UFV.

ARAÚJO W. L., TOHGE T., ISHIZAKI K., LEAVER C. J. & FERNIE A. R. (2011). Protein degradation an alternative respiratory substrate for stressed plants. *TrendsPlantSci.* 16, 489–498.

BONANNO G. & GIUDICE R. L. (2010). Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. *ECOL INDIC* , vol. 10, no. 3, pp. 639-645, 2010

BORBA RP, FIGUEIREDO BR, RAWLLINS BG, MATCHULLAT J. (2000). Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais State, Brasil. *Rev. Brasil. de Geoc.*30: 554-557.

CAO X., MA L.Q. & TUB C. (2004). Antioxidative responses to arsenic in the arsenic hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environ.Pollut.* 128, 317–325.

CHEN YAHUA; SHEN ZHENGUO & LI XIANGDONE (2004). The use of Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. Applied geochemistry, Oct. 2004, v. 19, no. 10, p. 1553-1565.

DAR S.H.; KUMAWAT D.M.; SINGH N. & WANI K.A., (2011). Sewage treatment potential of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), Res. J. Environ. Sci., 5(4), 377-385.

DUMAN F., OZTURK F., & AYDIN Z. (2010). Biological responses of duckweed (*Lemna minor* L.) exposed to their organic arsenic species As(III) and As(V): effects of concentration and duration of exposure. Ecotoxicology 19, 983–993.

DWIVEDI S., TRIPATHI R. D., TRIPATHI P., KUMAR A., DAVE R., MISHRA S., SINGH R., SHARMA D., RAI U. N., CHAKRABARTY D., TRIVEDI P. K., ADHIKARI B., BAG M. K., DHANKHER O. P & TULI R.(2010). Arsenate exposure affects aminoacids, mineral nutrient status and antioxidants in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Environ. Sci.Technol. 44, 9542–9549.

FARNESE FS; OLIVEIRA J. A.; LIMA F. S. ; LEÃO G. A. ; GUSMAN G. S. ; SILVA L. C. (2014). Evaluation of the potential of *Pistia stratiotes* L. (water lettuce) for bioindication and phytoremediation of aquatic environments contaminated with arsenic. Brazilian Journal of Biology - v. 74,4, p. 25-31.

FARNESE FS; OLIVEIRA JA; GUSMAN, GS; LEÃO GA.; RIBEIRO, C.; SIMAN, LI.; CAMBRAIA, J. (2013). Plant Responses to Arsenic: the Role of Nitric Oxide. Water, Air and Soil Pollution. v. 224, p. 1660-1667.

FINNEGAN P. M. & CHEN W. (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. Frontiers in physiology. v. 3.

FOYER C. H. & NOCTOR G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. PlantPhysiol. 155, 2–18.

GUSMAN, G. S.; OLIVEIRA, J.A.O.; FARNESE, F.S. & CAMBRAIA J. (2012). Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. v. 35

HOSSAIN, M. A., HASANUZZAMAN, M. & FUJITA, M. (2010). “Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress.” *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 16, no. 3, pp. 259–272.

HUANG TSAI-LIEN; THI QUYNH; NGUYEN THUY; FU SHIH-FENG; LIN CHUNG-YI; CHEN YING-CHIH & HUANG HAO-JEN (2012). Transcriptomic changes and signalling pathways induced by arsenic stress in rice roots. *Plant Mol Biol* (80) 587-608.

IQBAL N.; M.; ASIM MASOOD M.; IQBAL R. K.; MOHD A.; FATMA M. & KHAN N. A. (2013). Cross-talk between sulfur assimilation and ethylene signaling in plants. **Plant Signal Behav. Jan 1, 2013; 8(1)**

JAMUNA, S. & NOORJAHAN, C.M., (2009). Treatment of sewage waste water using water hyacinth - *Eichhornia sp* and its reuse for fish culture., *Toxicol. Int.*, 16(2), 103-106.

JAYAWEERA, M.W., KASTURIARACHCHI, J.C., KULARATNE, R.K., WIJEYEKOON, S.L. (2008). Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands. *J. Environ. Manage.* 87 (3), 450–460.

JAYAWEERA, M.W., KASTURIARACHCHI, J.C., KULARATNE, R.K., WIJEYEKOON, S.L. (2007). Removal of aluminium by constructed wetlands with water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutritional conditions. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 42 (2), 185–193.

KHELLAF, N., ZERDAOUI, M., (2009). Growth response of *Lemna gibba* L. (duckweed) to copper and nickel phytoaccumulation. *Water Sci. Technol*

KHAN I., AHMAD A. & IQBAL, M. (2009). Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicol. Environ.Saf.* 72, 626–634.

LEÃO G. A.; OLIVEIRA, J. A.; FARNESE F. S.; GUSMAN G. S.; FELIPE, R T A. (2014). Sulfur metabolism: Different tolerances of two aquatic macrophytes exposed to arsenic. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* v. 105, p. 36-42.

LU Q., HE Z.L., GRAETZ D.A., STOFFELLA P.J. & YANG, X., (2011). Uptake and distribution of metals by water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), *Environ. Sci. Poll. Res.*, 18, 978-986.

MISBAHUDDIN M & FARIDUDDIN A.(2002) Water hyacinth removes arsenic from arsenic-contaminated drinking water. *Arch Environ Health.* Nov-Dec;57(6):516-8.

MODENES A.N., ESPINOZA-QUINONES, F.R., BORBA C.E., TRIGUEROS, D.E., LAVARDA, F.L., ABUGDERAH, M.M. & KROUMOV, A.D., (2011). Adsorption of Zn(II) and Cd(II) ions in batch system by using the *Eichhornia crassipes*. *Water Sci. Technol* 64 (9), 1857–1863.

MOORE S. A., MOENNICH D. M. & GRESSER, M. J.(1983).Synthesis and hydrolysis of ADP-arsenate by beef heart sub mitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 258, 6266–6271.

MUÑOZ-BERTOMEU J., CASCALES-MIÑANA B., MULET J. M., BAROJA-FERNÁNDEZ E., POZUETA-ROMERO J., KUHN, J. M., SEGURA J. & ROS R.(2009). Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and aminoacid balance in *Arabidopsis*. *PlantPhysiol.* 151, 541–558.

NOCTOR, GRAHAM; MHAMDI, AMNA; CHAOUCH, SEJIR; HAN, YI; NEUKERMANS, JENNY; MARQUEZ-GARCIA, BELEN; QUEVAL, GUILLAUME;

FOYER, CHRISTINE H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*. v. 35. P.454-484.

PEREIRA, F. J. (2010). Características anatômica e morfológicas do aguapé e índice de fitorremediação de alface d'água cultivados na presença de arsênio, cádmio e chumbo. Tese Universidade Federal de Lavras. pp. 117.

PRIYA E.S. & SELVAN P.S. (2014). Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) – An efficient and economic adsorbent for textile effluent treatment – A review. *Arabian Journal of Chemistry*.

RAAB A., SCHAT H., MEHARG A. A. & FELDMANN J. (2005). Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sun flower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic–phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *NewPhytol.* 168, 551–558.

RASCIO, NICOLETTA & NAVARI-IZZO, FLÁVIA. (2011) “Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?” *Plant Science*, vol. 180, no. 2, pp. 169–181, 2011.

REDDY, K.R. & SUTTON, D.L., (1984). Water hyacinths for water quality improvement and biomass production., *J. Environ. Qual.*, 13(1), 1-9.

REID; R., GRIDLEY K., KAWAMATA Y. & ZHU, YONGGUAN (2013). Arsenite elicits anomalous sulfur starvation responses in barley. *Plant Physiology*, 162(1), 401–9.

ROONGTANAKIAT, N. (2009). Vetiver phytoremediation for heavy metal decontamination. Pacific Rim Vetiver Network, Bangkok, Thailand.

ROTHER M, KRAUSS G.J, GRASS G, WESENBERG D. (2008). Sulphate assimilation under Cd²⁺ stress in *Physcomitrella patens*—combined transcript, enzyme and metabolite profiling. *Plant, Cell and Environment*. v.29:1801-1811.

SAKAI Y.; WATANABE T.; WASAKI J.; SENOURA T.; SHINANO T.; OSAKI M.(2010). Influence of arsenic stress on synthesis and localization of low-molecular-weight thiols in *Pteris vittata*. Environmental Pollution. v 158 (12) .

SASMAZ A.; OBEK E. & HASAR H. (2008). The accumulation of heavy metals in *Typha latifolia* L. Grown in a stream carrying secondary effluent. Ecol. Eng. 33, 278–284.

SOUTHICHAK B.; NAKANO K.; NOMURA M & CHIBA N.(2006). *Phragmites australis* : A novel bioabsorbent for the removal of heavy metals from aqueous solution. Water Research 40: 2295–2302.

SRIVASTAVA M., MA L. Q.,SINGH N. & SINGH S. (2005). Antioxidant responses of hyperaccumulator and sensitive fern species to arsenic. J. Exp.Bot. 56, 1335–1342.

SRIVASTAVA S., MISHRA S., TRIPATHI R.D., DWIVEDI S., TRIVEDI, P.K., TANDON P.K. (2007). Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and rsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. Environ.Sci.Technol.41, 2930–2936.

SRIVASTAVA S, SRIVASTAVA A. K, SUPRASANNA P, D’SOUZA S. F (2009) Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. J Exp Bot 60:3419–3431

SRIVASTAVA, SUDHAKAR & D’SOUZA, S.F. (2010). Effect of variable sulfur supply on arsenic tolerance and antioxidant responses in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle . Ecotoxicology and Environmental Safety 73 1314–1322

SRIVASTAVA S, SUPRASANNA P, D’SOUZA S. F (2012). Mechanisms of arsenic tolerance and detoxification in plants and their application in transgenic technology: a critical appraisal. Int J Phytoremed 14:506–517.

SCHMÖGER M., OVEN M. & GRILL E.(2000). Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants. *Plant Physiol.* 122, 793–801.

SEKOMO, C.B., KAGISHA, V., ROUSSEAU, D., LENS, P., (2012). Heavy metal removal by combining anaerobic upflow packed bed reactors with water hyacinth ponds. *Environ. Technol.* 33 (10–12), 1455–1464.

SINGH N., MA L. Q., SRIVASTAVA M. & RATHINASABAPATHI B. (2006). Metabolic adaptations to arsenic induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *PlantSci.* 170, 274–282.

VALIPOU, A.; RAMAN V.K. & GHOLE, V.S. (2011). Phytoremediation of domestic wastewater using *Eichhornia crassipes.*, *J. Environ. Sci. Eng.*, 53(2), 183-190.

VILLIERS, FLORENT; DUCRUIX, CÉLINE; HUGOUVIEUX, VÉRONIQUE; JARNO, NOLWENN; EZAN, ERIC; GARIN, JÉRÔME; JUNOT, CHRISTOPHE & BOURGUIGNON, JACQUES. (2011). Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics*, vol. 11, no. 9, pp. 1650–1663.

WATANABE T.; KOUHO R.; KATAYOSE T.; KITAJIMA N.; SAKAMOTO N.;YAMAGUCHI N.; SHINANO T.; YURIMOTO H. & OSAKI M. (2014). Arsenic alters uptake and distribution of sulphur in *Pteris vittata*. *Plant, cell & environment.* v. 37 (1).

WEI SHUHE; MA LENA Q; SAHA UTTAM; MATHEWS SHINY; SUNDARAM SABARINATH; RATHINASABAPATHI BALA & ZHOU, QIXING (2010). Sulfate and glutathione enhanced arsenic accumulation by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental pollution.* v 158.

YONG-GUAN ZHU & ROSEN B.P. (2009). Perspectives for genetic engineering for the phytoremediation of arsenic-contaminated environments: from imagination to reality? *Current Opinion in Biotechnology* . Volume 20, Issue 2. Pages 220–224

ZHAO F. J., WANG J. R., BARKER, J. H. A., SCHAT H., BLEEKER P. M. & MCGRATH S. P.(2003). The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *NewPhytol.* 159, 403–410.

CAPÍTULO 1

METABOLOMA REVELA MÚLTIPLAS ESTRATÉGIAS DE DEFESA EM FOLHAS DE *E. crassipes* (Mart) Solms SUBMETIDAS A OFERTA DIFERENCIADA DE ENXOFRE E ARSÊNIO

RESUMO

Plantas de *Eichhornia crassipes* foram submetidas a uma fome prévia de enxofre e um posterior reabastecimento de sulfato, quando foram então estressadas por arsenato. O objetivo foi avaliar os efeitos da disponibilidade diferencial de enxofre, sobre a acumulação de metabólitos, buscando identificar novos biomarcadores de stress, avaliando a interconexão de respostas entre o metabolismo primário e secundário em folhas de aguapé, em busca de estratégias mais eficientes para a fitorremediação e tolerância ao metal. Plantas foram aclimatadas em solução nutritiva de Clarck por 7(sete) dias, contendo 1/4 da força iônica, com baixa disponibilidade de enxofre no meio ($2,5\mu\text{M SO}_4^{-2}$), trocada a cada 48h. O MgCl_2 foi usado como fonte de magnésio em detrimento do MgSO_4 . Após esse período, foram transferidas para frascos de vidro contendo diferentes concentrações de enxofre em solução. No primeiro tratamento, $2,5\mu\text{M SO}_4^{-2}$ (LS) foram adicionados, já no segundo e terceiros, $200\mu\text{M SO}_4^{-2}$ (NS) e $600\mu\text{M SO}_4^{-2}$ (HS) respectivamente. A esses tratamentos foram adicionados $8\mu\text{M}$ de arsenato (As(V)) por 24h, onde posteriormente o material foi coletado, e as análises processadas com auxílio de espectrometria de massas. Foram identificados 246 metabólitos inicialmente, que após a cromatografia com espectro, filtragem dos dados e normalizações, restaram 111 metabólitos significativos. Arsenato e a oferta diferenciada de enxofre induziram a uma reprogramação metabólica intensa em folhas de aguapé. A análise de vias metabólicas afetadas mostra a complexidade de respostas e o papel fundamental que o metabolismo de aminoácidos, da glutatona e do ciclo do

glioxilato tem na resposta ao estresse promovido pelo metal, atingindo em cheio o metabolismo energético, seja por alterações na fixação do carbono, seja pelo impacto gerado sobre o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Após o reabastecimento de enxofre, plantas translocaram a maior parte do enxofre absorvido e do metal para a parte aérea, sendo que a acumulação foi maior em folhas crescendo em meio HS. Danos irreversíveis ao aparato respiratório e membranas celulares confirmam que a maior oferta de enxofre em solução promove uma menor amplitude de danos celulares relacionados a morte celular. O acúmulo de ácidos graxos saturados indica uma alteração na permeabilidade de membranas celulares, sendo uma resposta imediata ao metal, assim como acúmulo de solutos compatíveis, como açúcares. Além disso, diferentes grupos de metabólitos secundários respondem diferencialmente ao enxofre e arsênio, ajudando a compreender a reprogramação metabólica em folhas de aguapé.

Palavras-chave: Metabolômica, enxofre, arsênio, fitorremediação, estresse e sinalização celular.

METABOLOME REVEALS MULTIPLES DEFENSE STRATEGIES IN LEAVES OF *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms DUE TO THE DIFFERENTIATED SUPPLY OF SULFUR AND ARSENIC.

Abstract

Eichhornia crassipes (water hyacinth) plants were submitted to a previous sulfur starvation and a subsequent refueling of sulfate, when they were then stressed by arsenate. The objective was to evaluate the effects of differential supply of sulfur on the accumulation of metabolites, seeking to identify new stress biomarkers, evaluating the interconnection of responses between primary and secondary metabolism in leaves of water hyacinth, in search of more efficient strategies for phytoremediation and metal tolerance. Plants were acclimated in nutrient solution of Clark for seven days, containing 1/4 of the ionic strength, with low availability of sulfur in the medium ($2.5\mu\text{M SO}_4^{-2}$), changed every 48h. MgCl_2 was used as a source of magnesium over MgSO_4 . After that period, they were transferred to glass vials containing different concentrations of sulfur in solution. In the first treatment, $2.5\mu\text{M SO}_4^{-2}$ (LS) were added, already in the second and third, $200\mu\text{M SO}_4^{-2}$ (NS) and $600\mu\text{M SO}_4^{-2}$ (HS), respectively. To these treatments were added $8\mu\text{M}$ of arsenate (As (V)) for 24h, where

the material was subsequently collected, and the analyzes processed with the help of mass spectrometry. We identified 246 metabolites initially, which after spectrum chromatographic, filtering the data and normalizations, restore 111 significant metabolites. Arsenate and the differentiated supply of sulfur induced intense metabolic reprogramming in leaves of water hyacinth. The analysis of the affected metabolic pathways shows the complexity of responses and the fundamental role that the metabolism of amino acids, glutathione and the glyoxylate cycle has in the response to the stress promoted by the metal, reaching the energetic metabolism in full, either by alterations in the fixation of the carbon, or by the impact generated on the tricarboxylic acid (TCA) cycle. After sulfur replenishment, plants translocated most of the absorbed sulfur and metal to the aerial part, and accumulation was higher in leaves growing on HS medium. Irreversible damage to the respiratory tract and cell membranes confirm that the increased supply of sulfur in solution promotes a lower amplitude of cell damage related to cell death. The accumulation of saturated fatty acids indicates a change in the permeability of cell membranes, being an immediate response to the metal, as well as accumulation of compatible solutes such as sugars. In addition, different groups of secondary metabolites respond differentially to sulfur and arsenic, helping to understand the metabolic reprogramming in leaves of water hyacinth.

Key Works:Metabolomic, Sulphur, arsenic, phytoremediation, watter hyacinth, stress and cell signalling,

1. INTRODUÇÃO

O metabolismo fornece os blocos de construção e equivalentes de energia para processos biológicos fundamentais como crescimento celular, diferenciação celular e adaptação ambiental. O metabolismo também está incorporado na maquinaria de detecção e sinalização, integrando informações transmitidas a partir do ambiente (Helms *et al* 2015).

A metabolômica é considerada como sendo uma ferramenta poderosa, capaz de realizar de maneira robusta a exploração das alterações na abundância de metabólitos e das vias metabólicas que estão envolvidas em várias condições fisiopatológicas e oferece a possibilidade de se avaliar as interações genótipo-fenótipo e genótipo-ambiente (Bo Peng *et al.* 2015; Kumar *et al* 2014). O metaboloma pode ser uma

medida muito sensível do fenótipo de um organismo porque os metabolitos são os produtos finais de interações gigantes em todo o genoma ou em todo o proteoma (Bo Peng *et al* 2015).

Normalmente, a descoberta metabolômica é abordada para identificar biomarcadores para melhorar o diagnóstico precoce, prognóstico preciso e auxiliar o monitoramento adequado de mudanças fisiológicas em resposta a alterações ambientais (Gibbons *et al*, 2015). Wang *et al* (2015) destaca pesquisas com abordagens metabolômicas que avançaram na avaliação de respostas fisiológicas a diversos estresses em plantas, tal como Nikiforova *et al* (2005) que avaliaram a reprogramação metabólica de *Arabidopsis thaliana* sob condições de restrição de enxofre.

Contudo, pesquisas relevantes que envolvam o uso de abordagens moleculares envolvendo macrófitas aquáticas e fitorremediação de metais pesados ainda é muito escasso (Li *et al* 2015). *Eichhornia crassipes*, é uma macrófita aquática perene, de rápido crescimento e de proliferação livre e flutuante, amplamente distribuída (Priya & Selvan 2017). Pesquisas tem demonstrado que está espécie apresenta altas taxas de remoção para vários materiais corantes de indústrias têxteis e de metais pesados como o cobre (Cu) , cromo (Cr) , cádmio (Cd) , manganês (Mn) , o mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e arsênio (As) a partir de soluções aquosas (Priya & Selvan 2017; Ibrahim *et al.*, 2012; Sekomo *et al*, 2012; Andrade *et al* 2012; Módenes *et al* 2013; Jayaweera *et al.*, 2008; Jayaweera *et al* 2007).

A presença de arsênio no solo e na água é uma ameaça constante em muitas regiões do mundo a homeostase de organismos vivos. Em muitos lugares, as águas contaminadas por arsênio são comumente utilizadas para consumo humano direto, ou essa contaminação advém do consumo de rebanho bovino alimentado em áreas de pastagens contaminadas e a irrigação de diferentes culturas, principalmente o arroz. (Kumar *et al*, 2014; Moore *et al*, 2010).

Leão *et al* (2014) ao avaliar os mecanismos de respostas a toxidez do arsênio em duas macrófitas aquáticas, *Salvinia mínima* e *Lemna gibba*, atribui a maior tolerância a acumulação de peróxidos ao seu sistema de defesa ser provavelmente baseado na absorção, assimilação e metabolismo de sulfato, com aumento da atividade da adenosina-5'-trifosfato (ATP) sulfilase (a primeira enzima da via de assimilação de sulfato inorgânico) após a exposição a As, acumulando glutatona e tióis não protéicos, com maior atividade enzimática de γ -glutamylcisteína sintetase, glutatona S-transferase e glutatona redutase. Giri & Patel (2012) relataram a eficiência de *E. crassipes* na

fitorremediação de arsênio em condições hidropônicas. Vestana *et al.* (2007) observou que *E. crassipes* tratadas com enxofre foram capazes de acumular mais cádmio em suas folhas.

Com auxílio de espectrometria de massas e bioinformática, buscamos contribuir para a compreensão das alterações metabólicas decorrentes do estresse por arsenato e dos efeitos do reabastecimento de enxofre, identificando metabólitos e vias metabólicas alteradas. A maior oferta de enxofre permite uma reprogramação metabólica em folhas de *Eichhornia crassipes* mais adequada para perceber e enfrentar os danos oriundos do stress oxidativo ocasionado pelo arsênio (Andrade *et al* 2016; Leão *et al* 2014), permitindo também um melhor desempenho quanto a fitorremediação do metal. Tais abordagens auxiliam na compreensão maior à cerca dos mecanismos de defesa, tolerância e acumulação de arsênio em macrófitas com potencial para a fitorremediação de áreas contaminadas por arsênio, além de identificar metabólitos com possíveis aplicações em outras áreas do conhecimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do Material Vegetal

As plantas aquáticas da espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, foram coletadas na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa (MG – Brasil) e mantidas por 24 horas em água desionizada, esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% durante 1 min, sendo então lavados em água corrente e água destilada. Em seguida, as plantas foram transferidas para recipientes de polietileno, com solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), pH 6,5, e colocadas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $230 \mu\text{mol f\u00f4tons s}^{-1} \text{m}^{-2}$), sob fotoper\u00edodo de 16 horas, onde permaneceram por tr\u00eas dias. Ap\u00f3s o per\u00edodo de aclima\u00e7\u00e3o, as plantas foram selecionadas de acordo com a massa fresca, uniformidade de tamanho e n\u00famero de folhas (2 a 3 folhas expandidas), sendo posteriormente mantidas em caixas de pl\u00e1sticos sob aera\u00e7\u00e3o em solu\u00e7\u00e3o nutritiva de Clark, pH 6,5 conforme o pr\u00e9-tratamento.

2.2 Pr\u00e9-Tratamento do Material Vegetal

Plantas foram pr\u00e9-tratadas por 6 dias em caixas pl\u00e1sticas aeradas contendo solu\u00e7\u00e3o nutritiva de Clark com 1/4 da for\u00e7a i\u00f4nica, com baixa disponibilidade de

enxofre no meio ($2,5\mu\text{M SO}_4^{-2}$), trocada a cada 48h. O MgCl_2 foi usado como fonte de magnésio em detrimento do MgSO_4 .

2.3 A Aplicação do stress por Arsênio

Após o pré-tratamento, plantas foram transferidas, individualmente, para frascos de vidro, contendo 500ml de solução nutritiva de Clark $\frac{1}{4}$ força. Os tratamentos contendo doses distintas de enxofre foram os seguintes: Tratamento com baixa disponibilidade de enxofre (LS); tratamento com enxofre disponível (NS); tratamento com alta disponibilidade de enxofre (HS). Em cada um destes tratamentos, quatro (4) repetições contendo $8,0\ \mu\text{M}$ de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (LS+As; NS+As; HS+As), e 4 repetições controle para cada um dos tratamentos.

2.4 Determinação dos Teores de Arsênio

Para determinação dos teores de arsênio e enxofre absorvidos, um experimento foi conduzido, coletando-se o material vegetal, lavando-o com HCL para retirar o arsênio adsorvido em folhas e raízes. Estas foram separadas e secas em estufas a 80°C . Após a secagem, o material foi macerado, e aproximadamente 0,1 g de massa seca de raízes e folhas foram submetidos à mineralização úmida com 3 mL de uma mistura nítrico-perclórica 2:1, à temperatura de $100\text{-}130\ ^\circ\text{C}$ até a completa oxidação da matéria orgânica (Allan, 1969). As amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, analisadas por ICP- MS (Departamento de Solos – UFV).

2.5 Determinação dos Teores de Aminoácidos e Proteínas

Para a determinação dos teores de proteínas e aminoácidos, cerca de 100 mg de material vegetal foram coletados e liofilizados por 24hs. Após esse período, o material vegetal foi macerado utilizando um equipamento macerador Tyssue laser e um protocolo para extração etanólica e posterior determinação dos teores de aminoácidos e proteínas realizado de acordo com

2.6 Histoquímica para Avaliar a Estabilidade de Membranas Celulares

Folhas de *E. crassipes* foram imersas em corante Evans Blue (0,25%) por cerca de 6h a temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram fervidas em etanol para remover a clorofila das folhas, facilitando a visualização das regiões demarcadas

pelo Evans Blue. Após a retirada, imagens foram registradas em uma câmara digital (Romero-Puertas *et al.*, 2004).

2.7 Perfil Metabólico

As amostras de folhas (100mg) foram trituradas em nitrogênio líquido e coletadas em eppendorfs de 2,0 mL. Em seguida, de acordo com Lisec *et al.* (2006), foram adicionados 1,5 mL de solução extratora gelada (água 1: metanol 2,5: clorofórmio 1) contendo 60 µL de ribitol (0,2 mg/mL em água ultra-pura) como normalizador interno. As amostras foram agitadas em um vortex por 30 min a 4°C, centrifugadas a 15.000 g por 5 min e o sobrenadante foi coletado para novo tubo. Posteriormente, foram adicionados 750 µL de água ultra-pura ao sobrenadante, seguido de agitação no vortex e centrifugação por 15 min a 15.000 g. Após a centrifugação duas fases foram formadas e 500 µL da fase superior polar foi coletada para um novo tubo. As amostras da fase superior foram fracionadas em volumes de 100 µL e secas em speedvac. A derivatização das amostras foi realizada pela adição de 40µL de piridina (Merck) contendo hidróclorido de metoxiamina (20 mg/mL) (Sigma) submetendo-as a 37°C por 2 h sob agitação. Em seguida, foram adicionados 70 µL da solução de MSTFA (20 µL/mL da mistura padrão do tempo de retenção), previamente preparada seguindo e mantidas a 37°C por 30 min. Finalmente, 100 µL da amostra derivatizada foi transferida para vials específicos do sistema GC-MS.

2.6.1 Análise Qualitativa e Quantitativa dos Metabólitos Extraídos por GC-MS

As amostras foram analisadas utilizando um sistema GC/MS pertencente ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV, com as seguintes especificações: GC Cromatógrafo Agilent, 7890A e Espectrômetro TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar de 30 mm (MDN-35) operando de acordo com Lisec *et al.* (2006). Amostras de 1 µL foram injetadas no modo splitless a 230°C e carreadas pelo fluxo de gás (fluxo contínuo de hélio) de 2 mL/min. A temperatura do forno foi inicialmente mantida constante a 80°C e, em seguida, aumentou-se 15°C/min até alcançar 330°C, sendo essa temperatura mantida durante 5 min.

Os cromatogramas gerados tiveram a linha de base corrigida e alinhada pelo programa ChromaTof (Agilent). Neste processamento foi também gerado uma lista contendo os tempos de retenção cromatográfico dos padrões internos (n-alcenos) utilizados para cálculo dos índices de retenção de cada íon fragmentado. Os espectros de GC/MS foram exportados e os perfis foram analisados automaticamente pelo programa TargetSearch. Este software permitiu a identificação dos metabólitos através da comparação dos espectros obtidos experimentalmente contra um banco de dados espectrais de referência. Um valor mínimo de aceitação (score), correspondente a 600, foi utilizado como ponto de corte permitindo uma maior certeza na identificação dos metabólitos e garantindo uma maior confiabilidade para as futuras análises estatísticas dos dados.

Um script para identificação e quantificação de metabólitos foi gerado e posteriormente analisado no software R com parâmetros de processamento e alinhamento otimizados para a plataforma GC/TOF Agilent. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: massRange (faixa de massas) de 85-500 Da; IntThreshold (intensidade mínima) de 50; TopMasses (10 massas mais intensas) de 10; r thresh (correlação acima) de 0,05. Para a identificação dos metabólitos foi utilizada a biblioteca de fragmentação por impacto eletrônico (EI) e de índices de retenção (RI) geradas pela GMD Mass Spectrum Reference Library (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/download/>).

2.6.2 Análises em bioinformática: MetaboAnalyst

O Metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>) é um servidor online desenhado para permitir a integração, visualização e interpretação de dados metabolômicos. Ele suporta inúmeros cálculos estatísticos complexos e gráficos de alta definição gerando funções que requerem recursos computacionais relevantes. Os dados de saída fornecidos pelo TagSearch foram processados manualmente de acordo com o formato necessário para análise na plataforma Metaboanalyst. As identificações dos metabólitos e suas respectivas variações na abundância relativa foram devidamente tabeladas para serem utilizados como dados de entrada no servidor. Dos 8 módulos disponibilizados pela plataforma, dois foram acessados para a determinação dos principais metabólitos responsivos e das vias metabólicas perturbadas pelo estresse (Statistical Analysis e Pathway Analysis).

2.8 Determinação dos Teores de Cisteínas e Glutathiona Total

Com intuito de complementar a análise de metabólitos em folhas de *E. crassipes*, cerca de 150mg de material fresco de folhas e raízes foram trituradas em nitrogênio líquido para rompimento do material vegetal. Em seguida foram adicionados 400 µL de uma solução extratora (metanol 20% - Isopropanol 79% - ácido acético 1%) em 150 mg de material vegetal. Nessa etapa, foi adicionado ácido naftaleno acético (NAA) como normalizador interno na concentração de 50 ng/g. Cada amostra foi vortexada 4 vezes por 20 seg, mantendo-as no gelo, e sonicadas em ultrassom por 5 min a 4°C. As amostras foram deixadas no gelo por 30 min e sonicadas em ultrassom por 5 min e centrifugadas 14.000 g por 30 min a 4°C para que os restos celulares se sedimentassem.

Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos. Um novo ciclo de extração foi realizado com o precipitado da extração anterior para maximizar a eficiência de extração. As amostras contendo tióis extraídos foram utilizadas para análise por LC/MS do tipo UHPLC QqQ.

2.9 Monitoramento e Quantificações de Tióis por LC/MS/QqQ

Aproximadamente 300 µL das amostras extraídas foram colocadas em vials e 5,0 µL dos extratos foram injetados no sistema LC/MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV. Utilizou-se a coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,3 mL/min, acoplada online a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (Agilent). O espectrômetro de massa operou alternando o modo positivo e negativo de acordo com tempo de retenção para cada tiol e escaneou a amostra no modo MRM (multiple reaction monitoring) para detecção, como mostrado na Tabela 1. Os ensaios foram realizados para quatro réplicas biológicas para cada tratamento. Os espectros de massas gerados foram processados utilizando o software MassHunter para obtenção dos cromatogramas extraído (XIC) de cada transição e para obtenção dos valores de área como indicativo da abundância de cada metabólito. Uma curva padrão de cada tiol foi utilizada para converter os valores de área em quantidade massas em ng/g de tecido vegetal.

Tabela 1. Lista das transições utilizadas na análise por MRM para o monitoramento e quantificação de tióis. São mostrados a massa do íon molecular (MS1) e o fragmento analisado no MS2 no espectrômetro QqQ.

Metabolitos (Tióis)	MS1	MS2
Cisteína (Cys)	122	58
Glutaciona reduzida (GSH)*	308	76
Glutaciona Oxidada (GSSH)	613	355

*A glutaciona total foi obtida pela equação: $GSH_{total} = GSH + GSSH$

2.10 Respiração

A respiração noturna (RN), ou taxa de assimilação líquida de CO₂ noturna foi avaliada após a aplicação do estresse, durante o fotoperíodo de escuro, utilizando-se um analisador de gases infravermelho (LICOR 6400, Li-Cor Inc., Nebraska-EUA. A respiração mitocondrial diurna (RD) foi estimada a partir de (RN), usando o Q₁₀ (Larcher, 1983), de acordo com Bai *et al.* (2008).

$$RD = RNQ_{10} (T_d - T_n)/10$$

Onde: Q₁₀ = 2,2 ; T_n = temperatura foliar no qual RN foi calculada; T_d = temperatura foliar na qual RD foi calculada;.

2.11 Delineamento experimental e análises estatísticas de dados de perfil metabólico

Os dados foram filtrados em função do desvio padrão com o objetivo de identificar e remover variáveis que provavelmente não seriam úteis ao modelar os dados, removendo possíveis ruídos de linha de base. Nenhuma informação de fenótipo é usada no processo de filtragem, portanto, o resultado pode ser usado com qualquer análise a *downstream*. Os dados foram normalizados pela massa e mediana.

Após a normalização, os dados foram submetidos a uma análise de variância (One-Way ANOVA) e um teste HSD de Tukey. Desta forma, os dados significativos foram então submetidos a uma análise de Clusters, onde o agrupamento hierárquico (aglomerativo) começa com cada amostra considerada como cluster separado e, em seguida, prossegue combinando-as até que todas as amostras pertençam a um cluster. A medida de dissimilaridade utilizada foi a Distância Euclideana e o método de Ward para o agrupamento. O resultado foi apresentado sob a forma de um *heat map*, agrupando as

características e tratamentos. Para facilitar a compreensão dos resultados e otimização de espaço, serão apresentados os resultados dos 60 metabólitos mais significativos e o heat map mostrando a média dos metabólitos por tratamento, ao invés de repetições.

Uma análise de componentes principais (PCA) e análises discriminantes de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram realizados. PCA é um método não supervisionado com o objetivo de encontrar as direções de variação máxima em um conjunto de dados (X) sem se referir aos rótulos de classe (Y). PLS-DA é um método supervisionado que usa técnica de regressão linear múltipla para encontrar a direção da covariância máxima entre um conjunto de dados (X) e a associação da classe (Y). Para ambos os métodos, as variáveis originais são resumidas em muito menos variáveis usando suas médias ponderadas. Além da PLS-DA, uma análise de variáveis importantes na projeção (VIP). Os valores de Importância Variável em Projeção (VIP) estimam a importância de cada variável na projeção usada em um modelo PLS. Foram consideradas variáveis com pontuação VIP superior a 1.

Os metabólitos foram também submetidos à análise de vias metabólicas utilizando o comando Pathway Analysis e a biblioteca de *Arabidopsis thaliana* (thale cress). Para a análise de interpretação funcional dos metabólitos encontrados, foi utilizado uma análise de enriquecimento de vias metabólicas afetadas. Todas as análises estatísticas do metaboloma foram processadas utilizando-se o Software MetaboAnalyst 3.0, seguindo a metodologia de bioinformática proposta por Xia & Wishart (2016). Para os demais parâmetros analisados, foi realizado uma ANOVA seguida por um teste de Tukey a 5% utilizando-se o Software SAS System 13.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Absorção, assimilação, transporte de enxofre em *E. crassipes* e fitorremediação do arsênio

Reconhecidamente um macronutriente essencial, o enxofre (S) desempenha um papel vital na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (Ernst, 1998). Além disso, os grupos tiol de cisteína (Cys) e glutathiona (GSH) são frequentemente envolvidos em ciclos redox. A toxicidade de arsênio é devido à sua propensão para se ligar a grupos de sulfidrilo e conseqüentemente, sendo prejudicial para o funcionamento geral de proteínas. Com o intuito de auxiliar na compreensão da dinâmica metabólica de folhas de *E. crassipes*, a figura 1 ilustra os teores de enxofre e arsênio encontrados em folhas de *E. crassipes* estressadas por arsênio, sob diferentes condições de oferta de

enxofre. Na ausência de As, os teores de enxofre em folhas de *E. crassipes* obtidas em meio LS foram superiores aos encontrados em meio NS, sendo que não diferiram estatisticamente daquelas em meio HS (Figura 1A).

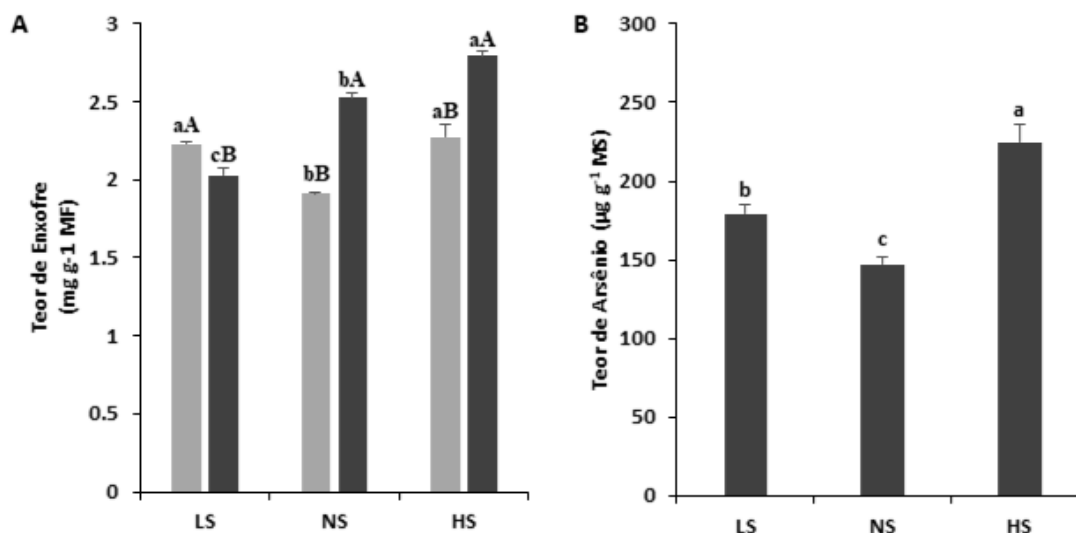


Figura 1 – Teores de Enxofre e Arsênio em folhas de *Eichhornia crassipes*- *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio (**cinza claro**) e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo 8µM de arsênio (**cinza escuro**) não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Entretanto, na presença do metal, folhas obtidas de plantas que cresceram em meio LS+As apresentam teores inferiores aqueles encontrados na ausência de arsênio, assim como, inferiores aos teores encontrados em folhas no meio NS+As e HS+As. Em meio HS +As, os teores de enxofre foram superiores aos demais. Os teores de arsênio (Figura 1B) foram mais elevados em HS+As do que os demais, assim como o enxofre.

Da mesma forma que o enxofre, em meio LS, os teores de arsênio foram inferiores aqueles encontrados em meio HS+As e superiores ao encontrado em meio NS+AS. Desta forma, é possível que o arsênio esteja sendo translocado para a parte aérea, concomitantemente em proporções equivalentes ao enxofre translocado em meio HS+As, permitindo um maior acúmulo de arsênio, mediante uma maior disponibilidade de enxofre no meio. Cabe ainda ressaltar que os teores de enxofre em raízes foram reduzidos na presença do metal (Figura suplementar S1.1) As concentrações de arsênio encontrados em folhas de *E. crassipes* após 24h foram muito superiores aos observados em suas raízes, demonstrando que a translocação de arsênio para a parte aérea foi bastante elevada (Figura suplementar S1.2).

3.2- Arsenato e a oferta de enxofre induzem a uma intensa reprogramação metabólica diferenciada em folhas de *E. crassipes*

A análise metabolômica permite descrever quais são os metabólitos presentes em um organismo e suas concentrações, relativas e absolutas, de acordo com o ambiente em que ele se encontra, de forma a obter informações sobre os processos metabólicos ativos. Métodos de análise multivariada são muito utilizados na análise exploratória de dados de metabolômica. De um total de 247 metabólitos identificados, após uma filtragem inicial dos dados e posterior normalização (Suplemento S2.1), foram submetidos a uma One-way ANOVA, que forneceu uma visão preliminar sobre características potencialmente significativas, seguida de uma análise *pos-hoc* com o objetivo de determinar quais grupos nessa amostra diferem significativamente. Dos 247 metabólitos iniciais, 111 metabólitos se destacaram e estão devidamente identificados na tabela S3.1 (Suplemento S3.1). Desta forma, a figura 2A representa o resultado da análise de variância mostrando a distribuição dos metabólitos significativos identificados ($p < 0,05$). Nela estão identificados nominalmente os metabólitos mais significativos, dos quais, três são aminoácidos. Além destes, metionina, valina, alanina, ornitina, GABA, glutamina, asparagina, lisina e glutamato foram identificados.

Não foi possível detectar o aminoácido cisteína. Apenas formas conjugadas, como S-Metil-Cisteína, N-AcetilCisteína e Ácido Sulfínico conjugado com cisteína foram detectados por GC-MS. Beta-Alanina, Isoleucina e Leucina foram os aminoácidos mais significativos, e suas intensidades estão demonstradas nas figuras 2B, 2C e 2F. Em todos os casos nas figuras, os aminoácidos reduziram-se na presença do metal. Nas figuras 2D e 2E, ácido isocítrico e ácido quínico completam os cinco primeiros metabólitos.

Tendo em vista que dentre os metabólitos mais significativos estão aminoácidos, e que estes, à primeira vista, de acordo com os resultados apresentados nas figuras 4B-4C, possuem respostas diferenciadas em relação ao metal, a figura 3 traz um panorama mais amplo sobre o *pool* de aminoácidos e proteínas em folhas de *E. crassipes*.

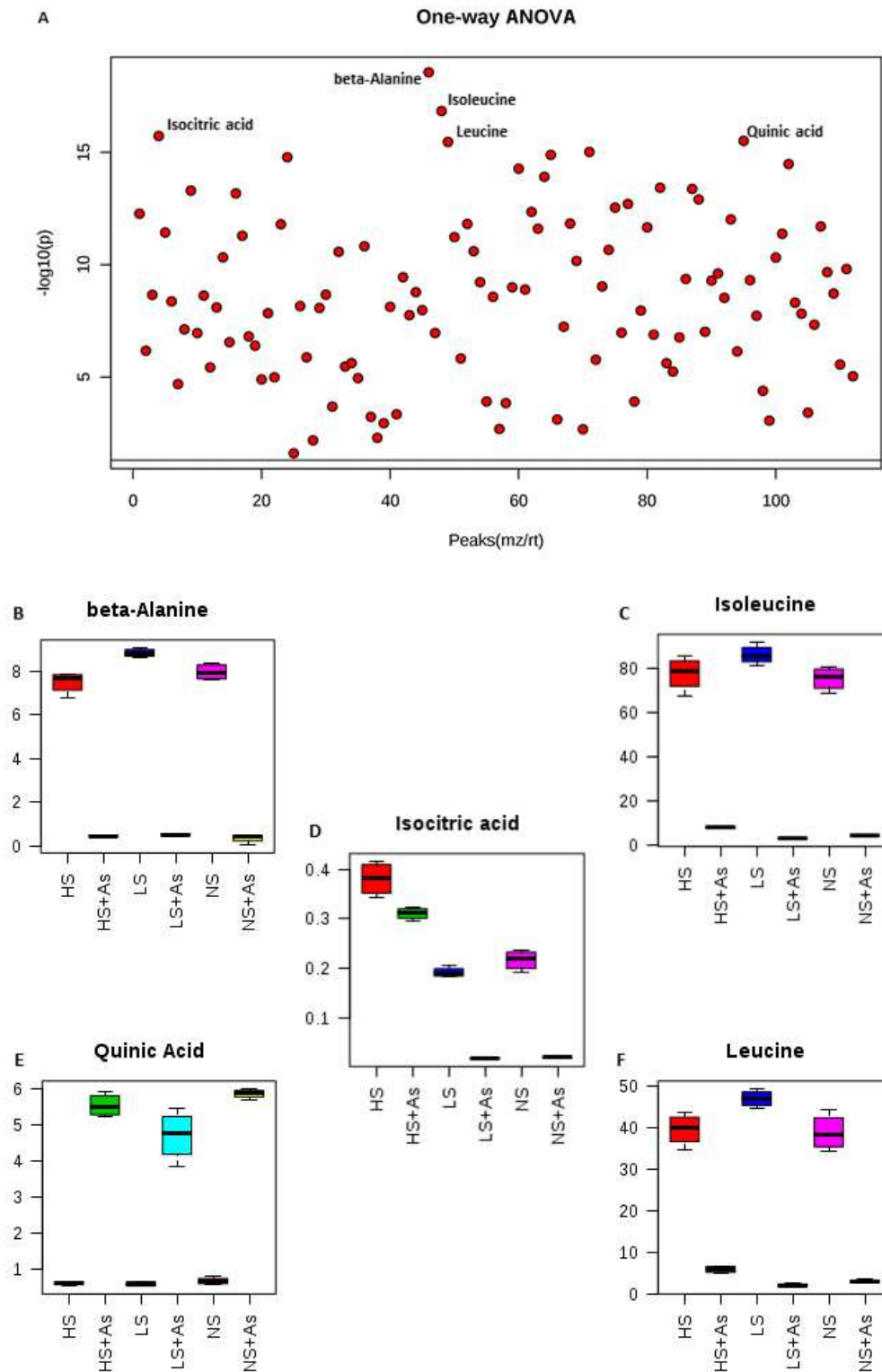


Figura 2 – One-Way ANOVA dos metabólitos encontrados em folhas de *E. crassipes* seguida por Teste de Fisher's LSD (p -value ajustado (FDR) $\leq 0,05$)- ANOVA (A) com a identificação dos 5 metabólitos com maior valor para $-\log_{10}(p)$; beta-Alanina(B) Isoleucina (C); ácido isocítrico (D); ácido quínico (E) e Leucina (F).

De uma forma geral, o teor de aminoácidos foi reduzido na presença do metal. Da mesma forma, o teor de proteínas foi afetado negativamente pela presença de arsênio, tendo sido encontrado em folhas em meio LS+As, os menores teores, assim como ocorreu com aminoácidos.

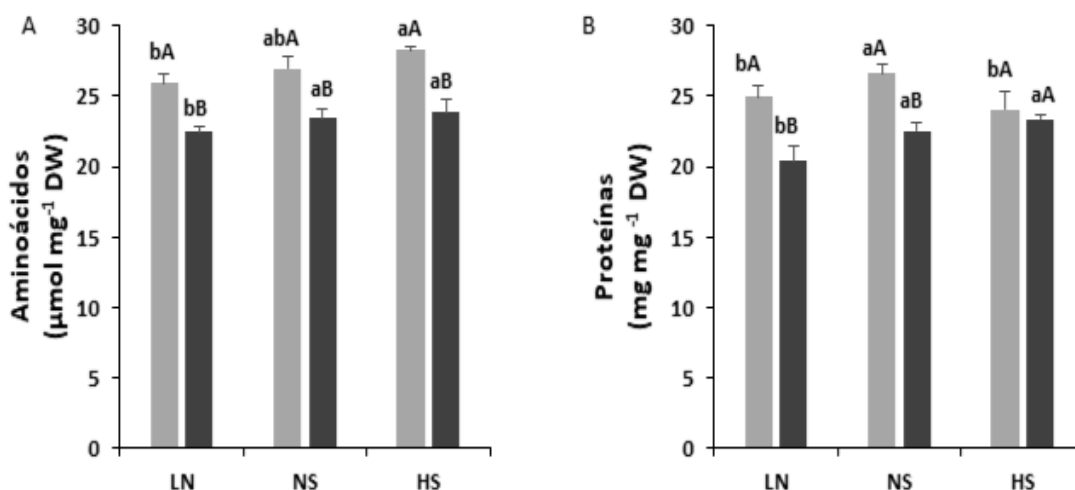


Figura 3- Teores do *pool* de aminoácidos (A) e proteínas (B) em folhas de *Eichhornia crassipes*.- *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio (**cinza claro**) e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo 8μM de arsênio (**cinza escuro**) não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Uma alternativa para tentar fornecer uma visualização intuitiva da tabela de metabólitos identificados em função dos tratamentos aplicados, é realizar uma análise de agrupamento (*Clusters*), usando um critério de variação mínima que minimize a variância total dentro do cluster, usando um mapa de calor (*heatmap*) representando a intensidade de cada metabólito identificado. O *Heatmap* mostrado na figura (4) ilustra a reprogramação metabólica em folhas de *E. crassipes* em função do enxofre e arsênio aplicados. Em cada célula colorida no mapa, uma intensidade correspondente a um valor de concentração na tabela de dados. Nele estão representados os 60 primeiros metabólitos mais significativos (Tukey $\leq 0,05$)

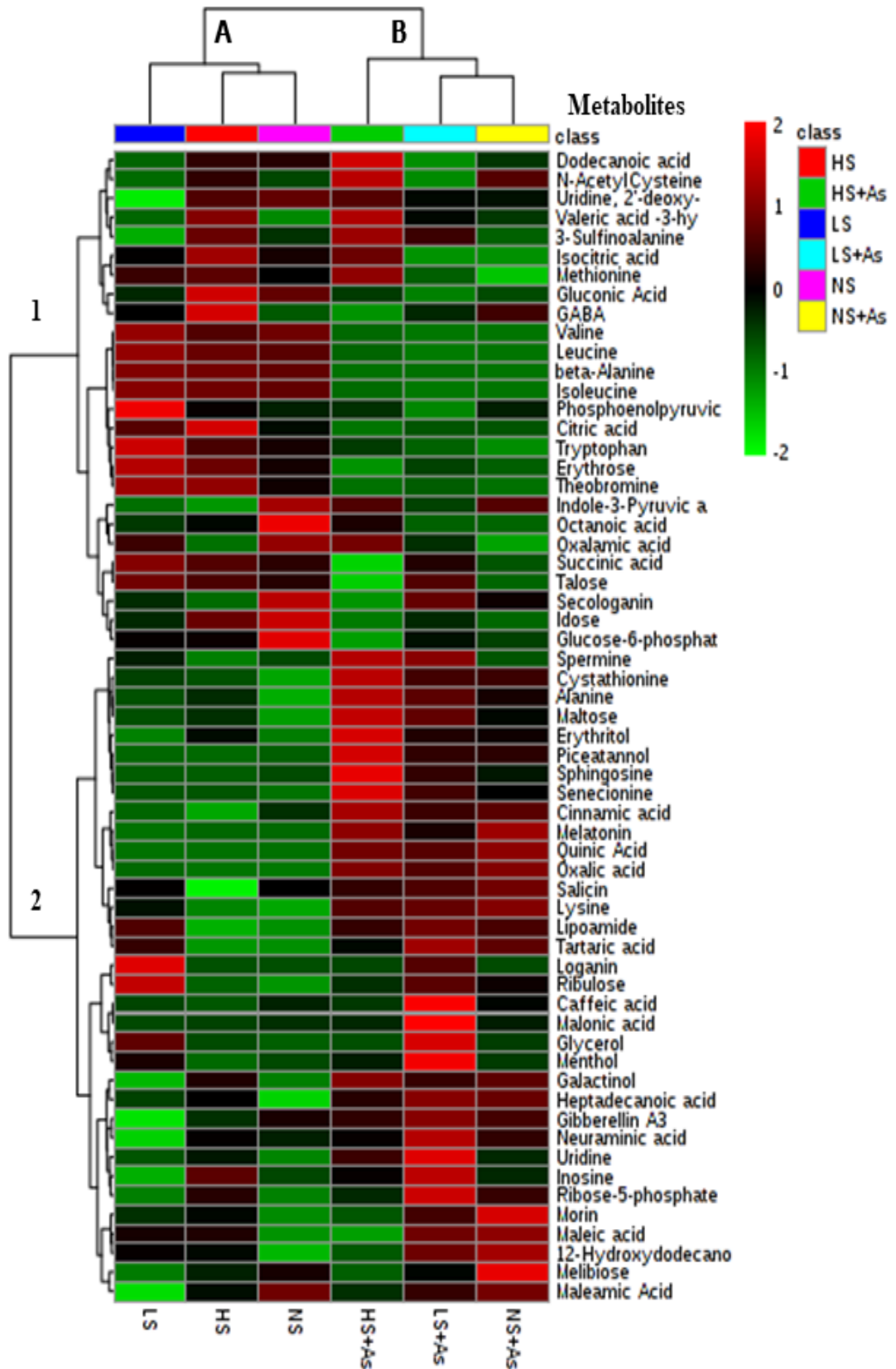


Figura 4- Análise de *clusters* e *Heatmap* com os 60 primeiros metabólitos mais significativos em folhas de *E. crassipes* conforme ANOVA- * (Tukey $\leq 0,05$).

Além de aminoácidos, outros metabólitos envolvidos em vias centrais do metabolismo como ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido succínico), açúcares (allose, xylose, rafinose, sacarose e talose), poliaminas (espermidina e espermina), ácidos graxos (ácido octanóico, ácido palmítico e ácido octodecanóico), além de diversos metabólitos secundários, como Melatonina, Morin (flavanóide), Senecionine (alcalóide), ácido abscísico (ABA) foram identificados, dentre outros mostrados no Suplemento S3 (Tabela S3.1) .

Por intermédio da análise de clusters é possível perceber que os metabólitos foram divididos em dois grandes grupos (1 e 2), cada um com duas subdivisões (não indicadas na figura). Compondo o grupo 1, uma maioria de metabólitos regulados negativamente na ausência do metal, como espermina, melatonina, lisina, cistationina, senecionina, ácido quínico e esfingosina, que quando expostos ao metal, elevaram suas intensidades. Além disso, metabólitos que foram alterados apenas em meio LS, tendo suas intensidades elevadas na ausência de arsenato, como glicerol fazem parte deste primeiro grupo, incluindo aqueles metabólitos que permaneceram inalterados na ausência do metal. No grupo 2 metabólitos em sua grande maioria, regulados positivamente na presença de arsênio. Ácido cinâmico, salicin e miricetin foram alguns dos metabólitos secundários também regulados de maneira positiva. Valina, isoleucina, leucina, triptofano e beta-alanina tiveram suas intensidades reduzidas (regulados negativamente). Além destes, ácido cítrico é um outro importante metabólito encontrado neste grupo.

Foi possível ainda separar os tratamentos em dois grandes grupos (A e B), onde estão os tratamentos não submetidos ao estresse por arsenato (A), separados daqueles aonde o arsênio foi aplicado (B). Neste sentido, buscando separar os grupos, de forma a tentar auxiliar na interpretação dos resultados, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o intuito de reduzir a dimensionalidade dos dados e visualizar o agrupamento de amostras por intermédio de transformações lineares buscando preservar tanto quanto possível a variação nos dados originais nos dados de saída de dimensionalidade inferior. Os três primeiros componentes foram capazes de explicar 96,2 % da variância encontrada (Figura 5A). O gráfico demonstrando os dois primeiros PCs (PC1 e PC2) encontra-se na figura 5B.

É possível perceber quando se avalai os 2 primeiros componentes, que apesar de explicar boa parte da variância encontrada, a análise não foi capaz de demonstrar a separação satisfatória entre os tratamentos LS e HS na ausência do metal.

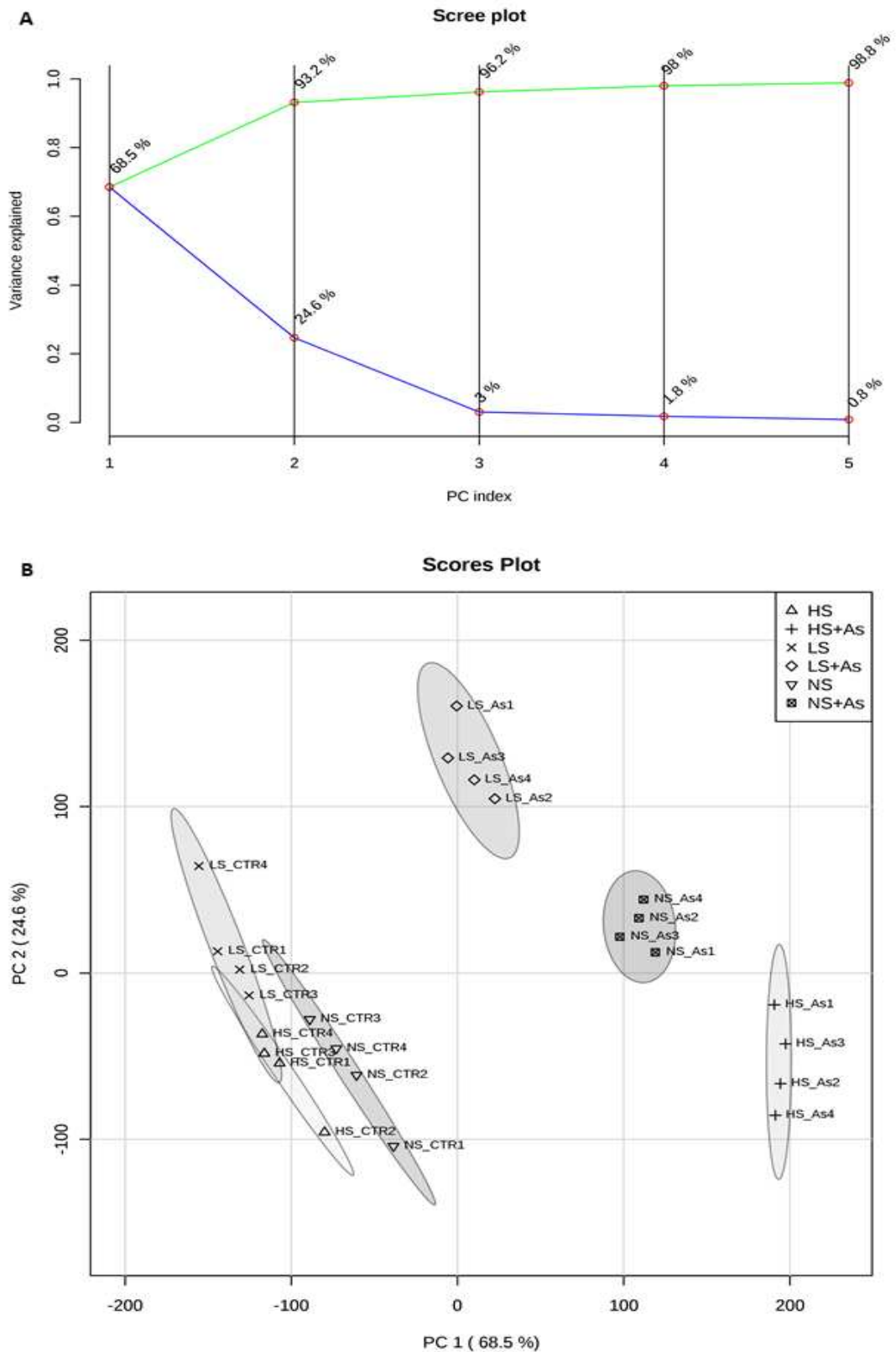


Figura 5 - Análise de Componentes Principais a partir dos metabólitos identificados pela ANOVA em folhas de *E. crassipes*- A- *Scree Plot* mostrando que os 5 primeiros componentes principais e a variância por eles explicada; B-PC 1- Componente Principal 1 – explica 68,5% da variância; PC 2 – Componente Principal 2 – explica 24,6% da variância.

No que diz respeito as amostras obtidas em meio ao arsênio, é possível realizar a distinção entre os três tratamentos, mais ainda não foi possível identificar com precisão quais seriam os metabólitos responsáveis por essa separação em ambos os componentes. Desta forma, com o intuito de refinar a análise de componentes principais, buscando identificar quais os metabólitos que sejam capazes de separar de fato as amostras analisadas, realizou-se uma análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) entre os metabólitos identificados, quando arsenato esteve ausente (Figuras 6 e 7).

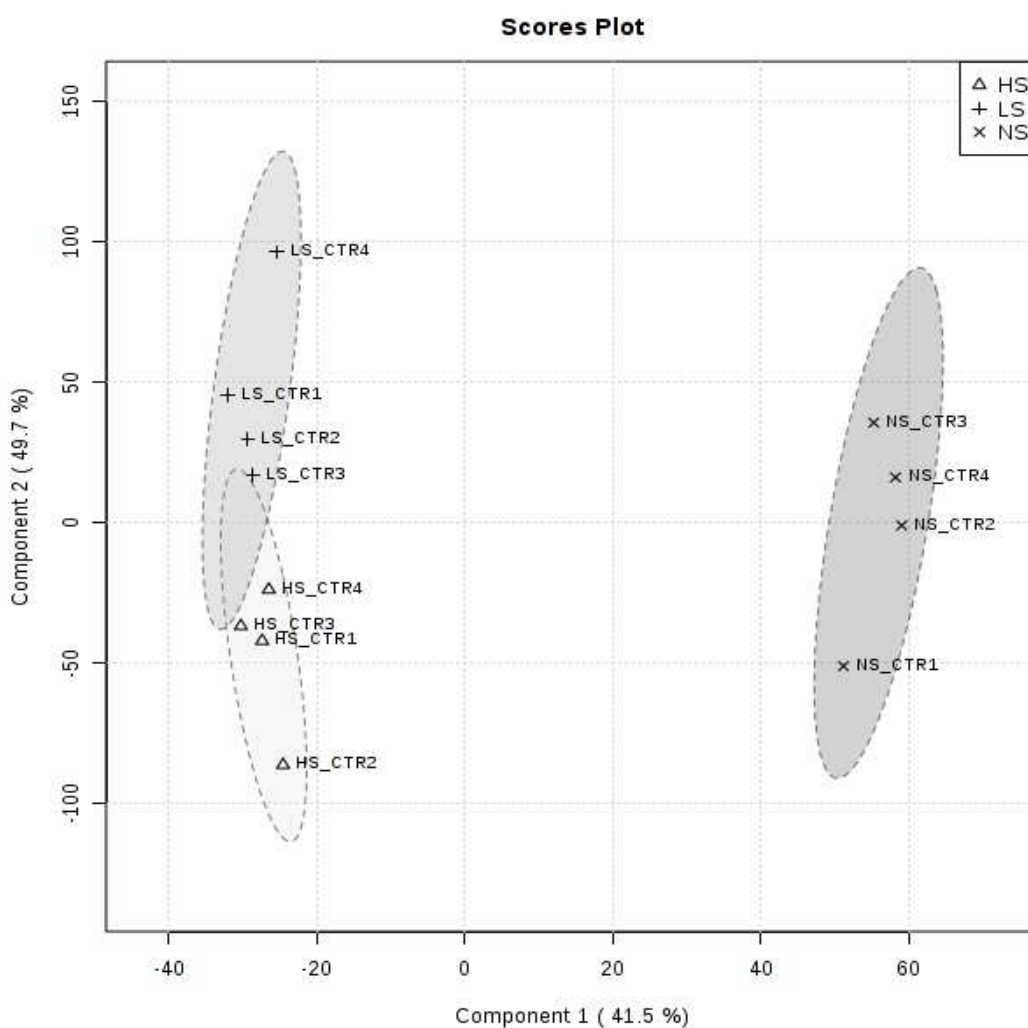


Figura 6 - Análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e metabólitos com poder discriminatório entre os tratamentos considerando o escore VIP (Variáveis Importantes na Projeção) de cada variável. (**) Ausência de arsenato *Cross validadion (PC1 e PC2 - $r^2=0,96$; $Q^2=0,92$)

Posteriormente, uma análise para a identificação de quais metabólitos têm maior poder discriminatório entre os tratamentos considerando o escore VIP (Variáveis

Importantes na Projeção) de cada variável a partir da análise de PLS-DA (Suplemento S3.1 e S3.2).

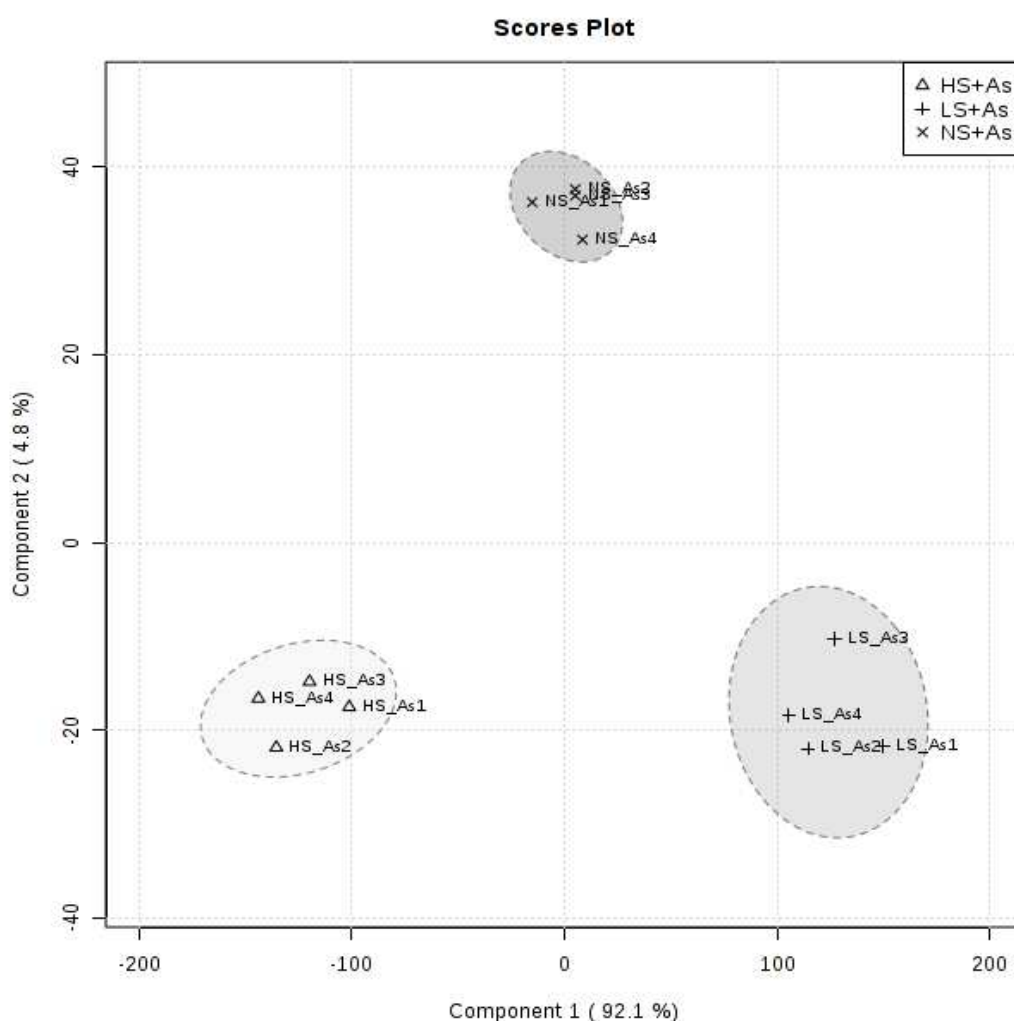


Figura 7 - Análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) Interação arsênio x enxofre.(**) Arsenato presente. *Cross validadion (PC1 e PC2 - $r^2=0,99$; $Q^2=0,97$)

Isto permitiu distinguir de fato, aqueles metabólitos que auxiliam na separação dos grupos, e não apenas aqueles que se mostraram preliminarmente após a ANOVA, como características potencialmente significativas. A precisão do modelo explicativo (*cross validation*) permite afirmar que os metabólitos identificados, relacionados nas figuras suplementares sejam capazes de permitir uma distinção segura entre os tratamentos em questão.

A figura 8 retrata a abundância relativa de alguns desses metabólitos VIPs identificados.

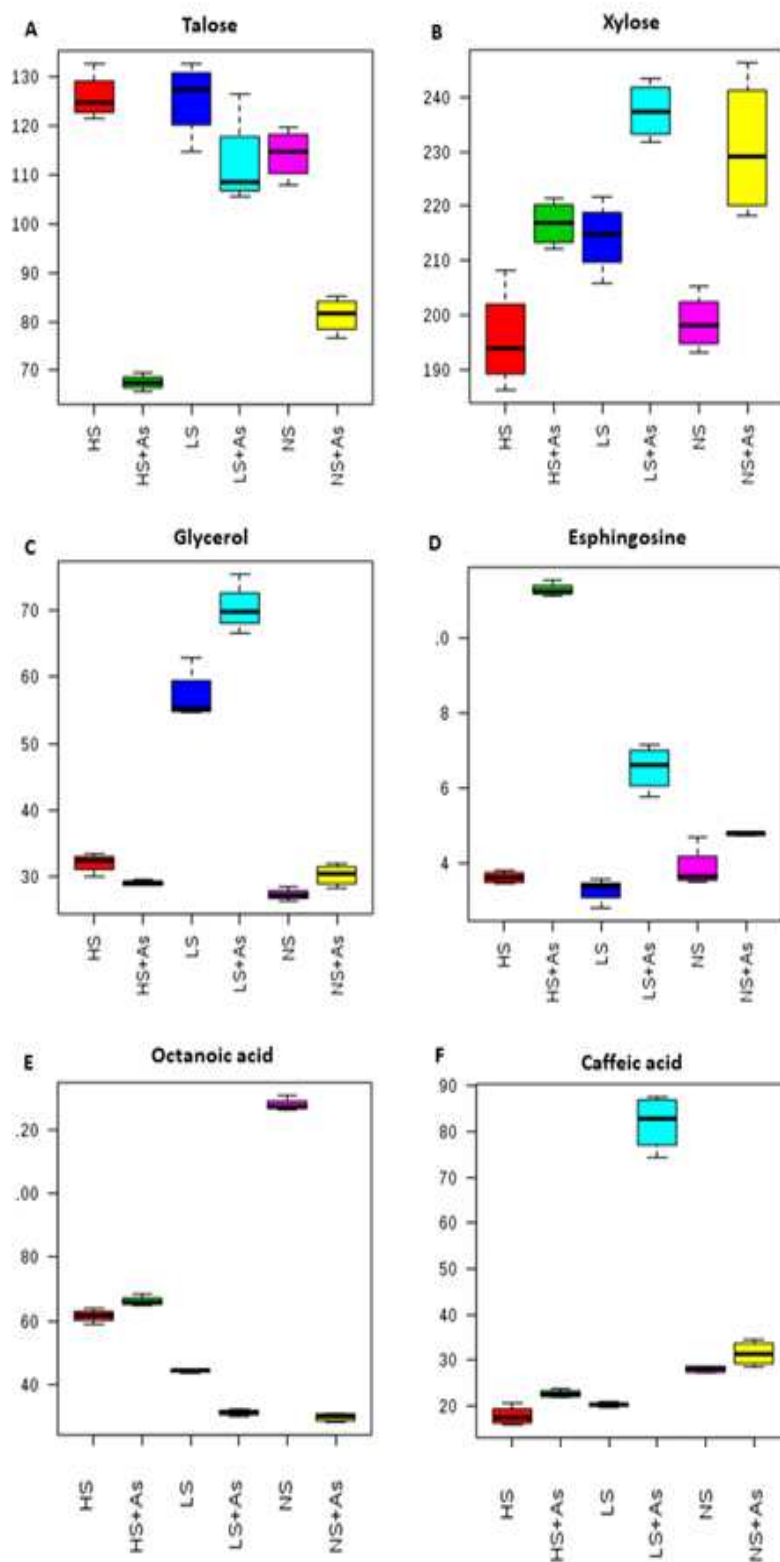


Figura 8- Abundância relativa de alguns metabólitos VIPs identificados em folhas de *E. crassipes* (p-value < 0,05). A. Talose B. Xilose C. Glycerol. D. Espingosine E. Ácido Octanoico F. Ácido cafeico – valores da abundância relativa foram normalizados

Talose (Figura 8A) e tagatose (Suplemento 6 – Figuras 6A-6C) foram açúcares importantes na distinção dos grupos. Talose foi regulada positivamente em meio LS +As, sendo regulada negativamente nos tratamentos NS+AS e HS+As na presença do metal.

Tagatose foi outro metabólito VIP regulado positivamente em meio LS, independente da presença de arsênio em folhas de *E. crassipes*. Xylose e gulose e foram açúcares também ranqueados como metabólitos VIP na distinção dos diferentes grupos. Na figura 8B, Xylose, um metabólito derivado da hemicelulose, foi regulada positivamente em meio LS, sendo que foi regulada negativamente em folhas de *E. crassipes* tanto em meio LS+As, quanto em meio NS+As.

A intensidade de Xylose foi aumentada na presença do metal (regulada positivamente), mantendo-se em níveis mais intensos em meio LS+As. Gulose (Suplemento 7 – Figuras 6A e 6C) foi considerado um metabólito VIP em folhas estressadas por arsênio, sendo regulada de maneira positiva em folhas cultivadas no meio LS+As e NS+As, enquanto que em meio HS+As, foi regulada de maneira negativa, reduzindo sua intensidade em folhas de *E. crassipes*. Sacarose, um outro metabólito VIP foi regulada de maneira positiva na presença de arsênio, especialmente em folhas crescendo em meio LS +As e NS+As. Outros açúcares como glucose, maltose, isomaltose e melibiose foram negativamente reguladas na presença do metal, especialmente. glicose e maltose em meio HS+As.

O ácido succínico foi outro metabólito VIP alterado durante o estresse por arsênio em folhas de *E. crassipes*, sendo regulado de maneira negativa em folhas (Suplemento 7 – Figuras 7A -7C). Ácido maleico, que tem como isômero mais estável, o ácido fumárico, foi considerado também um metabólito VIP (Figuras S2.1 e S3.1). Ele foi *up* regulado em folhas obtidas no meio LS+As e NS+As e regulado negativamente em meio HS+As. Ácido málico (malato é a sua forma ionizada, sendo um intermediário do ciclo do ácido cítrico (TCA)) foi acumulado em folhas após a presença do arsenato em solução. Ácido pirúvico, ácido oxalacético, ácido cítrico e ácido isocítrico foram outros importantes ácidos carboxílicos afetados pela presença de arsênio, especialmente nos meios LS+As e NS+As. Piruvato e oxaloacetato tiveram suas intensidades reduzidas na presença de arsênio, sendo que em folhas NS+As e LS+As, essa redução foi mais pronunciada. Piruvato em meio HS+As permaneceu regulado de forma positiva, sendo que na ausência e com baixa disponibilidade de enxofre (LS), foram

reduziram suas intensidades. Citrato foi outro metabólito importante do ciclo do ácido cítrico afetado negativamente pela presença do arsênio em folhas de *E. crassipes*.

Lipídios foram um outro grupo importante de metabólitos alterados em função dos tratamentos. Glicerol é um metabólito que pode ser associado a baixa disponibilidade de enxofre (Figura 8C). Esfingosina, pertencente a uma família de lipídios de membranas celulares, teve sua intensidade aumentada na presença de arsênio, especialmente em meio HS (Figura 8D). Ácidos graxos saturados como ácido octanóico (8C) (Figura 8E), ácido palmítico (16C) e ácido octadecanóico (18C) foram importantes metabólitos nessa distinção entre os diversos tratamentos. Ácido tetradecanóico (14C) e ácido Heptadecanóico (17C) foram metabólitos que responderam ao metabolismo do enxofre e ao arsênio, respectivamente, onde o ácido tetradecanóico teve sua intensidade aumentada nos meios LS e HS e o ácido heptadecanóico foi regulado de maneira negativa em todos os tratamentos na ausência do metal. Plantas crescendo em meio HS+As acumularam mais ácidos graxos de cadeias menores (octanóico e dodecanóico), enquanto que plantas crescendo sob menor disponibilidade de enxofre do que HS (meios NS+As e LS+As), acumularam mais ácidos graxos de cadeias maiores, como ácido octadecanóico (18C), ácido heptadecanóico (17C) e ácido palmítico (16C).

Ácido cafeico, um ácido fenólico, responde positivamente a presença de arsênio, especialmente em LS+As (Figura 8F). Apenas os aminoácidos isoleucina e alanina e n-acetil-cisteína (precursor na biossíntese de cisteínas) foram aminoácidos ranqueados nesta análise. Alanina elevou sua intensidade na presença do metal, especialmente em folhas obtidas a partir do meio HS+As. Isoleucina foi um dos metabólitos mais significativos de acordo com a ANOVA e também, um dos metabólitos mais importantes de acordo com a análise de *scores* VIP. Este aminoácido teve sua intensidade reduzida na presença de arsênio. N-acetil-cisteína teve sua intensidade aumentada em meio HS, especialmente na presença do metal. Além disso, em meio NS+As também elevou seus teores.

Cabe ainda ressaltar que apesar de não constarem na lista dos metabólitos VIPs para os dois primeiros componentes principais, outros aminoácidos afetados são de extrema importância fisiológica em situações de estresses. O ácido glutâmico foi reduzido na presença do metal, mantendo-se ligeiramente mais elevado em meio LS+As. Glutamina, outro importante aminoácido teve sua intensidade elevada na presença de arsenato em folhas de *E. crassipes*. GABA teve sua intensidade reduzida

em HS+As e LS+As e elevada no meio NS+As. Ácido aspártico, arginina e asparagina também foram aminoácidos afetados pela presença do metal, sendo reduzidos na sua presença. Além destes, spermina parece ser importante também na diferenciação dos grupos, sendo considerado um dos metabólitos VIPs. Espermina teve sua intensidade elevada na presença do metal, enquanto que espermidina teve uma redução em sua intensidade.

3.2- A análise de enriquecimento de vias metabólicas

Para entender o significado biológico das alterações metabólicas observadas, os metabólitos identificados pela análise de variância como sendo significativos foram utilizados para a análise de possíveis vias alteradas em função do estresse por arsênio, nos diferentes tratamentos analisados (Figura 9).

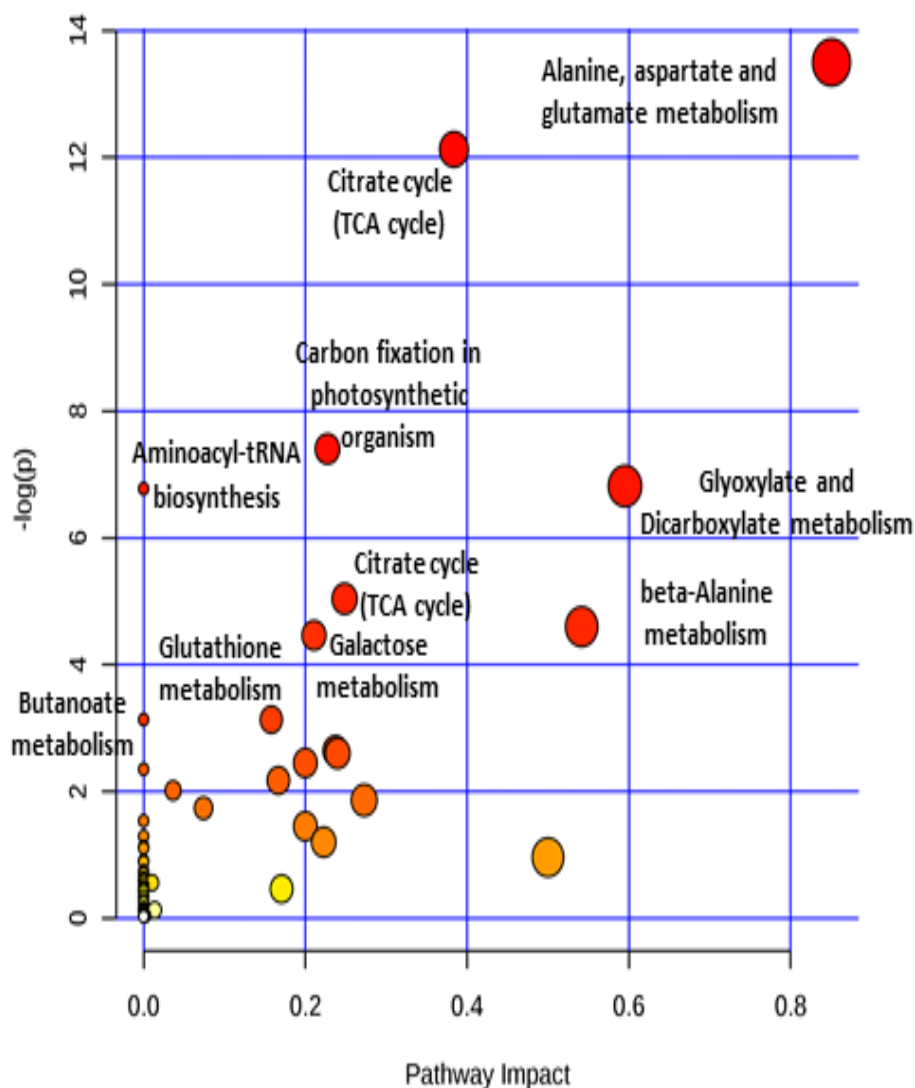


Figura. 9. Análise de enriquecimento vias afetadas em folhas de *E. crassipes* após 24h de exposição ao arsênio. Visão geral das principais vias metabólicas possivelmente afetadas

pelo estresse. As vias identificadas (nomeadas) no gráfico correspondem as vias estatisticamente significantes (p value $< 0,05$). O tamanho do círculo representa a proporção direta entre os metabólitos presentes nos dados de entrada e o total de intermediários que compõe a via metabólica (Hits). A cor do círculo representa o nível de significância da via. Obs.: $-\log(p) > 3 = p$ value. **Errata: No lugar de “Citrate cycle(TCA cycle) em $-\log(p)=5,04$ leia-se: arginine and proline metabolism.**

As vias identificadas (nomeadas) no gráfico correspondem as vias estatisticamente significantes (p value $< 0,05$). O arsênio ao afetar diretamente a intensidade dos metabólitos ácido glutâmico e glutamina, trouxe consequências para o metabolismo do glutamato e sobre o metabolismo da arginina. Essas alterações trouxeram efeitos menores sobre o metabolismo do butanoato, e ainda sobre o metabolismo do nitrogênio, contudo em maior escala p value (Tabela suplementar 2). A biossíntese de aminoácidos (aminoacil-tRNA), o metabolismo de alanina e beta-alanina também foram significativamente afetados. Além disso, o metabolismo energético em folhas de *E. crassipes*, aqui representado pela fixação de carbono durante a fotossíntese e o ciclo do ácido cítrico, foi intensamente alterado pela presença de arsenato. Cabe ressaltar que a oferta diferenciada de enxofre teve efeitos também sobre a magnitude destas alterações, além de influenciar vias específicas, como a biossíntese de glucosinolatos, a biossíntese de lipídios e o metabolismo da glicina e serina (Tabela suplementar 2).

O metabolismo da glutatona, um tiol indispensável na defesa vegetal, está entre as principais vias alteradas no metabolismo de *E. crassipes*. Além disso, o metabolismo do glioxilato, importante via que integra o TCA ao metabolismo de glutatona, foi também modificado em face da presença do metal em solução. Não somente o metabolismo da glutatona, mas o metabolismo da cisteína e metionina foram alterados. Cisteína é precursor da glutatona e metionina o metabolismo de serina (também na rota de assimilação de enxofre e biossíntese de glutatona) foram afetados (serina foi *up regulada* na presença de arsenato, mas em função dos critérios adotados para confiabilidade dos dados espectrais obtidos, não foi considerada para análises neste trabalho).

Devido a importância do metabolismo da glutatona na desintoxicação do estresse promovido pelo arsênio e a importância atribuída a um precursor da biossíntese de cisteínas (N-AcetilCisteína), que são matéria prima para a biossíntese de glutatona procedeu-se a quantificação do *pool* de cisteínas e glutatona em folhas de *E. crassipes* (Figura 10).

Além disso, glutatona é importante na biossíntese de fitoquelatinas, que quelam e podem sequestrar o metal para vacúolos, aliviando a toxicidade do metal. Glutatona é também importante no transporte de enxofre orgânico pelo floema em plantas. O *pool* de cisteínas foi maior, conforme a maior presença do metal em folhas, enquanto que o *pool* de glutatona foi maior, quanto maior a biodisponibilidade de enxofre.

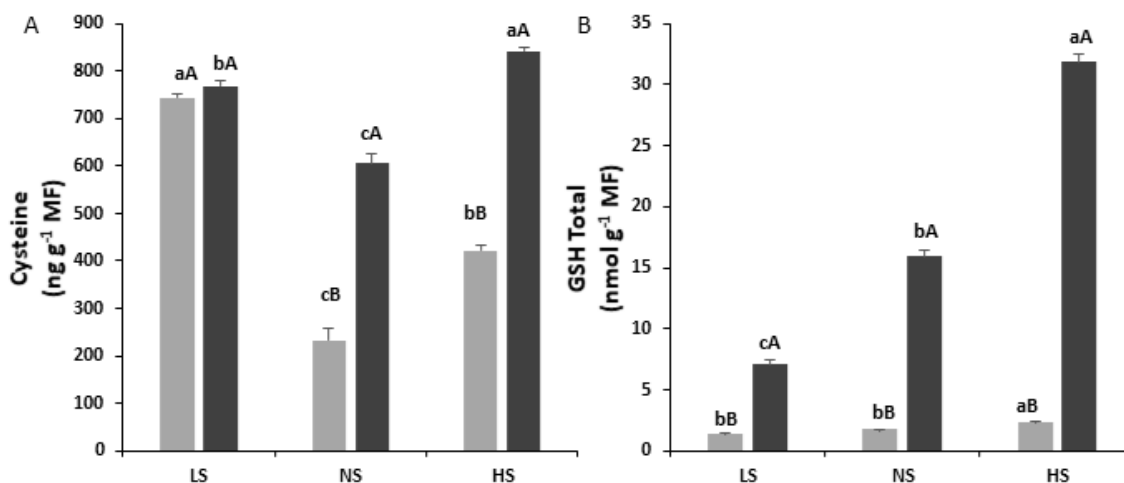


Figura 10- *Pool* de cisteínas e glutatona em folhas de *E. crassipes*. * Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio (**cinza claro**) e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo 8 μM de arsênio (**cinza escuro**) não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Alterações na biossíntese de aminoácidos e proteínas, no metabolismo do piruvato, do amido e da sacarose foram também vias alteradas pelo arsenato. O metabolismo do nitrogênio e de purinas também foram modificados pelo metal. Foi ainda possível identificar alterações na biossíntese e metabolismo de ácidos graxos e na biossíntese de ácidos graxos insaturados. A glicólise, a rota das pentoses e metabolismo do ascorbato também foram vias alteradas pelo metal. Pode-se ainda ressaltar que a biossíntese de alcalóides, terpenóides e diterpenóides foi modificada pela presença do metal (Tabela Suplementar 1).

3.4- Fitohormônios e aminoácidos atuam na percepção e resposta ao estresse ocasionado por arsenato em folhas de *E. crassipes*.

O metaboloma de folhas de *E. crassipes* aponta para o envolvimento de alguns fitormônios na resposta ao estresse. Giberelinas e ácido abscísico (ABA) foram identificados, sendo extramamente importantes no metabolismo foliar., especialmente o ABA. Isoleucina se mostrou como um metabólito de extrema relevância em resposta ao

estresse ocasionado por arsênio, sendo reconhecida como um importante metabólito na via de ativação de ácido jasmônico em resposta a diferentes estresses. Assim como o triptofano e o ácido indol 3-pirúvico, que podem estar relacionados com auxinas. Salicin é um metabólito relacionado ao ácido salicílico, que pode também desempenhar funções na sinalização e resposta ao stress ocasionado pelo arsênio.

3.5- Arsênio e a disponibilidade de enxofre afetam diretamente o metabolismo energético em *E. crassipes*

A presença de excesso de metais pesados resulta em uma limitação da fixação de CO₂ nos cloroplastos, que juntamente com uma redução excessiva da cadeia de transporte de elétrons fotosintéticos serve como um local de produção de ROS (Mittler *et al.*, 2004). Metabólitos como ácidos orgânicos são oxidados durante o ciclo do ácido tricarboxílico na matriz mitocondrial, dependentes do provimento de elétrons por meio da cadeia transportadora de elétrons presente na membrana mitocondrial interna. Na figura 11 é possível perceber alterações relacionadas a toxidez do arsenato.

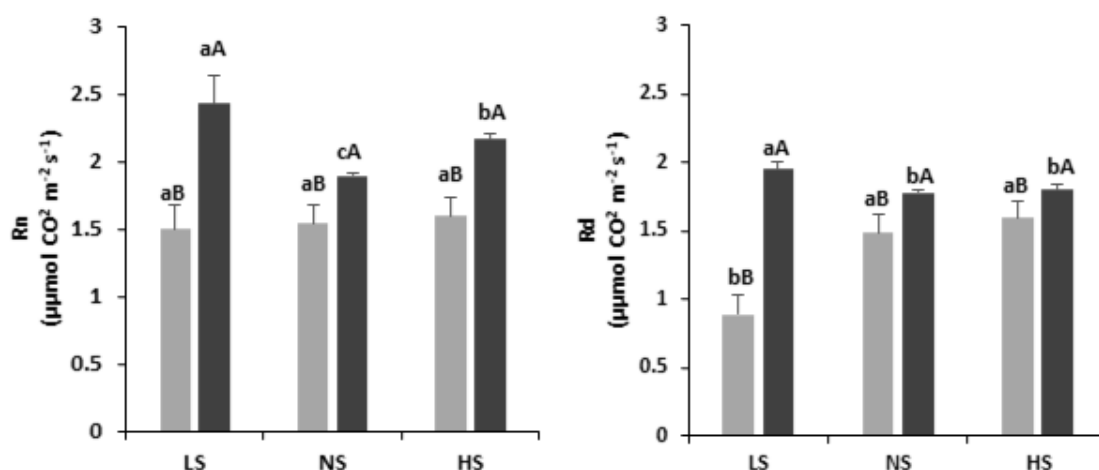


Figura 11 – Respiração Noturna (R_N) (A), Respiração Diurna (R_d) (B) em folhas de *Eichhornia. crassipes*. *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio (**cinza claro**) e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo 8μM de arsênio (**cinza escuro**) não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey

Mitocôndrias em plantas têm uma posição central no metabolismo do carbono celular e do nitrogênio através do ciclo TCA e seu papel na fotorrespiração e suas prováveis interações com a oferta de enxofre relacionados a esses dois importantes processos metabólicos. A taxa respiratória de *E. crassipes* foi alterada pela presença do

metal (Figuras 11A e 11B). Ao final de 24 hs, após a estimativa da taxa respiratória diurna, foi observado que ambas, noturna e diurna, foram maiores em plantas estressadas por arsênio.

3.6- Danos a membranas celulares em folhas de *E. crassipes* submetidas ao estresse ocasionado por arsenato são influenciados pela oferta de enxofre.

A figura 12 permite visualizar danos a membranas celulares em folhas. Ela nos mostra que em meio HS+As a morte celular em *E. crassipes* submetidas ao arsênio foi inferior ao observado nos demais tratamentos. Tendo em vista o arsênio translocado em quantidade considerável para a parte aérea, é possível observar regiões coradas fortemente em azul que indicam a ocorrência de morte celular em folhas de *E. crassipes*. Diante dos resultados, é possível constatar que plantas que cresceram em meio com menor disponibilidade de enxofre, apresentaram maiores indícios de morte celular. Por outro lado, plantas cultivadas em meio alta disponibilidade de enxofre, apresentaram coloração menos intensa.

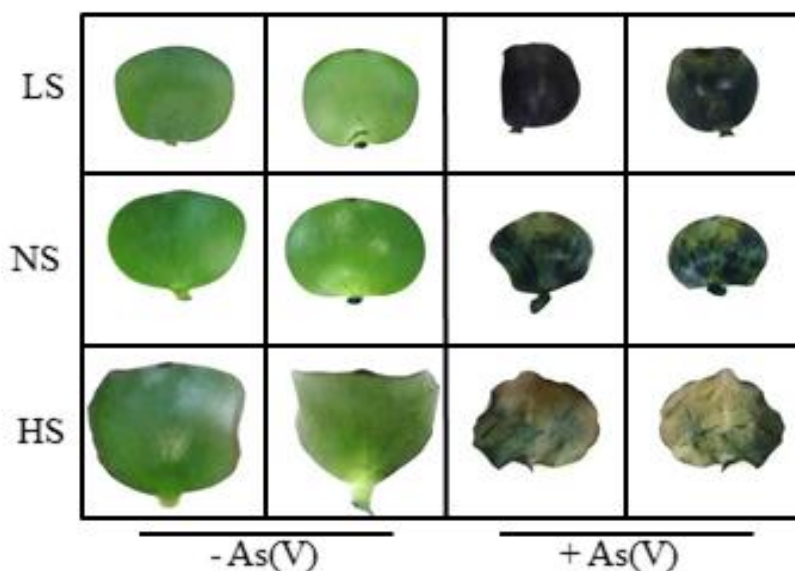


Figura 12 – Localização histoquímica de morte celular em *Eichhornia crassipes*. * Folhas na ausência de arsenato (-As(V)) e na presença (+As(V))- ** Colunas 1 e 3 - região adaxial da folha. *** Colunas 2 e 4 - região abaxial da folha.

4- Discussão

A sensibilidade em plantas requer uma ampla gama de alterações fisiológicas, moleculares e bioquímicas para que possam responder adequadamente às mudanças impostas pelo meio ambiente. A exposição a metais pesados desencadeia uma ampla gama de alterações fisiológicas e bioquímicas, e as plantas têm que desenvolver e / ou adotar uma série de estratégias que lhes permitam lidar com as conseqüências negativas da toxicidade de metais pesados (Singh *et al* 2015). De uma forma geral é possível perceber que a presença de arsenato induz a uma significativa reprogramação metabólica em folhas de *Eichhornia crassipes* após 24h de exposição ao metal, incluindo vias metabólicas cruciais a sua sobrevivência. Deve-se levar em consideração que o metaboloma fornece informações sobre o estado metabólico de um sistema, que é dependente do tempo, modulado por condições ambientais e sujeito a alterações de desenvolvimento (Bielecka, *et al* 2015).

As alterações no metabolismo foliar de *Eichhornia crassipes* foram influenciadas não somente pela presença do arsênio como pela oferta diferenciada de enxofre em solução (Suplemento S5.1 e S5.2). A fome de sulfato induzida previamente e o posterior reabastecimento, permitiram a plantas em meio HS e NS, especialmente HS, a acumular um maior teor de arsênio em suas folhas, sendo que a maior oferta de enxofre reduziu efeitos deletérios do arsênio, como a morte celular, conforme indicam os dados obtidos (Figuras 1A, 1B e 1C; Suplemento S1.1 e S1.2). Zhang J. *et al.* (2011) afirmam que uma das possíveis explicações para o aumento na translocação de arsênio para a parte aérea é de que com a menor disponibilidade de enxofre, a disponibilidade de tióis não proteicos como fitoquelatinas para complexação do arsênio em raízes é reduzida. Contudo, os efeitos negativos do arsênio sobre o metabolismo foliar foram reduzidos com a maior oferta de enxofre.

Assim como indica a análise de vias afetadas em folhas de *E. crassipes*, Dixit *et al* (2015) ao analisar o proteoma de folhas de arroz buscando avaliar o efeito do enxofre sobre a redução da toxicidade do arsênio, encontrou várias proteínas diferencialmente expressas entre os diferentes tratamentos de enxofre, revelando que as principais proteínas identificadas estavam relacionadas com caminhos metabólicos centrais (como a glicólise e o ciclo do ácidos tricarboxílicos (TCA)), com a biossíntese de aminoácidos, fotossíntese (cadeia de transporte de elétrons e ciclo de Calvin) e metabolismo energético, metabolismo de ácidos nucleicos e proteínas.

4.1-O metabolismo de aminoácidos em folhas de *E. crassipes* estressadas por arsenato nos permite conectandar diferentes vias alteradas e metabólitos.

A exposição ao arsenato trouxe consequências para o pool de aminoácidos, reduzindo-o de maneira geral, com reflexos também sobre a biossíntese de proteínas. De acordo com Pavlíka *et al* (2010), aminoácidos tem um papel central na resposta de plantas a estresses por metais pesados. Aminoácidos como beta-alanina (Figura 2B), leucina (Figura 2F), isoleucine (Figura 2C), valinae e triptofano (Figura 4) foram regulados negativamente, reduzindo sua intensidade na presença do metal e apontados como alguns dos metabólitos mais significativos pela ANOVA.

Obata & Fernie (2012), ao analisarem o uso de metabolômicas para dissecar as respostas de plantas aos estresses abióticos, discutiram sobre o papel de aminoácidos de cadeia ramificadas (AACR), nomeadamente valina, leucina e isoleucina e outros aminoácidos que compartilham caminhos sintéticos com AACR, incluindo lisina, treonina e metionina, que são geralmente acumulados sob condições de estresse abiótico, apontando-os como um novo grupo de metabólitos que se acumulam em geral em resposta a condições de estresse. Entretanto, em folhas de *E. crassipes*, esses aminoácidos foram em sua maioria regulados negativamente (Figura 4). Todavia, lisina foi regulada de forma positiva na presença de arsenato, sendo as maiores intensidades observadas em meio LS+As, assim como metionina se acumulou sob maior oferta de enxofre (HS), principalmente na presença de arsênio (HS+As), e em folhas sob baixa disponibilidade de enxofre na ausência do metal.

Kumar *et al* (2014) ao analisar genótipos contrastantes de arroz em relação a acumulação de arsênio, observou que o conteúdo de leucina, isoleucina e valina aumentaram em plantas expostas a 10 μ M de arsenato e de arsenito, sendo os genótipos que acumulam menos arsênio, encontrado os maiores valores, conforme observado em relação ao acúmulo de lisina no meio LS+As. A sugestão de Kumar e colaboradores (2014) é de que a toxicidade do arsênio tenha sido limitante a biossíntese desses aminoácidos, sendo também evidente seu efeito deletério sobre o crescimento de parte aérea e raízes de arroz. Davies *et al.* (1987) em seu trabalho sobre espécies reativas, proteínas e aminoácidos demonstrou que esses efeitos podem ser atribuídos à produção de espécies reativas de oxigênio que afetaram a síntese desses aminoácidos.

A produção de espécies reativas de oxigênio tem sido considerada o principal motor da toxicidade de arsênio nas plantas (Foyer *et al.* 2011) e já relatada para *E.*

crassipes (Andrade *et al* 2016; Leão *et al* 2014). Joshi *et al* (2010) sugere ainda que esse acúmulo de aminoácidos poderia funcionar também como doadores de elétrons alternativo para a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais. Numa recente revisão, Hildebrant *et al* (2015) enfatizam o papel do catabolismo de aminoácidos e sua contribuição substancial para o estado energético das células vegetais sob certas condições fisiológicas. Eles enfatizam que a oxidação de aminoácidos como leucina, isoleucina, e valina alimentariam de elétrons diretamente a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais (Engqvist *et al.*, 2009; Araújo *et al.* 2010; Schertl *et al.* 2014). Segundo essa revisão, essa transferência de elétrons se daria ao nível de ubiquinona, onde leucina, isoleucina e valina poderiam contribuir para o metabolismo mitocondrial e produção de ATP, podendo gerar 32, 29 e 24 ATPs respectivamente. Ademais, há de se levar em conta que a competição entre fosfato e o arsênio acarreta durante a fosforilação oxidativa em mitocôndrias, a formação de ADP-arsenato. De acordo com o que se pode perceber também na macrófita *Pstia stratioids*, onde Farnese *et al.* (2017) relataram que houve uma quebra da homeostase celular na presença do metal, resultado da formação destas moléculas de ATP-As(V) e associam ainda ao aumento no fluxo respiratório na busca de esqueletos de carbono para se sustentar, consumiria aminoácido. Isso nos ajudaria a compreender essa regulação negativa destes aminoácidos, associado também ao que Engqvist *et al.*, 2009; Araújo *et al.* 2010; Schertl *et al.* 2014 e Hildebrant *et al.* (2015) nos mostraram.

O ADP-arsenato pode ser usado como substrato pela hexoquinase, que normalmente sintetiza glicose-6-fosfato. Esse éster de arsenato formado é altamente instável e se hidrolisa rapidamente e espontâneo (Rosen *et al* 2011; Tawfik & Viola 2011; Moore *et al* 1983), podendo ser cerca de 100.000 vezes mais rápido do que o éster de fosfato, acarretando uma queda em intermediários do metabolismo, em função da redução na disponibilidade de ATP que pode inclusive ajudar a explicar a ruptura na homeostase celular, conforme relata Rosen *et al* (2011)

4.2- A acumulação de glutamina tem papel fundamental na resposta rápida ao estresse por arsênio e desencadeia mudanças sobre a remobilização de nitrogênio.

Aminoácidos como arginina, glutamina e asparagina são reconhecidos por serem fontes de estocagem de nitrogênio em plantas (Mifflin & Habash 2002), sendo que a degradação de arginina, que tem início em mitocôndrias, é essencial para a mobilização de nitrogênio nos tecidos. Exceto pela glutamina, todos os demais aminoácidos (arginina, asparagina e glutamato) foram *down* regulados em folhas de *E.*

crassipes, com expressiva intensidade em HS+As, indicando que o maior teor de arsênio em folhas HS+As possa ter limitado esse caminho (Figura 4).

A amidação de aspartato por glutamina produz asparagina em uma reação dependente de ATP, onde a asparagina sintetase catalisa a transferência do grupo amido da glutamina para aspartato, gerando glutamato e asparagina (Pavílik *et al.* 2010). Contudo, nossos resultados indicam que não foi esse o caminho seguido.

Possivelmente, o impacto gerado pelo metal nas primeiras horas de estresse, levou as folhas a acumularem glutamina, numa provável tentativa de acumulação e remobilização de nitrogênio. Os efeitos sobre o TCA podem ser atribuídos como um reflexo dos efeitos da toxidez do metal sobre importantes complexos enzimáticos. Dois dos mais conhecidos alvos da toxicidade do arsênio são a enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase (GPDH) e o complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDH), além do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase (Finnegan *et al* 2012).

Especificamente, a toxidez atua sobre a enzima Diidrolipil-desidrogenase (E3), que reoxida diidrolipoamida, para continuar a conversão de piruvato em acetil-CoA (Finnegan *et al* 2012). Sendo estes alvos principais do As(III), a redução do arsenato a arsenito permitiria posteriormente o impedimento dessa reoxidação, comprometendo todo o ciclo do ácido cítrico. Isto se mostra consistente com o fato de lipoamida ter sido up regulado durante o stress por arsenato.

Um dos possíveis vias para esse acúmulo de glutamina (Figura S5.2) pode ser a chave para explicar o forte impacto gerado sobre o metabolismo de alanina, aspartato e glutamato. Em *Arabidopsis thaliana*, sacarose pode induzir os níveis de glutamina sintase, enquanto que aspartato, asparagina, glutamato e glicina podem inibir (Oliveira & Coruzzi 1999). Sacarose foi up regulada durante o stress (Figuras S4.2 e S5.2) e esse aumento nos níveis de glutamina em NS+As e LS + As podem significar uma forma de remobilização de nitrogênio durante o stress e início do processo de morte celular, sendo a glutamina considerada como a principal forma transportável de nitrogênio de acordo com (Howarth *et al* 2008).

4.3- Arsênio e o pool de glutamina afetam drasticamente o metabolismo da alanina, do aspartato e do glutamato

Dentre todas as vias metabólicas impactadas, o maior impacto foi sobre aquelas relacionadas ao metabolismo de alanina, aspartato e glutamato (Figura 8). Alanina foi o aminoácido com maior score VIP (Figura S3.1 e S3.2), presente nos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), sendo up regulada na presença do metal, tendo em

meio HS+As observadas as maiores intensidades. Anjum *et al* (2015) ressalta que acumulação de metais e a produção destes compostos não está bem estabelecida. Para Hildebrant *et al* (2015), os esqueletos de carbono dos aminoácidos geralmente são convertidos em precursores ou intermediários do TCA. Eles ressaltam que alanina pode ser convertida em ácido pirúvico por alanina aminotransferase.

Os resultados obtidos aqui mostraram que o ácido pirúvico foi negativamente regulado na presença de arsenato (Figura S5.2), nos meios LS+As e NS+As, sendo regulado de maneira positiva em meio HS+As aonde o teor de arsênio acumulado foi maior (Figura 4). Também foi em folhas cultivadas em meio HS+As que se observou as maiores intensidades de alanina, conforme descrito anteriormente. Acreditamos que o fluxo de carbono possa ter sido direcionado após a inibição do complexo piruvato desidrogenase, em parte para a acumulação de alanina e também, cisteínas, especialmente em meio HS+LS, demonstrando sua importância na defesa e tolerância ao estresse.

Da mesma forma que alanina pode ser convertida em um precursor do TCA, a transaminação de aspartato pode produzir oxaloacetato (Cánovas *et al.*, 2007; Lea & Azevedo, 2007). Aspartato foi regulado negativamente durante o estresse por arsenato em folhas de *E. crassipes*, sendo a redução mais pronunciada em folhas obtidas em meio HS+As (figura 4). Oxaloacetato também foi regulado de maneira negativa, contudo com uma redução mais suave em meio HS+As (Figura 4). Pode ser que também que a maior regulação negativa de aspartato seja um indicativo de que *E. crassipes* esteja tentando reestabelecer os níveis de oxaloacetato durante o estresse ocasionado por arsenato. O controle dos níveis de aspartato no interior dos plastídios é particularmente importante para o seu papel como ponto de partida em múltiplas vias de biossíntese de aminoácidos, que são precursores de inúmeros metabolitos derivados de plantas que desempenham papéis distintos no crescimento, reprodução, desenvolvimento ou defesa da planta (de la-Torre *et al* 2014).

Em condições de estresse oxidativo, GABA é considerado um importante metabólito acumulado com propriedades antioxidantes (Liu *et al* 2011). Folhas crescendo em condições NS+As, elevaram seus teores. Contudo, nos demais tratamentos na presença de arsênio, GABA foi regulado de maneira negativa (Figura 4). Glutamato, um possível precursor de GABA, também foi desta forma regulado, negativamente. GABA pode também ser convertido em succinato e entrar no TCA (Renault *et al* 2013).

Entretanto, succinato teve sua intensidade reduzida na presença de arsênio. A regulação positiva de glutamato poderia permitir maior acúmulo de α -Ketoglutarato, permitindo uma maior taxa de conversão a ácido succínico, tendo em vista que glutamato desidrogenase, converte L-glutamato em α -Ketoglutarato, permitindo a geração de NADH (Liao *et al* 2017). Ao se observar a intensidade do ácido glutárico, precursor de α -Ketoglutarato em meio NS+As, nota-se que teve sua intensidade elevada (Figura S5.4). Para Araújo *et al* (2014), o aumento compensatório no fluxo do “GABA shunt” provavelmente seria uma tentativa de restaurar o ciclo TCA. Além disso, as mudanças no “GABA shunt” sugeririam que sua regulação é necessária para manter o fluxo de succinato na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

No entanto, pelo impacto imediato gerado em folhas *E. crassipes*, a resposta imediata parece ser drástica sobre esta via na possível tentativa de restabelecer o fluxo de succinato para oxidação na matriz mitocondrial. O complexo 2-oxoglutarato desidrogenase possui estrutura similar, podendo ser também o aumento na intensidade de lipoamida (encontrada up regulada na presença do metal em *E. crassipes*), reflexo da toxidez de arsenato neste complexo, o que inviabilizaria a conversão de 2-oxoglutarato em succinil-CoA. Araújo *et al.* (2014) relata que a inibição de 2-OGDH foi caracterizada por alterações significativas tanto nos açúcares quanto nos intermediários do ciclo TCA. Após 24 hs de stress, os efeitos sobre o metabolismo foliar foram abruptos, possivelmente pelo colapso gerado na produção de ATP, o que trouxe consequências potencialmente graves para o estado energético da célula.

Por último, mais extramamente importante quando se trata de toxidez por arsênio, Dixit *et al* (2015) ressalta a importância do ácido glutâmico, conjuntamente com a cisteína e glicina na formação da molécula de glutathione. O fato de estar em intensidades reduzidas em folhas crescendo na presença de arsênio pode estar relacionado com a maior consumo imediato após o stress inicial para a biossíntese de glutathione nesses tratamentos.

O reabastecimento de enxofre e o metabolismo da Glutathione são cruciais para a bioacumulação do metal e na resposta a toxicidade do arsênio em folhas *E. crassipes*.

O impacto de Arsênio sobre enzimas antioxidantes e sobre enzimas da assimilação de S é bem documentado, incluindo em macrófitas aquáticas e arsênio (Farnese *et al* 2017; Leão *et al* 2017; Farnese *et al* 2016; Andrade *et al* 2016; Pathare *et al.* 2013; Srivastava *et al* 2009). Os ligantes que contem enxofre, glutathione (GSH) e fitochelatinas (PCs) são importantes não apenas para a ligação de arsênio após a sua

redução à forma de arsenito (AsIII), mas também para combater espécies de oxigênio reativo (ROS) geradas como resultado de sua toxicidade.

Srivastava *et al* (2013), ao avaliar microRNAs responsivos ao arsênio em *Brassica juncea*, sugeriu que os microRNAs (miR395, miR838 e miR854) regulavam a absorção de enxofre, transporte e assimilação e seriam responsivos tanto ao estresse por arsênio, quanto pela deficiência de enxofre, confirmando também o que havia sido proposto por Srivastava *et al* (2009), de que seria possível detectar o estresse por arsênio, indiretamente pelo estresse sobre o metabolismo do enxofre. A observação de que o acúmulo de enxofre e do pool de cisteínas em plantas crescidas em meio LS, tanto em folhas, quanto em raízes, foi aumentada, assim como quando plantas crescidas em meio NS+As, pode ser um reflexo da atuação de mecanismos regulatórios sobre os transportadores de sulfato, similares aos identificados em *Brassica juncea* (Figuras 1A, S1.1. e 9A e S6.1).

Plantas crescendo principalmente em meio LS+As, assim como em meio NS+As apresentaram baixos teores de glutathiona, quando comparadas a plantas crescendo em meio HS+As (Figura 9B). GSH é o principal tampão redox celular que mantém o ambiente intracelular reduzido (Zagorthev *et al* 2013). Normalmente, a relação GSH para GSSG é de cerca de 20: 1 em condições não estressadas, e essa relação tende à um aumento de GSSG após o estresse, como resultado da remoção de ROS em condições que comprometem a redução de GSSG a GSH (Szarka *et al* 2012). Esta mudança contribui para as vias de sinalização que levam à morte celular programada, um importante mecanismo de resistência ao estresse (Kranner *et al* 2010). Os menores valores de GSH em Ls+As demonstram que o stress oxidativo gerado pelo arsênio, associado a menor disponibilidade de enxofre e o menor acúmulo de GSH, contribuíram para o fenótipo observado em folhas de *E. crassipes*.

A biossíntese de GSH é dependente de ATP e compartimentalizada, sendo as enzimas que desencadeiam a síntese de glutathiona em *Arabidopsis thaliana*, codificadas por genes únicos que se encontram em cloroplastos e no citossol. GSH1 (γ -glutamylcisteína sintetase) catalisa a formação γ -glutamylcisteína(γ -EC) e é exclusivamente cloroplastidial (Wachter *et al* 2005), enquanto que GSH2 (glutathiona sintetase), adiciona glicina para a formação da molécula de GSH e pode ser encontrada tanto em cloroplastos quanto no citosol (Noctor *et al* 2002; Wachter *et al* 2005). Isto indica que os cloroplastos exportam γ -EC e são capazes de importar glutathiona do citosol através de transportadores específicos (Maughan *et al* 2010).

Cystenyglycina foi up regulada na presença do metal em LS e NS, sendo um importante metabólito formado durante a hidrólise de GSH por γ -glutamyltranspeptidase (Figura 4). Além disso, de acordo com Sarwar *et al* (2016), a redução no pool de GSH mitocondrial pode levar a níveis aumentados de ROS e espécies reativas de nitrogênio, ocasionando uma disfunção mitocondrial e a redução no pool de ATP. Isto, aliado a baixa disponibilidade de enxofre, podem contribuir ainda mais para níveis menores de GSH, contribuindo para a morte celular apoptótica e necrótica (Sarwar *et al* 2016).

Cys livre é muitas vezes irreversivelmente oxidada para diferentes subprodutos. Assim, a acumulação de Cys pode levar a uma perda de enxofre indesejável (Bashir *et al* 2012), o que potencialmente compromete os mecanismos de proteção contra estresse da planta, como em condições de baixa disponibilidade de enxofre. O aumento nos níveis de cystenyglycina pode significar uma tentativa de aumentar os níveis de GSH intracelular, haja vista a menor disponibilidade de enxofre, iniciando a degradação de GSH-conjugados (metais pesados) em vacúolos e apoplasto.

Cys é o produto final da assimilação de sulfato, sendo um metabólito central que serve como doador de enxofre para a síntese de clusters de ferro e enxofre, vitaminas como tiamina e biotina, de ácido lipóico e coenzima A, de GSH e proteínas contendo tiol e para a síntese de metionina. N-acetil cisteína (NAC), um produto da acetilação da cisteína e também foi up regulado na presença de arsênio nos meios contendo maior disponibilidade de enxofre (NS+As e HS+As), sendo considerado um metabólito VIP (Figura S3.2 e S5.2). Cystathionine, um intermediário na via de biossíntese de cisteínas foi up regulado, especialmente em meio HS+As (Figura S5.2). De acordo com Jahan *et al* (2014), NAC mantém a biossíntese de glutathione reduzida nas células. Além disso, NAC aumenta o teor de glutathione e mantém o estado redox celular nas células e promove um equilíbrio redox positivo dentro da célula (Medved *et al* 2003). Portanto, o NAC é um eliminador efetivo de radicais livres, bem como um dos principais contribuintes na manutenção do status de glutathione celular nas células (Kerksick & Willoughby 2005); Sarwar *et al* 2016).

4.4- Ácidos graxos atuam na percepção e/ou resposta ao estresse em folhas de *E. crassipes*

Ácidos graxos foram considerados metabólitos VIPs na distinção entre os tratamentos. Em plantas, ácidos graxos são geralmente ácidos carboxílicos de cadeia reta, com um número par de carbonos (Taiz & Zeiger 2013). O predomínio de ácidos graxos saturados em folhas dos meios LS+As e NS+As é um indicador de que a

biossíntese de ácidos graxos foi afetada pela presença do metal, especialmente em meio com baixa disponibilidade de enxofre. Hu *et al* (2014) ao avaliar o efeito de óxidos de grafeno sobre a fitotoxicidade do arsênio em trigo, relata que o incremento de ácidos graxos saturados é indicativo de redução na fluidez da membrana plasmática, o que indica que essas folhas crescidas em meios com menor disponibilidade de enxofre, sentiram mais os efeitos fitotóxicos do metal, como a peroxidação lipídica. Esfingosina foi um esfingolípido responsivo a presença do metal (Figura 7D). Michaelson *et al* (2016) relata que os esfingolípido são essenciais para as funções celulares básicas, incluindo organização e dinâmica da membrana, mas também para funções mais integradas pelo seu papel central na sinalização para a morte celular programada. Quando fosforilada, esfingosina foi associada ao fechamento de estômatos dependente de ABA (Coursol *et al* 2003).

Glicerol foi up regulado em folhas obtidas em meio com baixa disponibilidade de enxofre, especialmente em LS+As, que sentiram mais os efeitos fitotóxicos do metal (Figura 7C). O glicerol é um precursor do G3P (gliceraldeído-3-fosfato), um metabolito chave que transporta equivalentes redutores do citosol para as mitocôndrias para a fosforilação oxidativa e atua como a espinha dorsal dos glicerolípidos, importantes para a estabilidade de membranas celulares (Hu *et al* 2014), assim como são os esfingolípido.

4.5- Poliaminas são importantes na resposta ao estresse ocasionado por arsênio em *E. crassipes*

A biossíntese de GABA a partir de glutamato, mencionada anteriormente, envolve a enzima glutamato-descarboxilase, numa reação irreversível, ou a biossíntese a partir da degradação de poliaminas pela diamine oxidase (DAO) (Takahashi & Kakehi 2010). A degradação pela DAO envolve putrescina como substrato, que apesar de identificada, não foi considerada nete trabalho em função de critérios estabelecidos. Entretanto, Moschou *et al* (2008) relata que putrescina é principalmente sintetizada em raízes. Além disso, arginina, um dos precursores da biossíntese de putrescina, por ação da arginina descarboxilase, foi *down* regulado.

O catabolismo de poliaminas pode ocorrer por duas classes de enzimas, diamina oxidases contendo cobre (CuAOs) e poliaminas oxidases (PAOs) contendo FAD (Cona *et al*. 2006). As proteínas CuAO estão presentes em dicotiledôneas, especialmente nas espécies de Fabaceae (Cona *et al* 2006) catalizando a oxidação de putrescina e cadaverina. Em contraste, PAOs são mais abundantes em monocotiledôneas e tem alta

afinidade por espermina e espermina (Alcázar *et al* 2010). Num contexto inverso, espermidina, que por ação de PAOs poderia originar putrescina, por ação de espermidina sintase, poderia formar espermidina, que pode ainda originar espermina, pela ação da espermina sintase, ambas ativadas com auxílio de dcSAM (S-adenosilmetionina descarboxilase) (Liu *et al* 2015).

Em *E. crassipes*, uma monocodiledônea, os níveis de espermina foram regulados positivamente na presença do metal, enquanto que espermidina foi negativamente regulada (Figura S5.2). Isto pode significar que metionina esteja sendo utilizada para a formação de SAM (S-adenosilmetionina), sendo importante para a “*up*” regulação de espermina. Metionina foi fortemente reduzida em folhas crescendo sobre menor disponibilidade de enxofre (LS+As e NS+As), podendo ter sido rapidamente convertida nas horas iniciais de estresse (Figura S5.2). Metionina pode intermediar a biossíntese de poliaminas em resposta a diferentes stress. Esta via biossintética envolve a S-adenosilmetionina (SAM) como dador de metil, o que também produz S-adenosil-L-homocisteína que é metabolizada para eventualmente regenerar metionina.

Groppa & Benavides (2008) ressaltam que as poliaminas estão envolvidas na resposta ao estresse e na tolerância a quase todos os tipos de estresse abiótico, como sal, seca, refrigeração, UV, metal, ozônio, feridas e, em geral, estresse oxidativos. A acumulação de poliaminas, livre ou conjugada, em resposta ao estresse abiótico e à indução das enzimas envolvidas na sua síntese foram relatadas em vários estudos de caso, revisados por Alcázar *et al* (2010). Mais importante ainda, a biossíntese de poliaminas não consome enxofre e pode ser realizada em uma biossíntese independente do SAM, portanto, pode ocorrer em condições de enxofre limitado, contudo, não sendo observado em nossos resultados.

De acordo com Liu *et al* (2015), o catabolismo de poliaminas pode produzir níveis baixos de H₂O₂ que podem atuar como sinalizadores de estresses. Em altos níveis de ROS, poliaminas podem ativar mecanismos de resposta, como atuarem diretamente como antioxidantes e evitar ROS, embora não haja evidência desse mecanismo no momento. Em segundo lugar, as PAs podem afetar os sistemas antioxidantes (Shi *et al* 2010; Xu *et al* 2011; Zhang *et al* 2015). Liu *et al* (2015) salienta que de acordo com Mitsuya *et al* (2009), espermina pode atuar ainda como uma molécula sinalizadora de estresse. Marco *et al* (2011) ressalta ainda que poliaminas participam ativamente da sinalização mediante o stress numa intrincada rede entre poliaminas, ABA, giberilinas e cálcio. Aqui, identificamos que giberelinas (GA3)

tiveram sua intensidade aumentada durante o stress (Figura 4), assim como o ácido abscísico (ABA) (dados não mostrados graficamente).

A atividade de uma transaminase pode converter alanina em beta-alanine, numa reação reversível em eucariotos. A reação inversa, com conversão de beta-alanine em malonato semialdeído, permite a formação de alanina. Outra possibilidade é a oxidação de poliaminas pelas PAOs. No entanto, alanina foi regulada de maneira positiva e beta-alanine, negativamente, reduzindo sua intensidade em folhas de *E. crassipes* na presença de arsênio (Figuras 4 e 2B, respectivamente). É provável que os maiores teores de alanina encontrados em meio HS sejam influenciados pelo teor de arsênio acumulado. Por outro lado, pode ser que o papel de PAs sobre os sistemas antioxidantes estejam prejudicando a biossíntese de beta-alanine, ou até mesmo a biossíntese de ácidos graxos, associado a própria demanda já discutida anteriormente por esqueletos de carbono em função de ciclos respiratórios fúteis. Uma outra possibilidade pode ser uma questão temporal, relacionada ao tempo de exposição ao metal e o período de coleta, conforme apontado por Bielecka *et al* (2015).

4.6 - Enxofre e arsênio alteram o metabolismo do glioxilato e a fixação de carbono

Arsênio trouxe mudanças para o metabolismo do glioxilato e para a fixação de carbono. Para que ocorra a biossíntese de ácidos graxos, duas moléculas contendo enxofre estão envolvidas, acetil-CoA e a proteína transportadora de acil (Nikiforova *et al* 2005). Assim, além da presença do metal, limitações na disponibilidade de metabólitos contendo enxofre, quando sulfato é ofertado em menores quantidades, podem alterar ainda mais a biossíntese de ácidos graxos. Além disso, a inibição gerada pelo metal sobre o complexo piruvato desidrogenase, pode ter sido acompanhada pela beta-oxidação de ácidos graxos, numa tentativa de reestabelecer os níveis de succinato.

A taxa respiratória em *E. crassipes* foi elevada na presença do metal. Moore *et al* (1983) relatou que o aumento da respiração em plantas expostas ao arsênio é provavelmente o resultado da similaridade química entre o fosfato e o arsenato, que competem pelo mesmo local ativo da ATP sintetase mitocondrial (Figuras 11A e 11B). No entanto, Farnesse *et al* (2017) afirma que em *P. stratiotes* expostas ao arsênio, o aumento das taxas respiratórias não foi acompanhado da restauração da homeostase celular, não contribuiu para a restauração das taxas de fotossíntese ou para diminuir a concentração de ROS ou para a manutenção da estrutura celular, conforme demonstra o fenótipo de folhas de *E. crassipes* quando estressadas.

De fato, folhas em meio LS+As mostraram-se com maiores taxas respiratórias, mesmo sob condições de menor acúmulo de arsênio. Do outro lado, valores similares encontrados em NS+As e HS+As podem ser muito mais um reflexo da taxa de arsênio absorvido, do que a de enxofre disponível. o que pode significar que a maior disponibilidade de enxofre foi essencial para aumentar a capacidade tamponante em meios HS+As, mesmo com maior acúmulo de metal.

Tripath *et al* (2012) relata que no primeiro trabalho de proteômica em folhas de arroz estressadas por arsenato, juntamente com respostas bioquímicas e fisiológicas foi realizado por Ahsan *et al* (2010), foram encontradas proteínas relacionadas ao metabolismo energético reguladas positivamente, como a enzima málica e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, sugerindo que é necessária uma quantidade aumentada de energia para se adaptar ao estresse.

Malato, é a forma ionizada (ânion) do ácido málico, regulado de maneira positiva na presença do arsênio (ácido málico fica armazenado em vacúolos), e pode ser utilizado numa tentativa de restabelecer os níveis de piruvato, *down* regulado na presença do metal (Figura S5.2). De acordo com Daloso *et al* (2015) a luz, a inibição da succinato desidrogenase e fumarase aumentam os níveis de malato. O malato, em muitas plantas, é o ácido mais acumulado e pode participar da transferência de equivalentes redox entre compartimentos celulares (Geigenberger & Fernie 2011; Maurino & Engqvist 2015).

Com isoformas localizadas no citosol e/ou plastídios, a enzima málica dependente de NADP plastidial é importante na biossíntese de lipídios, fornecendo esqueletos de carbono e poder de redução, enquanto que as isoformas citossólicas possuem função de defesa (Wheeler *et al* 2005). Já as isoformas dependentes de NAD, estão localizadas em mitocôndrias e são necessárias por catalizar a descarboxilação oxidativa do malato, formando piruvato (Chang & Tong 2003).

Uma das possíveis explicações para esse desbalanço entre ácido málico e outros ácidos, conforme relatado sobre o pirúvico, possa ser atribuído ao efeito observado de arsenato sobre uma proteína, DIC2 (portador de dicarboxilato 2) descrita para *Arabidopsis thaliana* quando tratada com arsenato (Palmieri *et al* 2008), podendo ter isoforma similar em *E. crassipes*. Essa proteína é transportadora de substrato mitocondrial e foi *down* regulada (Abercrombie *et al* 2008). Segundo ele, DIC2 está localizado na membrana mitocondrial interna e é provável que troque Pi, sulfato ou AsV por vários dicarboxilatos. Essa repressão poderia ter afetado a troca de malato /

oxaloacetato catalisada por DIC2, associada a uma possível baixa atividade da enzima malato desidrogenase, citostáticas e mitocondriais, dependente de NAD⁺, permitindo o fluxo de equivalentes redox de um compartimento para outro (Palmieri *et al* 2008). Assim, o AsV que interage com o DIC2 pode ter um impacto negativo no equilíbrio redox entre a matriz mitocondrial e o citossol, inibindo a troca eficiente de malato / oxaloacetato, haja vista que oxaloacetato foi *down* regulado durante o stress (Figura S5.3).

4.7- Acúmulo de açúcares é essencial na resposta ao estresse

Um dos mecanismos mais utilizados em plantas para minimizar os efeitos causados por estresses é o acúmulo de solutos compatíveis (Obata & Fernie 2012). A sacarose é um importante açúcar de transporte na maioria das espécies de plantas e é conhecido por se acumular em condições de estresse, tendo sido considerada um metabólito VIP em *E. crassipes*. Sacarose se acumulou principalmente nos tratamentos contendo menor teor de enxofre e arsênio (Figura S4.2 e S5.2), mas com maiores sintomas de toxidez. *E. crassipes*, opta por essa estratégia ao invés de acumular prolina, que pode ter efeito fitotóxico em altas concentrações (Nanjo *et al* 2003). Plantas de *Arabidopsis* tratadas com Cd apresentaram níveis aumentados de alanina, sacarose e outros metabolitos com propriedades compatíveis com soluto compatível, notadamente GABA, rafinose e trealose (Sun *et al* 2010). Trealose foi acumulada em folhas de *E. crassipes* contendo maior disponibilidade de enxofre, principalmnete na presença do metal (HS, NS+As e HS+As), especialmente em plantas que acumularam mais arsênio (Figura 4 e S5.2).

Sengupta *et al* (2015) relata que o estresse abiótico induz a expressão diferencial de genes responsáveis pela síntese da família de oligosacarídeos da rafinose (RFOs) nas plantas. Rafinose é um açúcar sintetizado a partir de sacarose e conhecido por proteger células de plantas como um osmoprotetor. Este grupo de oligossacarídeos é encontrado em plantas e é conhecido por servir, dentre outras coisas, como açúcares de armazenamento. RFOs são descritos como os mais difundidos oligossacarídeos contendo D- galactose em plantas superiores. Galactinol foi up regulado na presença do metal, assim como melibiose nos meios NS+As e LS+As (Figura S5.2). RFOs tem propriedades benéficas de um soluto compatível, onde estudos *in vitro* afirmam que as RFOs se inserem dentro dos grupos lipídicos da bicamada de membrana e estabilizam-na quando as condições de ruptura prevalecem (Hincha *et al* 2003; Sengupta *et al* 2015).

Em geral, um aumento induzido pelo estresse nos níveis de maltose, uma redução na quantidade de glicose-6-fosfato (G6P) podem ser indícios fortes de problemas no fluxo de carbono (Kempa *et al* 2008). Maltose e isomaltose tiveram aumentadas sua intensidade na presença do metal, enquanto que G6P foi reduzida (regulada -) na presença de arsênio em folhas de *E. crassipes* (Figura 5S.2).

Xylose foi considerada um metabólito VIP, acumulada em meios LS+As e NS+As (Figuras 7B e S3.1 e S3.2). Xylose é um monômero encontrado na hemicelulose. Os relatos até o momento, atribuem a hemicelulose um papel de destaque na composição da parede celular, podendo chegar a 48% em aguapé (Kumar *et al* 2009; Mishima *et al* 2008; Gunnar-sson & Petersen 2007; Nigam 2002). Uma estratégia de células de plantas para lidar com metais pesados é removê-los do protoplasto por seqüestro em compartimentos extra-citoplasmáticos, como a parede celular (Krzeslowska 2011; Ovecka & Takáč 2014). De acordo com Gall *et al* (2015), estudos anteriores indicam que a lignificação pode ser uma passo importante na redução do crescimento em plantas expostas ao estresse produzidos por ROS, induzido pela exposição ao arsenato. Logo, como plantas em meio LS+As e NS+As sentiram mais a toxicidade do metal, o acúmulo de xylose parece ser uma tentativa de amenizar a toxidez.

Alose é considerado um açúcar raro e foi regulado de forma positiva em folhas LS+As (Figura 5S.2). De acordo com Fukumoto *et al* (2011), D -alose, que é o epímero de D-glucose em C3, tem um efeito inibitório sobre o crescimento do arroz, atuando especificamente sobre genes responsivos a giberelinas, inibindo por exemplo, o alongamento da folha, suprimindo a sinalização da giberelina através da via dependente da hexoquinase em *Oryza sativa* L. A baixa disponibilidade de enxofre, associado a toxidez do metal podem acentuar efeitos sobre o crescimento, podendo a alose desempenhar um papel crucial na percepção e resposta ao estresse em *E. crassipes*, assim como revelado em arroz, além de *E. crassipes* apresentar giberelinas up reguladas na presença do metal.

4.8- Metabólitos secundários ajudam a compreender a reprogramação metabólica em folhas de *E. crassipes*.

Arsênio induz a produção de diferentes metabólitos secundários, que em sua maioria parecem auxiliar na regulação da homeostase redox, principalmente sob maior disponibilidade de enxofre, podendo também ser considerados como sinalizadores e biomarcadores de estresse abiótico em folhas de *E. crassipes*. Metabólitos regulados de

maneira positiva na presença de arsenato nos ajudam a compreender a dinâmica metabólica após o estresse em diferentes condições de oferta de enxofre.

Melatonina, ou melhor, 6-hidroxi-melatonina foi identificada em folhas de *E. crassipes* após serem estressadas por arsenato, estando mais intensa nos meios com maior disponibilidade de enxofre e acúmulo de arsênio (HS e NS) (Figura 5S.2). Hardeland (2016) relata que nos últimos anos, estudos transcriptômicos, proteômicos e metabolômicos realizados em diferentes plantas, como *Arabidopsis thaliana* (Weeda *et al.*, 2014 ; Qian *et al.*, 2015), *Malus hupehensis* (Wang *et al.* 2012) e *Cynodon dactylon* (Shi *et al.* 2015) revelaram uma infinidade de alterações induzidas pela melatonina na expressão de genes nos níveis de mRNA e proteína, o que indica um papel pleiotrópico e orquestral de melatonina que remete ao conhecido de animais (Hardeland *et al.* 2012). Alguns desses efeitos pleiotrópicos, incluem a regulação do crescimento e fator morfogenético, em termos de efeitos semelhantes a auxina e como uma molécula de sinalização que modula vias de etileno e dos ácidos abscísico, jasmônico e salicílico.

Hardeland (2016) relata ainda que a hidroxilação não enzimática de melatonina pode se dar pelas interações com radicais livres de maior reatividade, geralmente radicais hidroxilos ($\cdot\text{OH}$), por exemplo, por ações seqüenciais de dois $\cdot\text{OH}$ ou outro radical livre de hidrogênio combinado com ($\cdot\text{OH}$), haja vista que o caminho clássico da biossíntese de melatonina é partir do triptofano, que após ser descarboxilado (TDC-triptofano descarboxilase), sofreria uma hidroxilação enzimática da amina (T5H-triptofina-5-hidroxilase), antes de originar o produto final, a melatonina (n-acetilação e o-metilação seriam etapas seguintes a descarboxilação). Como triptofano foi *down* regulado na presença do arsênio conforme mostram os dados do metaboloma de folhas de *E. crassipes* (Figura 4), melatonina parece ser mais um metabólito atuando com propriedades antioxidantes em folhas com maior disponibilidade de enxofre e/ou arsênio. Para Arnao & Hernandez-Ruiz (2015), ela atuaria como um eliminador de radicais livres e eficazes contra ROS (espécies reativas de oxigênio) e RNS (espécies reativas de nitrogênio), comportando-se como um coletor generoso de oxigênio reativo e espécies de nitrogênio reativas.

Wei *et al.* (2015), ao analisar um transcriptoma para avaliar os efeitos da melatonina no crescimento e no desenvolvimento da soja, observou o aumento na expressão do gene de ferredoxina PetF. Ferridoxina regula a quantidade de ascorbato reduzido, importante no combate a ROS e protege a clorofila da degradação (Lin *et al.*, 2013). OS genes VTC4 e APX4, envolvidos no metabolismo do ascorbato e os genes

PsbO e PsbP, importantes para o funcionamento do fotossistema II, foram também up-regulados pela melatonina. Promoveu ainda a expressão do gene da síntese de trealose em folhas de soja. A trealose é um carboidrato importante que ajuda as plantas a preservar sua integridade celular sob vários estresses (Jain & Roy 2009).

Nossos resultados em folhas de *E. crassipes* mostram que trealose foi up regulada em folhas obtidas em meios com maior disponibilidade de enxofre, especialmente em meio HS+As, onde o teor de 6-hidroxi melatonina foi mais elevado (Figura 5S.2). Isto nos dá indícios de que em folhas de *E. crassipes*, melatonina possa estar também relacionada com o metabolismo de carboidratos. A utilização de mutantes pode ser crucial para melhorar a compreensão do “Cross-talk entre enxofre, arsênio, melatonina e vias afetadas.

Por fim, além de 2-hidroxel melatonina, apenas um produto hidroxilado da melatonina havia sido descoberto em plantas, a saber, a 4-hidroxel melatonina, que não constituiu mais de 0,05% desses metabólitos, enquanto que a 6-hidroxel melatonina, principal metabólito em animais, agora identificada em folhas de *E. crassipes* estressadas por arsênio, havia ficado abaixo do limite de detecção em arroz (Byeon *et al* 2015).

Compostos como fenilpropanóides estão envolvidos na indução de expressão gênica, caminhos de transdução de sinal e homeostase metabólica em plantas em condições ambientais adversas para modular as respostas de estresse para estratégias de sobrevivência (Singh *et al* 2011). Piceatannol é um análogo do resveratrol, com adição de um grupo fenólico e que possui aplicações na medicina do câncer, sendo considerado também um forte antioxidante, capaz de induzir também o aumento da razão GSH/GSSH (Piotrowska *et al* 2012). Ele foi mais um metabólito secundário que teve sua intensidade elevada na presença de arsênio, especialmente em folhas obtidas em meio HS, onde inclusive os níveis de glutatona total foram mais elevados (Figura 5S.2). Isso demonstra que Piceatannol possa vir a ser utilizado como um marcador do pool de glutatona em *E. crassipes* mediante o estresse por arsênio.

Compostos fenólicos, além de suas propriedades antioxidantes, são vistos também como biomarcadores da exposição a metais (Marquez-Garcia *et al* 2012). Ácido cafeico foi considerado um metabólito VIP, notadamente elevado em folhas de *E. crassipes* cultivadas em meio LS+As, onde o processo de morte celular foi mais atuante (Figura 7F). Ácido quínico (Figura 2E) e ácido cinâmico (Figura 5S.2) foram outros dois compostos fenólicos com intensidades elevadas na presença do metal. Ácido

cinâmico, outro metabólito regulado positivamente em meio HS+AS, é conhecido por ser um dos fenilpropanóides básicos com atividade antioxidante, produzido por plantas em resposta a condições estressantes (Singh *et al* 2013). Ésteres formados entre os derivados do ácido cinâmico, como o ácido cafeico, e os ácidos quínicos dão origem aos ácidos clorogênicos, com propriedades antioxidantes também (Ncube *et al* 2014).

Em folhas de *E. crassipes*, ácido quínico foi um metabólito responsivo ao estresse por arsenato, sendo regulado positivamente. De acordo com Rivas-Ubach *et al* (2012), ele é um precursor da via do ácido shikímico, uma via metabólica comum na biossíntese de aminoácidos aromáticos, como a tirosina e a fenilalanina que são precursores de flavonóides. Sua capacidade antioxidante resulta de sua alta reatividade com o H ou doadores de elétrons.

Morin é um membro da família dos flavonóides e teve sua intensidade elevada em folhas cultivadas em meio LS+As e NS+As (Figura 5S.2). Existem inúmeros relatos da utilização de flavanóides como agentes antioxidantes, com aplicações na medicina, onde morin recebe destaque em função de sua capacidade de reduzir a peroxidação lipídica, diminuir o nível ROS, manter a integridade mitocondrial, inibir a liberação de proteínas apoptóticas das mitocôndrias e impedir a fragmentação do DNA (Cavallini *et al* 1978; Fraga *et al* 1987; Ratty *et al* 1988; Ricardo *et al* 2001; Kapoor *et al* 2012). Lee *et al* (2017) relata que a aplicação de morin em fibroblastos de ramsters recupera a viabilidade celular danificada pelo H₂O₂ por meio da inibição da apoptose mediada por disfunção mitocondrial. Morin é rotineiramente utilizada para marcação de alumínio em apoplasto de raízes (Zhu *et al* 2013). Miricetin é um outro flavanóide up regulado na presença de arsênio, especialmente em folhas de *E. crassipes* cultivadas em meio com baixa oferta de enxofre (LS) (Figura 5S.2).

Tanto Morin quanto Miricetin parecem atuar em folhas aonde a disponibilidade de enxofre é menor. Nessas folhas, a morte celular dos tecidos foliares proporcionado pelo estresse oxidativo está mais intenso do que em folhas obtidas no meio HS. Isto poderia ser o fator desencadeador na produção destes metabólitos. Nikiforova *et al* (2005) ao analisar um transcriptoma em *Arabidopsis thaliana* após a privação de enxofre relatou que flavanóides seriam metabólitos produzidos também em resposta a fome de enxofre. De acordo com Manan *et al* (2015), os flavonóides, juntamente com alguns outros fenólicos, contribuem para as atividades antioxidantes gerais das plantas, sendo também capazes de atenuar a toxicidade de metais, principalmente devido às suas propriedades redox. Kumar *et al* (2014) destaca ainda que seja provável que em plantas

os flavonóides possam ser responsáveis pela mediação de cascatas de sinalização induzidas por ROS, vitais para o crescimento e diferenciação de células sob condições adversas, o que poderia também ser considerado aqui.

Alcalóides parecem desempenhar um papel na sinalização em resposta ao estresse ocasionado por arsenato em folhas de *E. crassipes*. A acumulação de alcalóides pode se dar em resposta a diferentes mudanças na homeostase da planta, como ataque de herbívoros, agentes patogênicos ou estresses abióticos (Matsuura *et al* 2014). O metaboloma de *E. crassipes* detectou elevação na intensidade dos alcaloides Menthol em LS+As e Senecionina, um alcalóide registrado aqui pela primeira vez em *E. crassipes* em resposta ao estresse em folhas de ambos os tratamentos contendo arsênio (Figura 5S.2). Ele é produzido em raízes no gênero *Senecio*, aonde já havia sido identificado, sendo transportado até a parte aérea (Ehmke *et al* 1998).

A produção de alcaloides como senecionina e menthol durante o estresse ocasionado por arsênio, especialmente em LS+As pode estar relacionada com atividades biossintéticas que consomem equivalentes de redução. Wilhelm & Selmar (2010) comentam que a principal questão relacionada à energia que as plantas enfrentam diz respeito à dissipação de energia excedente sem danificar a maquinaria fotossintética. Menthol poderia estar atuando em resposta ao estresse oxidativo em maior amplitude em LS+As, conforme mostra a figura 12. Além disso, senecionina poderia também ser utilizada como um biomarcador de stress, atuando com um agente sinalizador da presença do metal. Selmar & Kleinwächter (2013) relatam que a síntese de compostos reduzidos durante o estresse hídrico em plantas medicinais ocorre devido ao fechamento estomático, levando a uma diminuição significativa na absorção de CO₂. Como resultado, o consumo de equivalentes de redução (NADPH + H⁺) para a fixação de CO₂ através do ciclo de Calvin diminuiu consideravelmente, e que como consequência, ocorre a síntese de compostos reduzidos, como isoprenóides, fenóis ou alcalóides.

5 - Considerações Finais

As respostas de estresse são manifestadas por uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, essenciais para aprimorar o mecanismo evolutivo de vegetais. O reabastecimento de enxofre, após uma fome induzida, permitiu uma intensa reprogramação metabólica em folhas de *E. crassipes*, desvendando novos metabólitos, diferentes vias metabólicas alteradas e suas

interconexões, ampliando a compreensão sobre a percepção e resposta aos efeitos da toxicidade do arsênio.

O estresse oxidativo induzido por arsênio desencadeia diferentes vias de sinalização que afetam a produção de metabolitos específicos da planta, conforme demonstrado aqui neste trabalho. Espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante o estresse pelo arsênio levam a peroxidação lipídica que estimula a formação de compostos de sinalização altamente ativos capazes de desencadear a produção de compostos bioativos (metabolitos secundários) que melhoram o valor agregado, incluindo o medicinal da planta. Além disso, é possível perceber que alguns outros compostos com valor agregado, como Xilose, que é objeto de pesquisas em *E. crassipes* na tentativa de geração de biocombustíveis, e teve sua intensidade elevada na presença de arsênio.

O metaboloma indica ainda a participação efetiva de metabólitos relacionados a fitormônios, como giberelinas, ABA, jasmonatos e auxinas, merecendo serem investigados mais detalhadamente. Além disso, a maior oferta de enxofre propicia uma melhor adaptação ao estresse ocasionado pela presença de arsenato em solução, com auxílio do metabolismo secundário, ampliando a sua capacidade de fitorremediação do ambiente.

6- Referências

Abercrombie J. M., Halfhill M. D., Ranjan P., Rao M. R., Saxton A. M., Yuan J. S., Stewart C. N., Jr. (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As(V) stress. *BMC Plant Biol.* 8, 87.10.1186/

Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M. & Koncz C. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*.

Allan J. E. (1969) The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectrometry. *Varian Techtron Bulletin* 12/69, 15p.

Andrade H.M. ; Oliveira, J. A. ; Netto, J.L. ; Cambraia, José & Farnese, F.S.(2012). Does nitric oxide activate antioxidant enzymes in plants exposed to arsenic? *Proceedings of the ICCB - Cell Biology*, v. 1, p. 91-94, 2012.

Andrade H. M., Oliveira J. A., Farnese F. S., Ribeiro C.; Silva A. A., Campos, F. V. & NETO, J. L. (2016) Arsenic toxicity: cell signalling and the attenuating effect of nitric

oxide in *Eichhornia crassipes*. *Biologia Plantarum* (Praha), v. 60, p. 173-180.

Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Hossain M.A., Thangavel M, Roychoudhury A., Gill S.S., Rodrigo M.A.M., Adam V., Fujita M., Kizek R., Duarte A.C., Pereira E. & Ahmad I.(2015). Jacks of metal/metalloid chelation trade in plants—an overview. *Front Plant Sci.*; 6: 192.

Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, Leaver CJ & Fernie AR (2010). Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Cell*. May;22(5):1549-63.

Araújo W.L., Tohge T., Osorio S.; Lohse M., Balbo I. & Krahnert I. (2012b). Antisense inhibition of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in tomato demonstrates its importance for plant respiration and during leaf senescence and fruit maturation. *Plant Cell* 24, 2328–2351.

Araújo W.L., Martins A.O., Fernie A.R. & Tohge T. (2014). 2-Oxoglutarate: linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*. v.05- n°552.

Arnao M.B. & Hernandez-Ruiz J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *Journal Pineal Res*; 59:133–150

Ahsan N., Lee D. G., Kim K. H., Alam I., Lee S. H. & Lee K. W. (2010). Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere* 78, 224–231. 10.1016

Bai J. Xu D.H., Kang H.M., Chen K. & Wang G. (2008). Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* different levels of drought stress in natural high irradiance.

Bashir H., Ahmad J., Bagheri R., Nauman M., Qureshi M.I. (2012). Limited sulfur resource forces *Arabidopsis thaliana* to shift towards non-sulfur tolerance under cadmium stress. *Environ. Exp. Bot.*

Bych K, Kerscher S, Netz DJA, Pierik AJ, Zwicker K, Huynen M. A., Lill R., Brandt U. & Balk J. (2008). The iron–sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *EMBO J*. Jun 18; 27(12): 1736–1746

Bielecka M, Watanabe M, Morcuende R, Scheible WR, Hawkesford MJ, Hesse H, Hoefgen R (2015) Transcriptome and metabolome analysis of plant sulfate starvation and resupply provides novel information on transcriptional regulation of metabolism associated with sulfur, nitrogen and phosphorus nutritional responses in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 5:805

- Bo Peng, Hui Li, & Xuan-Xian Peng (2015). Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein Cell. Sep*; 6(9): 628–637.
- Byeon Y. & Back K. (2015). Molecular cloning of melatonin 2-hydroxylase responsible for 2-hydroxymelatonin production in rice (*Oryza sativa*). *J. Pineal Res.* 58 343–351.
- Cánovas FM. (2009) Molecular modeling and site-directed mutagenesis reveal essential residues for catalysis in a prokaryote-type aspartate aminotransferase. *Plant Physiol* 149: 1648–1660
- Cavallini, L.; Bindoli, A. and Siliprandi, N. (1978), Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. *Pharmacol. Res. Commun.* 10, 133-136
- Chang G.G. & Tong L. (2003). Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry.* Nov 11;42(44):12721-33
- Clark R. B., (1975). Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.* 23, 458-460
- Coursol S., Fan L.M., Le Stunff H., Spiegel S., Gilroy S. & Assmann S.M.(2003). Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature.* ;423(6940):651–654
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defense. *Trends in Plant Science.* 11:80–88
- Daloso D. M., Müller K., Obata T., Florian A., Tohge T. & Bottcher A. (2015). Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 E1392–E1400. 10.1073
- Davies K.J., Delsignore M.E. & Lin S.W. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals II Modification of amino acids. — *J. biol.Chem.* 262: 9902–9907
- Dixit G, Singh AP, Kumar A, Dwivedi S, Deeba F, Kumar S, Suman S, Adhikari B, Shukla Y, Trivedi PK, Pandey V & Tripathi RD (2015). Sulfur alleviates arsenic toxicity by reducing its accumulation and modulating proteome, amino acids and thiol metabolism in rice leaves. *Sci Rep.*; 5: 16205.
- de-la-Torre F; Cañas RA; Pascual MB; Francisco C A & Cánovas M (2014). Plastidic aspartate aminotransferases and the biosynthesis of essential amino acids in plants *Journal de Botânica Experimental.* Volume 65, 19- 1; pag. 5527-5534.
- Ehmke A, von Borstel K & Hartmann T.(1998).Alkaloid N-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta.* 1988 Nov;176(1):83-90
- Engqvist M, Drincovich MF, Fluegge UI & Maurino, V.G (2009). Two D-2-hydroxy-acid dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* with catalytic capacities to participate in

the last reactions of the methylglyoxal and beta-oxidation pathways. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 25026–25037

Eprintsev A. T., Fedorin D. N., Sazonova O. V. & Igamberdiev A. U. (2016). Light inhibition of fumarase in *Arabidopsis* leaves is phytochrome A-dependent and mediated by calcium. *Plant Physiol. Biochem.* 102 161–166. 10.1016

Ernest W.H. (1998). Sulfur metabolism in higher plants: potential for phytoremediation. *Biodegradation*.9 (3-4):311-8.

Farnese, F. S.; Oliveira, J. A.; Paiva, E.A.S; Menezes-Silva, P. E.; da Silva, A. A.; Campos, F.V. & Ribeiro, C. (2017). The Involvement of Nitric Oxide in Integration of Plant Physiological and Ultrastructural Adjustments in Response to Arsenic. *Front Plant Sci.* 2017; 8: 516.

Farnese F.S. ; Menezes-Silva P. E.; Gusman G.S. & Oliveira, J. A. (2016). When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 471

Fraga, C. G.; Martino, V. S.; Ferraro, G. E.; Coussio, J. D. and Boveris, A. (1987), Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. *Biochem. Pharmacol.* 36, 717-720

Finnegan, P. A. & Chen, W (2012). Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Frontiers Physiology*; 3: 182.

Foyer C. H. & Noctor G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *PlantPhysiol.* 155, 2–18

Fukumoto T, Kano A, Ohtani K, *et al.* 2011. Rare sugar d-allose suppresses gibberellin signaling through hexokinase-dependent pathway in *Oryza sativa* L. *Planta* 234, 1083–1095

Gall H. L.; Philippe F.; Domon, Jean-Marc; Gillet F; Pelloux, J. & Rayon C. (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress *Plants* (Basel). 4(1): 112–166

Geigenberger P., Fernie A. R. (2011). Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antiox. Redox Signal.* 21 1389–1421. 10.1089

Gibbons H, O’Gorman A, Brennan L. (2015). Metabolomics as a tool in nutritional research. *Curr Opin Lipidol.* 26:30–34

Giri A. K. & Patel R. K. (2012) Phytoaccumulation Potential and Toxicity of Arsenic Ions by *Eichhornia Crassipes* in Hydroponic System.

Groppa, M.D. & Benavides M.P. (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advance. *Amino Acids*.v.34, p.35-45.

Gupta D. K., Inouhe M., Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M. C., Sandalio L. M.

(2013). Oxidative stress and arsenic toxicity: role of NADPH oxidases. *Chemosphere* 90 1987–1996.

Gunnarsson, C. C. & Petersen, C. M. (2007). Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: A literature review. *Waste Manag.*, 27(1), 117-129.

Hardeland R, Madrid JA, Tan DX, Reiter RJ. 2012. Melatonin, the circadian multi oscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *Journal of Pineal Research* 52, 139–166.

Hardeland R. (2016). Melatonin in Plants – Diversity of Levels and Multiplicity of Functions. *Front Plant Sci.* 2016; 7: 198.

Helms JB, Kaloyanova DV, Strating JR, van Hellemond JJ, van der Schaar HM, Tielens AG, van Kuppeveld FJ, Brouwers JF. (2015). Targeting of the hydrophobic metabolome by pathogens. *Traffic.* 16:439–460.

Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL & Braun HP.(2015) Amino Acid Catabolism in Plants. *Amino Acid Catabolism in Plants.* Volume 8, Issue 11, p1563–1579

Hincha D. K., Zuther E., Heyer A. G. (2003). The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta* 1612, 172–177. 10.1016

Howarth R.W. (2008). Coastal nitrogen pollution: A review of sources and trends globally and regionally. *Harmful Algae.* 8:14-20

Hu, X.; Kang, J.; Lu, K.; Zhou, R.; Mu, Li. & Zhou, Q. (2014). Graphene oxide amplifies the phytotoxicity of arsenic in wheat. *Scientific Reports.* 4-6122

Ibrahim,H.S, Ammar,N. S., Soylak M & Ibrahim, M. (2012).Removal of Cd (II) and Pb (II) from aqueous solution using dried water hyacinth as a biosorbent *Spectrochim. Acta A Mol Biomol. Spectrosc.*, 96, pp. 413-420

Jain, N.K. & Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci* 18, 24–36.

Jahan MS, Nozulaidi M, Khandaker MM, Afifah A and Husna N (2014) Control of plant growth and water loss by a lack of light-harvesting complexes in photosystem-II in *Arabidopsis thaliana* ch1-1 mutant. *Acta Physiology Plantarum* 36, 1627-1635

Jayaweera M.W., Kasturiarachchi J.C., Kularatne R.K. & Wijeyekoon S.L (2007). Removal of aluminium by constructed wetlands with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*(Mart.) Solms) grown under different nutritional conditions *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, 42 (2), pp. 185-193

Jayaweera M. W., Kasturiarachchi J.C., Kularatne R.K. & Wijeyekoon S.L (2008). Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under

different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands

J. Environ. Manage., 87 (3) (2008), pp. 450-460.

Justyna Mierziak; Kostyn, K.J. & Kulma, A. (2014). Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment and Molecules. 19, 16240-16265.

Joshi V., Joung J.G., Fei Z.J. & Jander G. (2010). Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress amino acids. 39:933-947.

Kapoor, R. & Kakka, P., (2012). Protective Role of Morin, a Flavonoid, against High Glucose Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Primary Rat Hepatocytes. PLoS ONE 7(8).

Kempa S., Krasensky J., Dal-Santo S., Kopta J. & Jonak C. (2008). A Central Role of Abscisic Acid in Stress-Regulated Carbohydrate Metabolism. Plos one. 3(12): e3935.

Kerksick C, Willoughby D (2005). The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. Journal of International Society of Sports Nutrition 2, 38-44.

Kranner I., Minibayeva F.V., Beckett R.P., Seal C.E. (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. New Phytol. ;188: 655–673.

Krzyszowska, M. (2011) The wall cell in plant cell response to trace metals: Polysaccharide remodelling and its role in defense strategy. Acta Physiol. Plant. 33:35–

Kumar, A., Singh, L. K. & Ghosh, S. (2009). Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichiastipitis*. Bioresour. Technol., 100(13), 3293-3297.

Kumar B, Prakash A, Ruhela RK & Medhi B. (2014) Potential of metabolomics in preclinical and clinical drug development. Pharmacol Rep. 66:956–963.

Larcher W. (1983) Physiological Plant Ecology. Springer-Verlag. Berlin.

Lea P.J. & Azevedo R.A. (2007). Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. Annals of Applied Biology. 151,269–275.

Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry PR, Halford NG. (2007). Asparagine in plants. Ann Appl Biol 150: 1–26

Leão G.A., Oliveira J.A., Felipe R.T.A. & Farnese F.S. (2017). Phytoremediation of arsenic-contaminated water: the role of antioxidant metabolism of *Azolla caroliniana* Willd. (Salviniales). Acta Botanica Brasilica, v. 31, p. 1-8,

Leão G.A. ; Oliveira, J.A. ; Farnese, F.S. ; Gusman, G.S. & Felipe, R. T. A.(2014) . Sulfur metabolism: Different tolerances of two aquatic macrophytes exposed to arsenic.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 105, p. 36-42.

Lee M. H.; Cha Hee Jae, Choi E. O.; Kim, S. O.; Kim, Gi Young; Su, H. H., S.; Park, C.; Moon, Sung Kwon; Jeong, Soon Jeong; Jeong, Moon Jin; Kim, Wun-Jae & Choi, I. H (2017). Antioxidant and cytoprotective effects of morin against hydrogen peroxide induced oxidative stress are associated with the induction of Nrf 2 mediated HO 1 expression in V79 4 Chinese hamster lung fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine* - 39: 672-680.

Lei, Q.; Wang, L.; Tan, D.X.; Zhao, Y.; Zheng, X.-D. & Chen, H. (2013). Identification of genes for melatonin synthetic enzymes in 'Red Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh.cv.Red) and their expression and melatonin production during fruit development. *J. Pineal Res.* 55 443–451

Li X, Zhou Y, Yang Y, Yang S, Sun X, Yang Y.(2015). Physiological and proteomics analyses reveal the mechanism of *Eichhornia crassipes* tolerance to high-concentration cadmium stress compared with *Pistia stratiotes*. *PLoS One.* Apr 17;10

Liao J., Wu X., Xing Z., Li Q., Duan Y, Fang W. & Zhu X. (2017). γ -Aminobutyric Acid (GABA) Accumulation in Tea (*Camellia Sinensis* L.) Through the GABA Shunt and Polyamine Degradation Pathways Under Anoxia. *J Agric Food Chem.* pr 04.

Lin Yi-Hsien, Pan Kui-You, Hung Ching-Hui, Huang Hsiang-En, Chen Ching-Lian, Feng Teng-Yung, a& Li-Fen Huang. (2013). Overexpression of Ferredoxin, PETF, Enhances Tolerance to Heat Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int J Mol Sci.* 2013 Oct; 14(10): 20913–20929.

Liu Ji-Hong, Wang W., Wu H., Gong X. & Moriguch T. (2015). Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Front Plant Sci.*; 6: 827.

Liu J., Yang A. R., Kelly T., Puche A., Esoga C., June H. L., Jr., Elnabawi A., Merchantaler I., Sieghart W., June H. L., Sr., Aurelian L. (2011). Binge alcohol drinking is associated with GABAA α 2-regulated Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in the central amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4465–4470.10.1073

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1:387-396.

Manan F.A., Mamat D.D., Samad A.A., Ong Y.S., Ooh K.F. and Chai T.T. (2015), Heavy metal accumulation and antioxidant properties of *Nephrolepis biserrata* growing in heavy metal-contaminated soil. *Global NEST Journal*, 17.

Marco F., Alcázar R., Tiburcio A. F. & Pedro Carrasco .(2011). Interactions between Polyamines and Abiotic Stress Pathway Responses Unraveled by Transcriptome Analysis of Polyamine Overproducers. *OMICS.* Nov; 15(11): 775–781.

Márquez-García B., Fernández-Recamales M. A. & Córdoba F (2012). Effects of

Cadmium on Phenolic Composition and Antioxidant Activities of *Erica andevalensis*.
Journal of Botany. Volume 2012

Maughan S.C., Pasternak M., Cairns N., Kiddle G., Brach T., Jarvis R., Haas F., Nieuwland J., Lim B., Müller C., Salcedo-Sora E., Kruse C., Orsel M., Hell R., Miller A.J., Bray P., Foyer C.H., Murray J.A.H., Meyer A.J., Cobbett C.S. (2010). Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquinone-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* ;107:2331–2336.

Maurino V. G. & Engqvist M. K. (2015). 2-Hydroxy acids in plant metabolism. *Arabidopsis Book* 13:e0182 10.1199

Medved I, Brown M J, Bjorksten AR (2003). N-acetylcysteine infusion alters blood redox status but not time to fatigue during intense exercise in humans. *Journal of Applied Physiology* 94, 1572-1582.

Michaelson LV, Napier JA, Molino D & Faure JD.(2016).Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaption. *Biochim Biophys Acta.Sep*;1861(9 Pt B):1329-35.

Mifflin BJ & Habash, DZ (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.*; 53: 979–987

Mishima, D., Kuniki, M., Sei, K., Soda, S., Ike, M. & Fujita, M. (2008). Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Bioresour. Technol.*,99(7), 2495-2500

Mittler M (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410

Mitsuya Y., Takahashi Y., Berberich T., Miyazaki A., Matsumura H., Takahashi H., *et al.* (2009). Spermine signaling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. *J. Plant Physiol.* 166, 626–643.

Módenes A. P (2013). Biosorption of BF-4B reactive red dye by using leaves of macrophytes *Eichhornia crassipes* *Int. J. Bioautomation*, 17 (1) (2013), pp. 33-44

Moore S. A., Moennich D. M., Gresser M. J. (1983). Synthesis and hydrolysis of ADP-arsenate by beef heart submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 25 6266–6271

Moore SA, Moennich DM, & Gresser MJ. (2010) Synthesis and hydrolysis of ADP-arsenate by beef heart submitochondrial particles. *J Biol Chem.* 258:6266–6271

Moschou PN, Paschalidis KA & Roubelakis-Angelakis KA. (2008). Plant polyamine catabolism: the start of the art. *Plant Signaling & Behavior.* 3:1061–1066.

Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K (2003) Toxicity of free

proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol* 44: 541–548

Ncube, E.N.; Mhlongo, M. I.; Piater, L. A.; Steenkamp, P. A.; Dubery, I. A. & Madala, E. N. (2014). Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. *Chem Cent J.*; 8: 66.

Nigam, J. N. (2002). Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *J. Biotechnol.* 97(2), 107-116.

Nikiforova V.J.; Kopka, J.; Tolstikov, V.; Fiehn, O.; Hopkins, L.; Hawkesford, M. J.; Hesse, H. & Hoefgen, H. (2005). Systems Rebalancing of Metabolism in Response to Sulfur Deprivation, as Revealed by Metabolome Analysis of *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiol* . maio; 138 (1): 304-318.

Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C. H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53, 1283–1304

Noctor, Graham; Mhamdi, Amna; Chaouch, Sejir; Han, Yi; Neukermans, Jenny; Marquez-Garcia, Belen; Queval, Guillaume; Foyer, Christine H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*. v. 35. P.454-484.

Nozulaidi, M. & Khairi, M. (2016). N-acetylcysteine increased nitrogen-induced rice yield Sarwar. *Proceedings of the 2016 International Nitrogen Initiative Conference, "Solutions to improve nitrogen use efficiency for the world"*, 4–8.; Melbourne.

Obata T. & Fernie A.R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci.* Oct; 69(19): 3225–3243.

O'Brien, J.A. & Benková, E. (2013). Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses *Front Plant Sci.* 4: 451.

Oliveira IC, Coruzzi GM. (1999). Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* ;121(1):301–310

Ovečka, M. & Takáč, T. (2014). Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools. *Biotechnol. Adv.* 32:73–86.

Palmieri L., Picault N., Arrigoni R., Besin E., Palmieri F., Hodges M. (2008). Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochem. J.* 410, 621–629.

Pathare V., Srivastava S., Suprasanna P. (2013). Evaluation of effects of arsenic on carbon, nitrogen and sulphur metabolism in two contrasting varieties of *Brassica*

juncea. Acta Physiol. Plant. 35 3377–3389. 10.1007

Pavli'k M., Pavli'kova' D., Staszko'va' L., Neuberg M., Kaliszova' R., Sza'kova' J. & Tlusto's, P. (2010). The effect of arsenic contamination on amino acids metabolism in *Spinacia oleracea* L. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 1309–1313

Piotrowska H.; Kucinska M. & Muria, M. (2012). Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. Mutation Research 750 (2012) 60–82.

Priya E. Sanmuga & Selvan P. Senthamil (2017). Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) – An efficient and economic adsorbent for textile effluent treatment – A review. Arabian Journal of Chemistry Volume 10, Supplement 2, May.

Qian H, Lu H., Ding H., Lavoie M., Li Y., Liu W. & Fu Z. (2015). Analyzing *Arabidopsis thaliana* root proteome provides insights into the molecular bases of enantioselective imazethapyr toxicity Sci Rep.; 5: 11975.

Ratty A. K. & Das N. P. (1988) Effects of flavonoids on non-enzymic lipid peroxidation: structure activity relationship. Biochem. Med. Metabol. Biol. 39, 69-79

Renault H., El Amrani A., Berger A., Mouille G., Soubigou-Taconnat L., Bouchereau A., *et al.* (2013). γ -aminobutyric acid transaminase deficiency impairs central carbon metabolism and leads to cell wall defects during salt stress in *Arabidopsis* roots. Plant Cell Environ. 36, 1009–1018. 10.1111

Ricardo K. F. S.; Oliveira, T. T.; Nagem T. J.; Pinto A. S.; Oliveir, M. G. A. & Soares J. F. (2001). Effect of Flavonoids Morin, Quercetin and Nicotinic Acid on Lipid Metabolism of Rats Experimentally Fed with Triton. Braz. arch. biol. technol. vol.44 no.3

Rivas-Ubach A., Sardans J., Pérez-Trujillo M., Estiarte M. & Peñuelas J. (2012). Strong relationship between elemental stoichiometry and metabolome in plants. Proc. Natl Acad. Sci. 109:4181–4186

Romero-Puertas M.C., Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂- and H₂O₂ in pea leaves. Plant, Cell and Environment.

Rosen B. P., Ajees A. A., McDermott T. R. (2011). Life and death with arsenic. Bioessays 33, 350–357. 10.1002

Sarwar, MJ, Mohd Nozulaidi & Mohd Khairi (2016). N-acetylcysteine increased nitrogen-induced rice yield. Proceedings of the International Nitrogen Initiative Conference. Solutions to improve nitrogen use efficiency for the world ", 4 -8 ; Melbourne

Schertl, P., Cabassa, C., Saadallah, K., Bordenave, M., Savoure, A., & Braun, H.P. (2014) Biochemical characterization of proline dehydrogenase in *Arabidopsis*

mitochondria. FEBS J. 281: 2794–2804

Sekomo C.B., Kagisha V., Rousseau D. & Lens P. (2012). Heavy metal removal by combining anaerobic upflow packed bed reactors with water hyacinth ponds Environ. Technol., 33 (10–12), pp. 1455-1464

Selmar D. & Maik Kleinwächter (2103). Stress Enhances the Synthesis of Secondary Plant Products: The Impact of Stress-Related Over-Reduction on the Accumulation of Natural Products Plant and Cell Physiology, Volume 54, Issue 6, 1 June 2013, Pages 817–826

Sen CK (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. Medicine & Science in Sports & Exercise 33, 368-370

Sengupta S., Mukherjee S., Parween S., Majumder A. L. (2012). Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: functional preference for higher plants? FEBS Lett. 586, 1488–1496.

Shi J., Fu X. Z., Peng T., Huang X. S., Fan Q. J., Liu J. H. (2010). Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. Tree Physiol. 30, 914–922.

Shi, H.; Jiang, C.; Ye, T.; Tan, D.-X., Reiter, R. J. & Zhang H.(2015b). Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] by exogenous melatonin. J. Exp. Bot. 66 681–694.

Shi, H.; Wang, X.; Tan, D.-X.; Reiter, R. J. & Chan, Z. (2015f). Comparative physiological and proteomic analyses reveal the actions of melatonin in the reduction of oxidative stress in Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). J. Pineal Res. 59 120–131.

Singh PK, Singh HB, Chaturvedi VK. Cross talk signaling: an emerging defense strategy in plants. Curr Sci. 2011;100(3):288–289.

Singh PK, Singh R. & Singh S. (2013) Cinnamic acid induced changes in reactive oxygen species scavenging enzymes and protein profile in maize (*Zea mays* L.) plants grown under salt stress. Physiol Mol Biol Plants. Jan; 19(1): 53–59.

Shing S., Parihar P., Singh R. , Singh V. P. & Prasad S. M. (2015).Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. Front Plant Sci. 6: 1143.

Srivastava S, Srivastava A. K, Suprasanna P, D’Souza S. F (2009) Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. J Exp Bot 60:3419–3431

- Srivastava, S.; Srivastava, A.K.; Suprasanna, P. & D'Souza, S. F. (2013). Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in *Brassica juncea*. *J Exp Bot.* Jan;64(1):303-1.
- Sun S. J., Guo S. Q., Yang X., Bao Y. M., Tang H. J., Sun H., *et al.* (2010). Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice. *J. Exp. Bot.* 61 2807–2818. 10.1093
- Szarka A., Tomasskovics B., Bánhegyi G. (2012). The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *Int. J. Mol. Sci.* ;13:4458–4483.
- Tawfik D. S., Viola R. E. (2011). Arsenate replacing phosphate: alternative life chemistries and ion promiscuity. *Biochemistry* 50, 1128–1134 10.1021
- Takahashi T & Kakehi J. (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann Bot.* Jan;105(1):1-6.
- Tripathi D. K., Singh V. P., Kumar D. & Chauhan D. K. (2012). Impact of exogenous silicon addition on chromium uptake, growth, mineral elements, oxidative stress, antioxidant capacity, and leaf and root structures in rice seedlings exposed to hexavalent chromium. *Acta Physiol. Plant.* 34, 279–289. 10.1007/
- Van de Poel, B., & Van Der Straeten, D. (2014). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Frontiers in Plant Science*, 5, 640.
- Vestena S., Cambraia, J., Olivia, M. A. & Oliveira J. A. (2007) Cadmium accumulation by water hyacinth and salvinia under different sulfur concentrations. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2, p. 269-274.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., ... Sharma, S. (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8, 161.
- Xia J. & Wishart D. S. (2016). Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*. 14.10
- Xu S., Hu J., Li Y., Ma W., Zheng Y., Zhu S. J. (2011). Chilling tolerance in *Nicotiana tabacum* induced by seed priming with putrescine. *Plant Growth Regul.* 63, 279–290
- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J., and Rausch, T. (2005). Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: Implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J.* 41 15–30
- Wang, P.; Yin, L.; Liang, D.; Li, C.; Ma, F. & Yue, Z. (2012). Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. *Journal of Pineal Research*.53, 11–20.

Wang Yan, Xu Liang, Shen Hong, Wang Juanjuan, Liu Wei, Xianwen Zhu, Ronghua Wang, Xiaochuan Sun & Liwang Liu (2015). Metabolomic analysis with GC-MS to reveal potential metabolites and biological pathways involved in Pb & Cd stress response of radish roots. *Scientific Reports* 5, n°18296.

Wilhelm C & Selmar D (2010). Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: the physiological limits of improved photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 2010., vol. 168 (pg. 79-87)

Weeda, S.; Zhang, N.; Zhao, X.L.; Ndip, G.; Guo, Y.D.; Buck, G.A.; Fu, C.G. & Ren, S.X. (2014). *Arabidopsis* transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS One* 9.

Wei W., Li Q.-T., Chu Y.-N., Reiter R. J., Yu X.-M., Zhu D.-H., *et al.* (2015). Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *J. Exp. Bot.* 66 695–707. 10.109

Wheeler GMC, Tronconi MA, Drincovich MF, Andreo CS, Flügge UI & Maurino VG (2005) A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139 39–51

Zagorchev, L.; Seal, C. E.; Kranner, I. & Odjakova, M. (2013). A Central Role for Thiols in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *Int J Mol Sci. Apr*; 14(4): 7405–7432.

Zhang J., Zhao Quan-Zhi, Duan Gui-Lan & Huang Yan-Chao (2011) Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings. *Environmental and Experimental Botany* Volume 72, Issue 1, Pages 34-40.

Zhang Y., Zhang H., Zou Z. R., Liu Y., Hu X. H. (2015). Deciphering the protective role of spermidine against saline-alkaline stress at physiological and proteomic levels in tomato. *Phytochemistry* 110, 13–21

Zwack PJ & Rashotte AM (2015). Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses, *Journal of Experimental Botany*, Volume 66, Issue 16, 1 August, Pages 4863–4871,

Wang R, Wang J, Zhao L, Yang S & Song Y. (2015). Impact of heavy metal stresses on the growth and auxin homeostasis of *Arabidopsis* seedlings. *Biometals*. Feb;28(1):123-32.

Wang Y, Wang Y, Kai W, Zhao B, Chen P, Sun L, Ji K, Li Q, Dai S, Sun Y, *et al.* (2014) Transcriptional regulation of abscisic acid signal core components during cucumber seed germination and under Cu²⁺, Zn²⁺, NaCl and simulated acid rain stresses. *Plant Physiol Biochem* 76:67-76.

Wachter A., Wolf S., Steininger H., Bogs J., Rausch T. (2005). Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J.* 41, 15–30.

Zhu XF1, Lei GJ, Wang ZW, Shi YZ, Braam J, Li GX & Zheng SJ. (2013). Coordination between apoplastic and symplastic detoxification confers plant aluminum resistance. *Plant Physiol.* Aug;162(4):1947-55

Zwack PJ, DeClercq I, Howton TC, Hallmark HT, Hurny A, Keshishian EA, Parish AM, Benkova E, Mukhtar MS, Breusegem FV & Rashotte AM (2016). Cytokinin Response Factor 6 Represses Cytokinin-Associated Genes during Oxidative Stress. *Plant Physiology.* Oct; 172(2): 1249–1258.

7- Material Suplementar

Suplemento 1- *Teor de enxofre e arsênio nas raízes de E. crassipes após 24h*

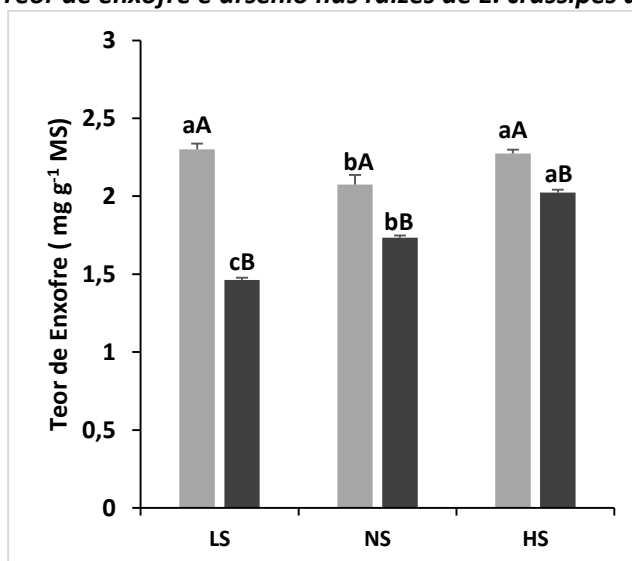


Figura S1.1- Teor de enxofre nas raízes de *E. crassipes* após 24h. Teores encontrados após 72hs de exposição aos respectivos tratamentos - (LS) baixo enxofre; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As (V): 0 μ M (Cinza claro) ou As(V): 8 μ M (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

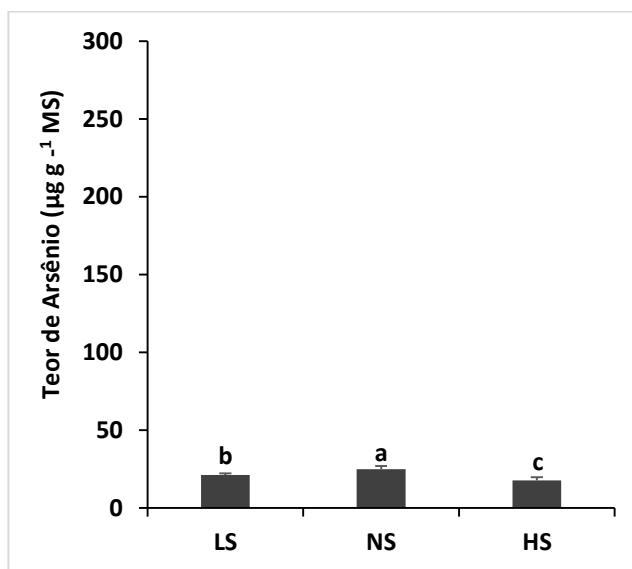


Figura S1.2 - Teor de arsênio em raízes de *Eichhornia crassipes* após 24h. Teores encontrados após 24hs de tratamento.*Médias seguidas por letras minúsculas iguais entre os diferentes tratamentos não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey

Suplemento 2- Normalização de Dados

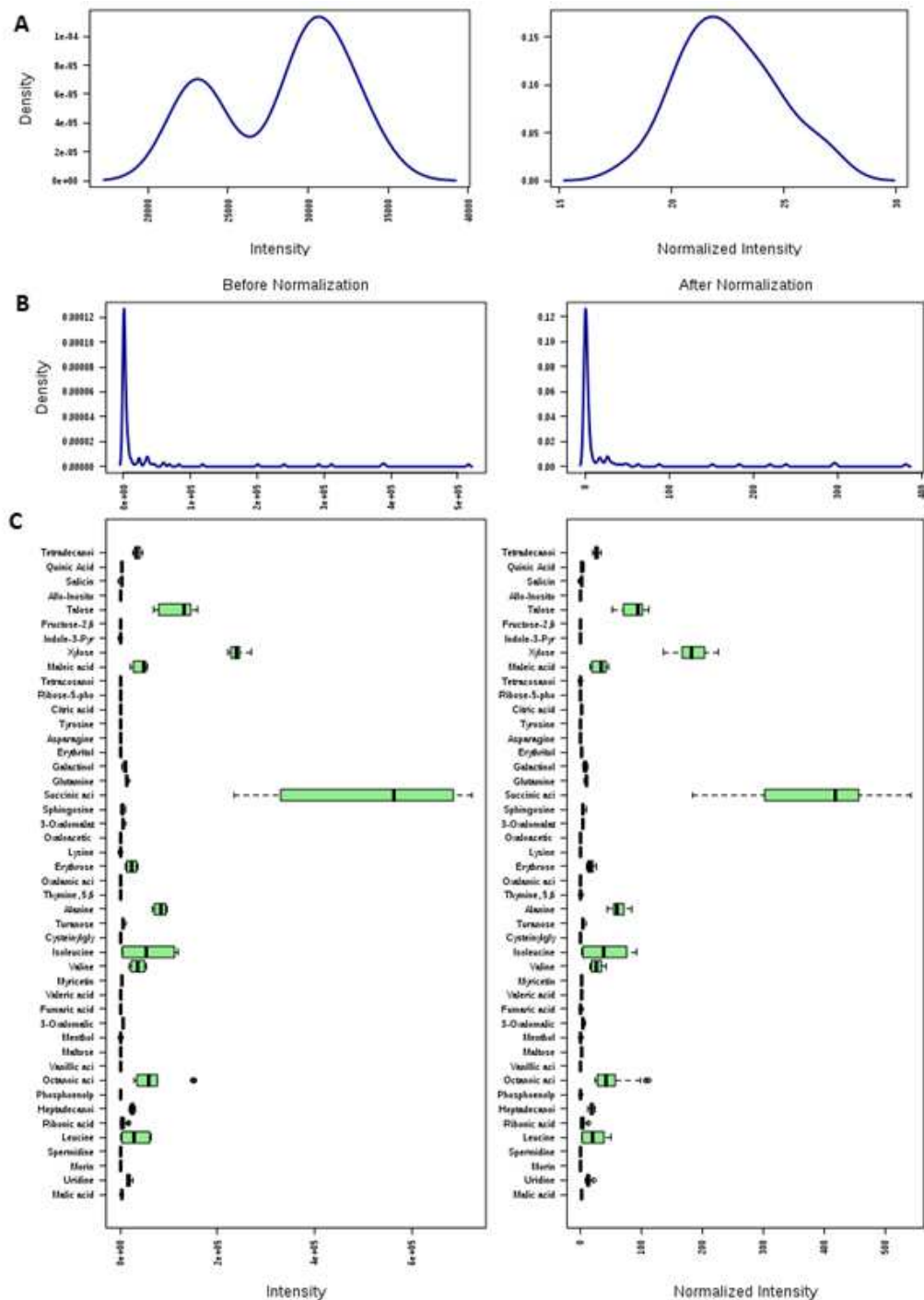


Figura Suplementar S2.1 – Normalização de Dados: A) Diagrama mostrando o resultado da normalização B) Diagrama de densidade de Kernel C) Distribuição Boxplots dos 50 primeiros metabólitos após a normalização dos dados. * Os diagramas de densidade são baseados em todas as amostras. **Modelo: Dados corrigidos pela massa e Normalização pela mediana das amostras.

Tabela S3.1 – Lista dos 112 metabólitos identificados pela ANOVA em folhas. (p.value≤0,05)

N	Peaks(mz/rt)	f. value	p.value	LOG10(p)	FD R
1	beta-Alanine	1379.9	1.34E-22	21.871	1.51E-20
2	Isoleucine	95.78	6.22E-20	19.207	3.19E-18
3	Leucine	671.4	8.55E-20	19.068	3.19E-18
4	Quinic Acid	559.65	4.35E-19	18.361	1.22E-17
5	Glycerol	377.17	1.47E-17	16.833	3.29E-16
6	Octanoic acid	337.75	3.93E-17	16.406	7.33E-16
7	Isocitric acid	275.62	2.39E-16	15.622	3.34E-15
8	Sphingosine	246.39	6.44E-16	15.191	8.02E-15
9	Spermine	235.68	9.55E-16	15.02	1.07E-14
10	Caffeic acid	229.33	1.22E-15	14.951	1.24E-14
11	Oxalomalic acid	212.66	2.37E-15	14.626	2.21E-14
12	Oxalic acid	202.29	3.68E-15	14.434	3.17E-14
13	Dodecanoic acid	195.72	4.92E-15	14.308	3.94E-14
14	Gluconic acid	190.6	6.22E-15	14.206	4.64E-14
15	Citric acid	175	1.32E-14	13.88	9.23E-14
16	Maleic acid	173.33	1.43E-14	13.843	9.45E-14
17	Gibberellin A3	155.9	3.64E-14	13.439	2.26E-13
18	Piceatannol	154.17	4.01E-14	13.397	2.36E-13
19	Malonic acid	152.86	4.32E-14	13.346	2.42E-13
20	Methionine	151.24	4.74E-14	13.324	2.53E-13
21	Senecionine	148.69	5.50E-14	13.259	2.80E-13
22	Salicin	144.68	6.99E-14	13.155	3.41E-13
23	Succinic acid	143.17	7.67E-14	13.115	3.58E-13
24	Melatonin	139.53	9.60E-14	13.018	4.30E-13
25	Inosine	133.92	1.37E-13	12.862	5.91E-13
26	Oxamalic acid	127.31	2.14E-13	12.67	8.86E-13
27	12-Hydroxydodecanoic acid	126.49	2.26E-13	12.646	9.05E-13
28	Erythrose	123.19	2.85E-13	12.546	1.10E-12
29	Neuramic acid	120.63	3.42E-13	12.466	1.28E-12
30	Valine	115.99	4.80E-13	12.318	1.74E-12
31	Loganin	108.48	8.59E-13	12.066	3.01E-12
32	Galactinol	101.18	1.57E-12	11.804	5.33E-12
33	Indole-3-pyruvic acid	100.36	1.68E-12	11.744	5.55E-12
34	Dihydroxy-flavone	93.784	3.02E-12	11.52	9.67E-12
35	Erythritol	92.38	3.44E-12	11.463	1.07E-11
36	GABA	82.88	8.74E-12	11.058	2.65E-11
37	Ribulose	82.052	9.53E-12	11.021	2.81E-11
38	Lipoamide	82.521	1.12E-11	10.951	3.22E-11
39	Secologanin	78.89	1.34E-11	10.875	3.73E-11
40	N-Acetyl Cysteine	77.825	1.50E-11	10.824	4.09E-11
41	Ribose-5-phosphate	72.687	2.68E-11	10.571	7.13E-11

Con
tinue...

Continue...

42	Tryptophan	71.28	3.17E-11	10.499	8.25E-11
43	Cystathionine	70.004	3.69E-11	10.433	9.40E-11
44	Melibiose	66.791	5.50E-11	10.259	1.37E-10
45	Lysine	63.634	8.29E-11	10.082	2.02E-10
46	Idose	62.963	9.03E-11	10.043	2.16E-10
47	Morin	62.744	9.33E-11	10.03	2.18E-10
48	Talose	62.34	9.86E-11	10.006	2.25E-10
49	Heptadecanoic acid	57.795	1.86E-10	9.7296	4.17E-10
50	Glucose-6-phosphate	57.526	1.94E-10	9.7126	4.26E-10
51	Alanine	55.678	2.55E-10	9.5938	5.49E-10
52	Valeric acid -3-hydroxy-3-methyl-	55.223	2.73E-10	9.5639	5.77E-10
53	Uridine	54.714	2.95E-10	9.5303	6.10E-10
54	Uridine, 2'-deoxy-	54.612	3.00E-10	9.5236	6.10E-10
55	Menthol	53.845	3.37E-10	9.4722	6.74E-10
56	3-Sulfinoalanine	52.556	4.13E-10	9.3844	8.11E-10
57	Theobromine	52.33	4.23E-10	9.3689	8.26E-10
58	Phosphoenolpyruvic acid	52.08	4.45E-10	9.3515	8.45E-10
59	Maltose	51.269	5.07E-10	9.2948	9.47E-10
60	Arginine	49.734	6.53E-10	9.185	1.20E-09
61	Cinnamic acid	49.455	6.84E-10	9.1647	1.24E-09
62	Glutamine	45.649	1.33E-09	8.877	2.34E-09
63	Tartaric acid	45.605	1.34E-09	8.8736	2.34E-09
64	Cadaverine	44.361	1.68E-09	8.7746	2.90E-09
65	Fumaric acid	41.96	2.65E-09	8.5765	4.50E-09
66	Aspartic acid	41.717	2.78E-09	8.5558	4.65E-09
67	Maleamic Acid	41.151	3.11E-09	8.5073	5.12E-09
68	Glycerol-2-phosphate	40.475	3.56E-09	8.4486	5.78E-09
69	Glucaric acid	39.118	4.70E-09	8.328	7.52E-09
70	3-Oxalomalate	37.002	7.38E-09	8.1322	1.16E-08
71	Cis-Aconitic acid	36.143	8.92E-09	8.0499	1.39E-08
72	Ribonic acid	35.749	9.74E-09	8.0115	1.49E-08
73	Trehalose	35.186	1.11E-08	7.956	1.68E-08
74	Palmitic acid	32.842	1.92E-08	7.7162	2.87E-08
75	Trans-Aconitic	32.793	1.95E-08	7.7111	2.87E-08
76	Muramic acid	29.996	3.95E-08	7.4037	5.70E-08
77	Vanillic acid	29.972	3.97E-08	7.401	5.70E-08
78	Xylose	28.625	5.70E-08	7.244	8.01E-08
79	Decanoic acid	28.612	5.72E-08	7.2423	8.01E-08
80	Isomaltose	27.782	7.21E-08	7.1412	9.96E-08
81	Asparagine	27.108	8.73E-08	7.059	1.19E-07
82	1-Kestose	26.93	9.19E-08	7.0367	1.24E-07
83	Sucrose	25.918	1.24E-07	6.9077	1.65E-07
84	Ribose	25.523	1.39E-07	6.8561	1.84E-07
85	Myricetin	25.234	1.52E-07	6.8179	1.98E-07
86	Tetradecanoic acid	23.695	2.47E-07	6.6082	3.17E-07
87	Octadecanoic acid	22.637	3.49E-07	6.4573	4.44E-07
88	Malic acid	21.402	5.33E-07	6.7061	6.70E-07
89	Custeinesulfonic acid	21.371	5.39E-07	6.2685	6.71E-07
90	Pyruvic acid	20.359	7.75E-07	6.1111	9.53E-07
91	Tetracosanoic acid	18.63	1.49E-06	5.8262	1.82E-06
					Con tinue...

Continue...

92	Pentanedioic acid	18.02	1.90E-06	5.7206	2.29E-06
93	Thymine	17.084	2.80E-06	5.5528	3.34E-06
94	Allo-inositol	16.492	3.61E-06	5.4428	4.25E-06
95	Turanose	15.109	6.71E-06	5.1735	7.83E-06
96	Trehalose-6-phosphate	14.768	7.87E-06	5.104	9.09E-06
97	Cysteinylglycine	14.401	9.37E-06	5.0281	1.07E-05
98	Fructose-6-phosphate	12.138	2.29E-05	4.5238	3.39E-05
99	Tyrosine	11.152	5.22E-05	4.2822	5.84E-05
100	Allose	11.138	5.26E-05	4.2788	5.84E-05
101	Spermidine	11.115	5.33E-05	4.2731	5.86E-05
102	Glutamic acid	10.921	5.98E-05	4.2236	6.50E-05
103	Oxaloacetic acid	9.8495	1.15E-04	3.9389	1.24E-04
104	Fructose-2-6-diphosphate	8.5567	2.72E-04	3.5662	2.90E-04
105	Glucoheptose	7.6603	5.18E-04	3.2859	5.47E-04
106	Sarcosine	7.1439	7.67E-04	3.1151	8.03E-04
107	Xylitol	6.9877	8.67E-04	3.062	8.99E+04
108	S-methyl-Cysteine	6.6514	1.13E-03	2.9453	1.17E-03
109	Glucose	6.5133	1.27E-03	2.8964	1.29E-03
110	Tagatose	5.6977	2.54E-03	2.5952	2.56E-03
111	Gulose	5.6901	2.56E-03	2.5923	2.56E-03

Table S3.2 - Results from Pathway Analysis in *E. crassipes* leaves under arsenate effects. Legend: Holm adjust = p value adjusted by Holm-Bonferroni; FDR= p value adjusted using False Discovery Rate -

<i>Pathway</i>	<i>Total</i>	<i>Expected</i>	<i>Hits</i>	<i>Raw p</i>	<i>-log(p)</i>	<i>Holm adjust</i>	<i>FDR</i>	<i>Impact</i>
*Alanine, aspartate and glutamate metabolism	2	1.69	10	1.37E-06	1.35E+01	1.20E-04	1.20E-04	0.85
*Citrate Cycle (TCA cycle)	0	1.54	9	5.42E-06	1.21E+01	4.66E-04	2.36E-04	0.38
*Carbon fixation in photosynthetic organisms	1	1.61	7	6.10E-04	7.40E+00	5.18E-02	1.77E-02	0.23
*Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	7	1.31	6	1.10E-03	6.82E+00	9.20E-02	1.99E-02	0.60
*Aminoacyl-tRNA biosynthesis	7	5.15	13	6.48E-03	6.78E+00	9.47E-02	1.99E-02	0.00
*Arginine and proline metabolism	8	2.92	8	1.01E-02	5.04E+00	5.31E-01	9.39E-02	0.25
*beta-Alanine metabolism	2	0.92	4	1.15E-02	4.60E+00	8.15E-01	1.25E-01	0.54
*Galactose metabolism	6	2.00	6	1.37E-06	4.46E+00	9.20E-01	1.25E-01	0.21
*Butanoate metabolism	8	1.38	4	4.35E-02	3.14E+00	1.00E+00	3.79E-01	0.00
*Glutathione metabolism	6	2.00	5	4.36E-02	3.13E+00	1.00E+00	3.79E-01	0.16
**Pyruvate metabolism	1	1.61	4	7.13E-02	2.64E+00	1.00E+00	5.37E-01	0.24
**Starch and sucrose metabolism	0	2.31	5	7.40E-02	2.60E+00	1.00E+00	5.37E-01	0.24
**Pantothenate and CoA biosynthesis	4	1.08	3	8.62E-02	2.45E+00	1.00E+00	5.77E-01	0.20
Indole alkaloid biosynthesis	7	0.54	2	9.53E-02	2.35E+00	1.00E+00	5.92E-01	0.00
**Cysteine and methionine metabolism	4	2.61	5	1.41E-01	2.17E+00	1.00E+00	6.59E-01	0.17
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	6	2.00	4	1.33E-01	2.02E+00	1.00E+00	7.24E-01	0.04
Tyrosine metabolism	8	1.38	3	1.55E-01	1.86E+00	1.00E+00	7.94E-01	0.27
Lysine biosynthesis	0	0.77	2	1.76E-01	1.74E+00	1.00E+00	8.50E-01	0.07
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	1	1.61	3	2.15E-01	1.54E+00	1.00E+00	9.85E-01	0.00
**Pentose and glucuronate interconversions	2	0.92	2	2.34E-01	1.45E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.20
C5-Branched dibasic acid metabolism	4	0.31	1	2.74E-01	1.29E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.00
**Glycolysis or gluconogenesis	25	1.92	3	3.01E-01	1.20E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.22
**Nitrogen metabolism	15	1.15	2	3.23E-01	1.13E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Taurine and hypotaurine metabolism	5	0.38	1	3.30E-01	1.11E+00	1.00E+00	1.00E+00	0.50
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	6	0.46	1	3.82E-01	9.63E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
**Glucosinolate biosynthesis	4	4.15	5	4.02E+01	9.11E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
**Pentose phosphate pathway	8	1.38	4	4.09E-01	8.95E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
								Continue----

Continue

Pathway	Total	Expected	Hits	Raw p	log(p)	Holm adjust	FDR	Impact
**Glycine, serine and threonine metabolism	30	2.31	3	4.09E-01	8.93E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Valine, leucine and isoleucine degradation	34	2.61	3	4.93E-01	7.07E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Fatty acid biosynthesis	49	3.77	4	5.29E-01	6.73E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Caffeine metabolism	10	0.77	1	5.52E-01	5.94E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Pyrimidine metabolism	38	2.92	3	5.70E-01	5.62E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Tryptophan metabolism	27	2.08	2	6.28E-01	4.65E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
**Biosynthesis of unsaturated fatty acids	42	3.23	3	6.40E-01	4.46E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
**Fatty acid enlogation in mitochondria	13	1.00	1	6.48E-01	4.33E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Ascorbate and aldarate metabolism	15	1.15	1	7.01E-01	3.56E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Lysine degradation	17	1.31	1	7.46E-01	2.94E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Selenoamino acid metabolism	19	1.46	1	7.84E-01	2.44E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
**Porphyrin and chlorophyll metabolism	29	2.23	1	9.04E-01	1.01E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
**Fatty acid metabolism	34	2.61	1	9.36E-01	6.56E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Purine metabolism	61	4.69	2	9.57E-01	4.37E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	41	3.15	1	9.64E-01	3.63E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00
**Flavanoid biosynthesis	43	3.31	1	9.70E-01	3.07E-01	1.00E+00	1.00E+00	0.00

Suplemento 4- *Metabólitos VIPs (Variáveis Importantes na Projeção) identificados após PLS-DA em folhas de Eichhornia crassipes*

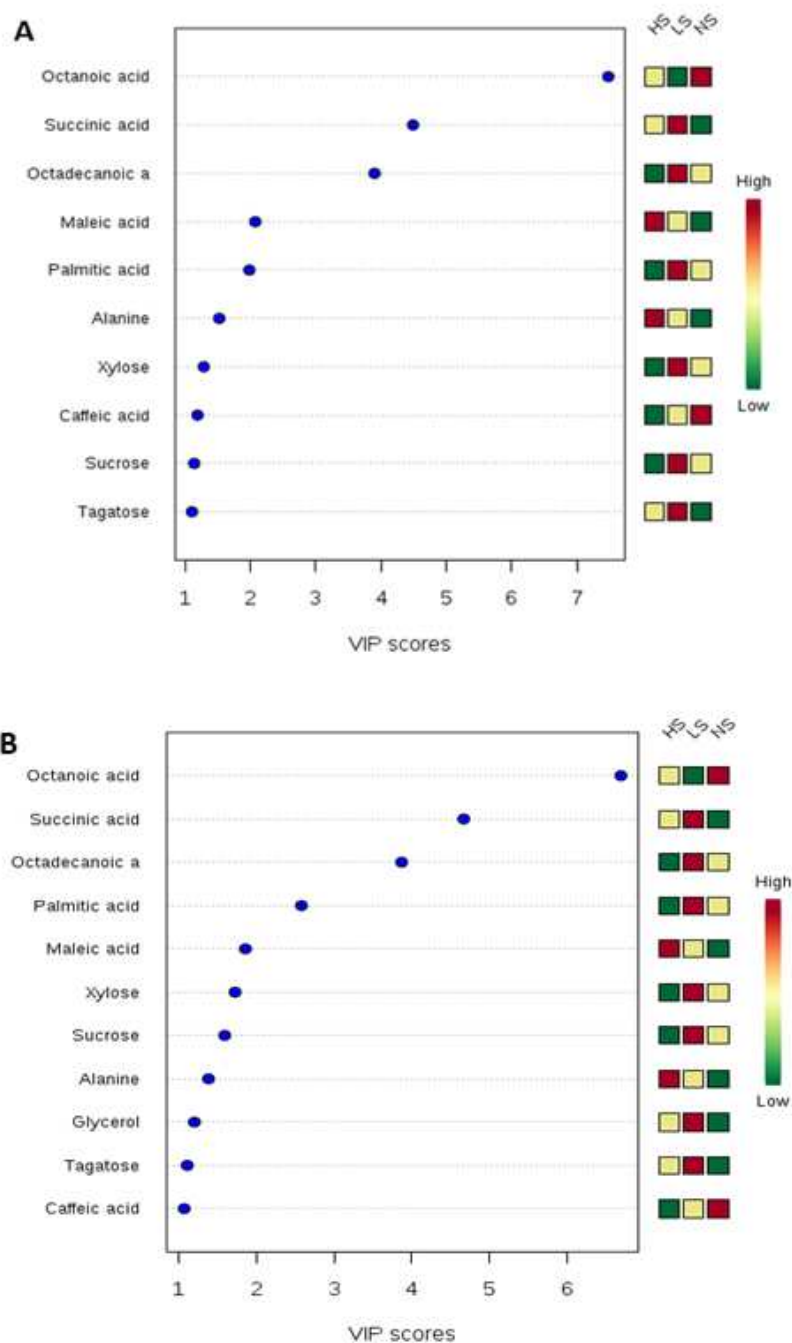


Figura S4.1-Metabólitos VIPs (Variáveis Importantes na Projeção) identificados após PLS-DA em folhas de *Eichhornia crassipes* submetidas a diferentes concentrações de enxofre, após fome prévia de enxofre induzida. A-Metabólitos Vips do Componente Principal 1 (PC1); B- Metabólitos Vips do Componente Principal 2 (PC2). * retângulos coloridos indicam a intensidade dos metabólitos.

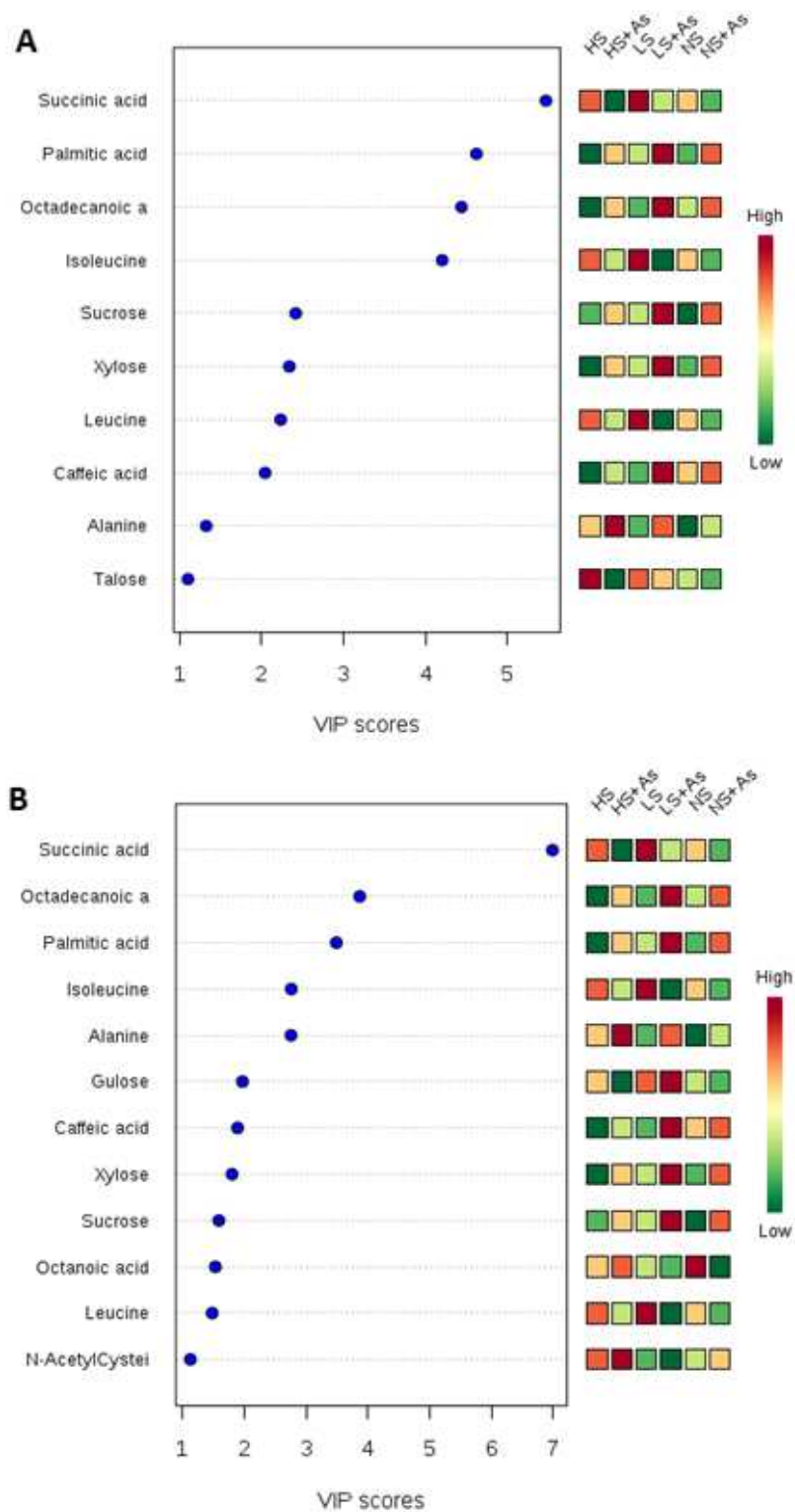


Figura S4.2-Metabólitos VIPs (Variáveis Importantes na Projeção) identificados após PLS-DA em folhas de *Eichhornia crassipes* estressadas por arsenato, após fome prévia de enxofre induzida (com os respectivos controles). A) Metabólitos Vips do Componente Principal 1 (PC1); B) e Metabólitos Vips do Componente Principal 2 (PC2). * retângulos coloridos indicam a intensidade dos metabólitos

Suplemento 5- *Reprogramação metabólica em folhas de E. crassipes sob diferentes condições de reabastecimento de enxofre após 24h.*

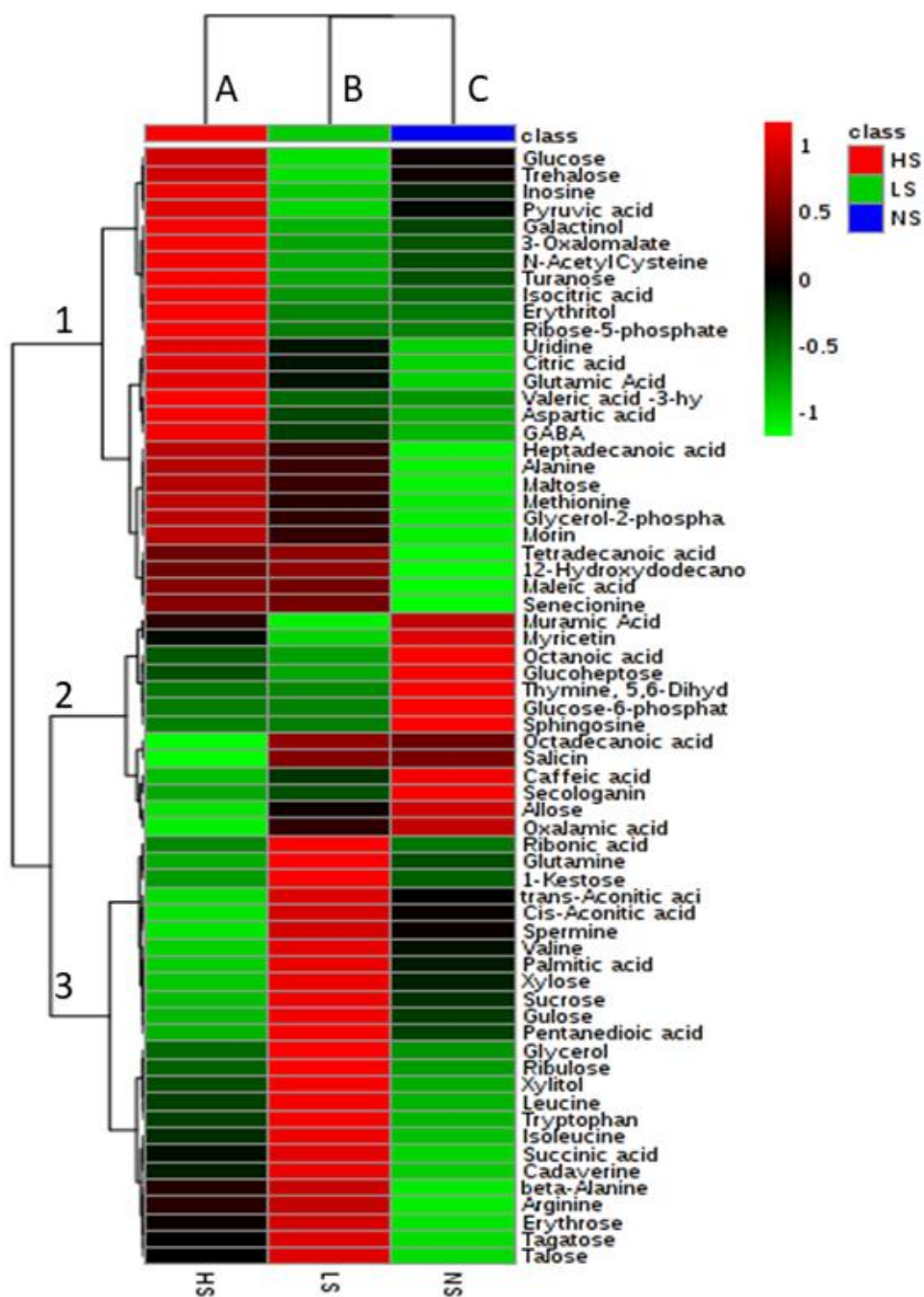


Figura S5.1- Reprogramação metabólica em folhas de *E. crassipes* sob diferentes condições de reabastecimento de enxofre após 24h - PLS-DA e scores VIPs Legenda: A = HS - alta disponibilidade de enxofre; B = LS – baixa disponibilidade de enxofre; C = NS - disponibilidade mediana de enxofre; 1 -Cluster destacando os metabólitos mais intensos em HS; 2- Cluster destacando os metabólitos mais intensos em NS; 3-Cluster indicando os metabólitos mais intensos em NS

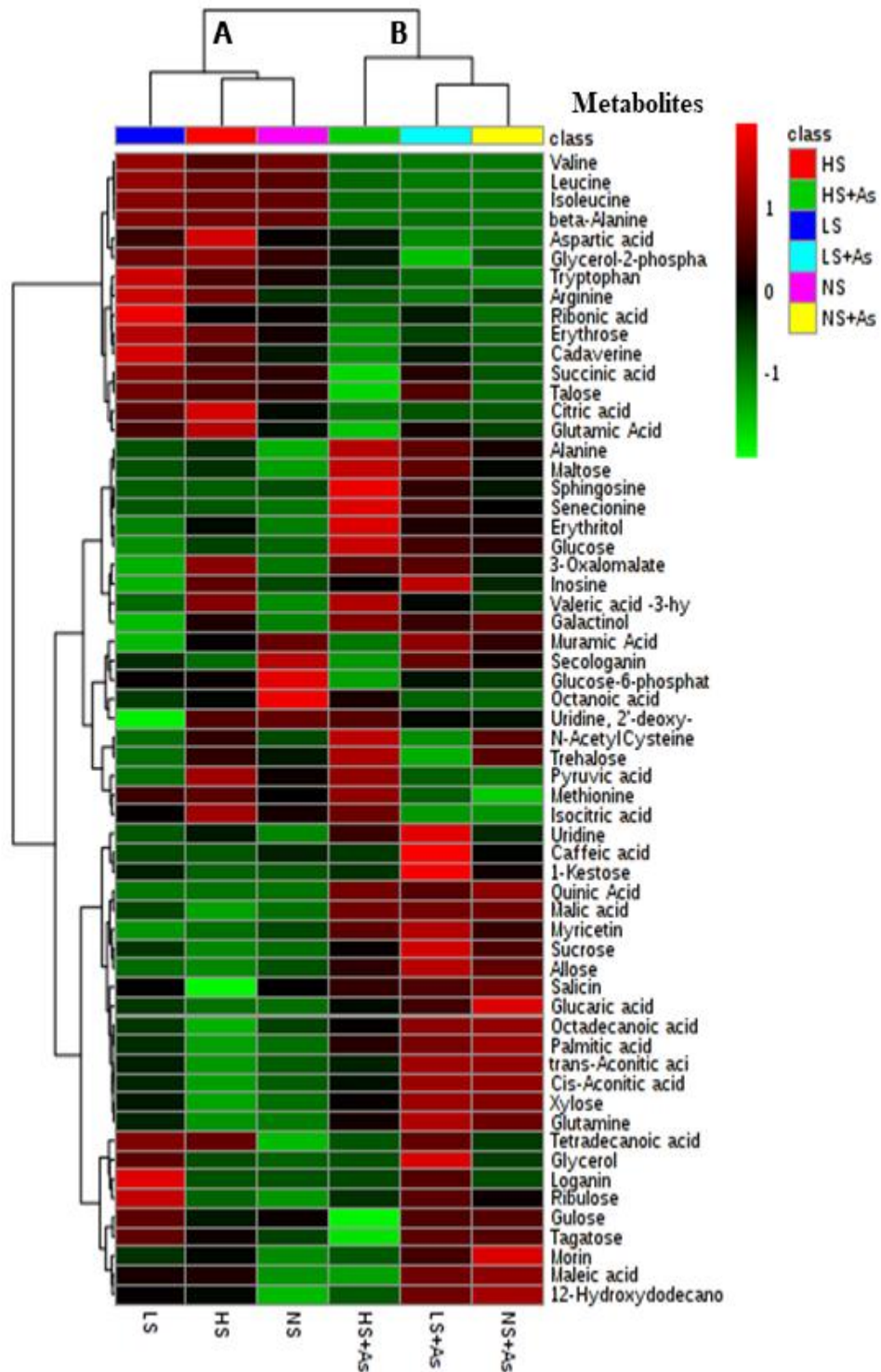


Figura S5.2- Reprogramação metabólica em folhas de *E. crassipes* sob diferentes condições de reabastecimento de enxofre após 24h mostrando os 60 primeiros metabólitos obtidos pela análise de PLS-DA e scores VIPs organizados num Heatmap após análise de Cluster Legenda: A = HS - alta disponibilidade de enxofre; B = LS – baixa disponibilidade de enxofre; C = NS - disponibilidade mediana de enxofre.

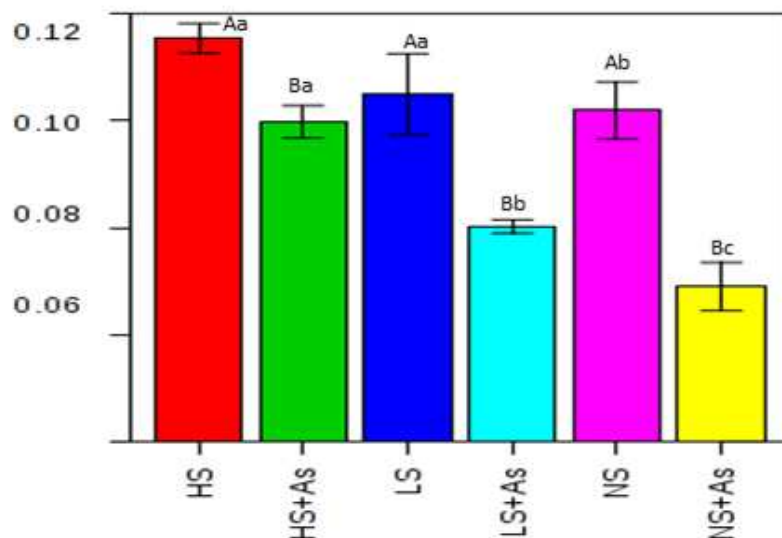


Figura S5.3- Intensidade relativa do ácido oxaloacético e posterior ANOVA com teste de Tukey e desvio padrão ($t \leq 0,05$). * Média representadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey entre os diferentes tratamentos, contendo ou não arsênio, respectivamente. ** Média representadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey dentro de cada tratamento contendo ou não arsênio

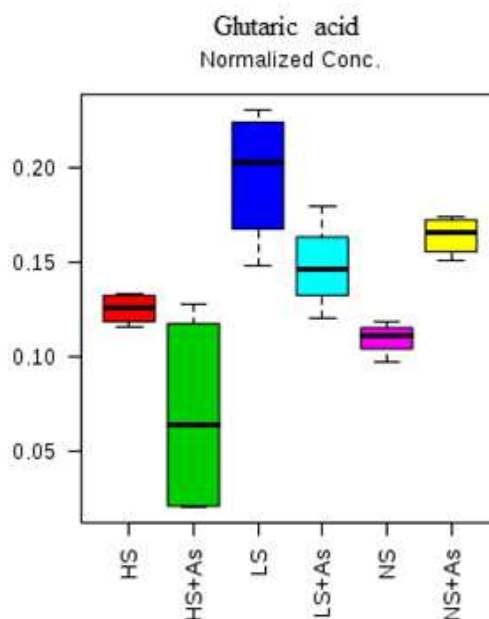


Figura S5.4 - Intensidade relativa do ácido glutárico após a normalização

Suplemento 6- *Teor do pool de Cisteínas em raízes E. crassipes após 24h*

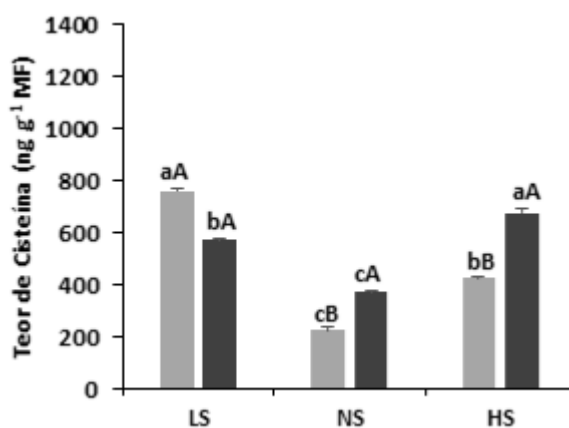


Figura S6.1- Teor do pool de Cisteínas em raízes *E. crassipes* após 24h. Teores encontrados após 72hs de exposição aos respectivos tratamentos - (LS) baixo enxofre; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As (V): 0μM (Cinza escuro) ou As(V): 8μM (Cinza claro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Capítulo 2

Supply of sulfur and arsenic: Phytohormones, thiols and phytoremediation in *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms

Abstract

With the help of mass spectrometry, we sought to investigate how the differentiated supply of sulfur after an induced starvation in *E. crassipes* and the presence of arsenic affect its growth, the arsenic accumulation and the interactions with phytohormones in the perception and response to stress. The plants were pre-acclimatized for 7 days under low sulfur availability (2.5 μM sulfur) and then transferred to different flasks containing 2.5 μM , 200 μM and 600 μM sulfur, with or without 8 μM of arsenic. Pre-acclimatization allowed the activation of the sulfur absorption pathway in *E. crassipes*. After replenishment, leaves and roots responded differently to arsenate stress, also due to sulfur supply. In addition, it proved to be an extremely effective strategy when it comes to new possibilities in arsenic phytoremediation programs using the species, even showing that the higher supply of sulfur in the refueling, potentiated the accumulation capacity of the metal. One of the first signs of metal toxicity can be attributed to the presence of chlorosis and marginal wilts in leaves. The decrease in pigment content seems to directly affect the photosynthetic mechanism in *E. crassipes*, which leads to the production of ROS and consequent lipid peroxidation. Such changes have brought irreversible damage to plant growth. Plants grown on low sulfur availability, accumulated lower levels of metal, which may have contributed to a smaller decrease in their TCR. The presence of the metal negatively affected the starch and sucrose pool while the higher availability of sulfur allows a smoother reduction of energy reserves in leaves of *E. crassipes*. The accumulation of cysteines was potentiated by the higher availability of sulfur and accumulation of arsenic, with Arsenate raising the levels of γ -glutamyl-cysteine (γGC), impacting the route of glutathione biosynthesis. In addition, Glutathione reductase (GR) is essential in the attempt to maintain redox homeostasis in *E. crassipes* after arsenate stress, contributing to alter the availability of GSH. Arsenic drastically affects shoot, leading to necrosis and leaf senescence. Cytokines are essential for the accumulation of sulfur and phytoremediation of the metal. Auxin participate in signaling stress and in regulating growth. Jasmonic acid in addition to an important

signaling molecule, act on the stress response, being related to the accumulation of thiols, while salicylic acid also acts as a signaling molecule, and may be involved in antioxidant responses. ABA biosynthesis is essential in the perception of stress and helps to understand the effects on central metabolism, arsenic accumulation and growth. The accumulation of ACC in leaves and roots growing in media with lower sulfur contents may be related to the greater reduction of growth in these treatments.

Enxofre e arsênio: Fitormônios, tióis e fitorremediação em *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms

Resumo

Com auxílio de espectrometria de massas, buscou-se investigar como a oferta diferenciada de enxofre após uma fome induzida em *E. crassipes* e a presença de arsênio afetam o seu crescimento, o acúmulo de arsênio e as interações com fitormônios na percepção e resposta ao estresse. As plantas foram pré-aclimatadas por 7 dias sob baixa disponibilidade de enxofre (2,5µM enxofre) e depois transferidas para diferentes frascos contendo 2,5 µM, 200 µM e 600 µM de enxofre, com ou sem 8 µM de arsenato. A pré-aclimatação permitiu a ativação da via de absorção de enxofre em *E. Crassipes*. Após o reabastecimento, folhas e raízes responderam de maneira diferenciada ao estresse por arsenato, também em função da oferta de enxofre. Além disso, se mostrou uma estratégia extremamente eficaz quando se trata de novas possibilidades em programas de fitorremediação de arsênio usando a espécie, demonstrando inclusive que a maior oferta de enxofre no reabastecimento, potencializou a capacidade de acumulação do metal. Um dos primeiros sinais da toxidez do metal pode ser atribuído a presença de clorose e murchas marginais em folhas. O decréscimo no teor de pigmentos parece afetar diretamente o mecanismo fotossintético em *E. crassipes* o que leva a produção de ROS e consequente peroxidação lipídica. Tais alterações trouxeram danos irreversíveis ao crescimento vegetal. Plantas cultivadas sobre baixa disponibilidade de enxofre, acumularam menores teores de metal, o que pode ter contribuído para um menor decréscimo em sua TCR. A presença do metal afetou negativamente o pool de amido e sacarose enquanto a maior disponibilidade de enxofre permite uma redução mais suave das reservas energéticas em folhas de *E. crassipes*. O acúmulo de cisteínas foi potencializado com a maior oferta de enxofre e acumulação de arsênio, sendo que Arsenato eleva os teores de γ -glutamil-cisteína

(yGC), impactando a rota de biossíntese de glutationa. Além disso, Glutationa redutase (GR) é essencial na tentativa de manutenção da homeostase redox em *E. crassipes* após o estresse por arsenato, contribuindo para alterar a disponibilidade de GSH. Arsênio afeta drasticamente a parte aérea, levando a necrose e senescência foliar. Citocininas são essenciais para a acumulação de enxofre e fitorremediação do metal. Auxinas participam da sinalização do estresse e na regulação do crescimento. Ácido jasmônico além de uma importante molécula sinalizadora, atuam na resposta ao estresse, estando relacionado com a acumulação de tióis, enquanto ácido salicílico também atua como uma molécula sinalizadora, podendo estar envolvida em respostas antioxidantes. A biossíntese de ABA é essencial na percepção do estresse e ajuda a compreender os efeitos sobre o metabolismo central, a acumulação de arsênio e o crescimento. A acumulação de ACC em folhas e raízes crescendo em meios com menores teores de enxofre pode estar relacionada com a redução mais acentuada de crescimento nesses tratamentos.

1-Introdução

Arsênio interfere no metabolismo das plantas inibindo seu crescimento e também pode influenciar na absorção de nutrientes competindo diretamente e/ou alterando processos metabólicos (Farnese *et al* 2014). A presença de arsênio no solo e na água é uma ameaça constante em muitas regiões do mundo a homeostase de organismos vivos. (Kumar *et al* 2014). O arsenato se assemelha ao fosfato e, uma vez absorvido pelas raízes, é provável que seja levado ao xilema através de transportadores de fosfato no xilema (Meadows *et al* 2014). As plantas se livram do arsenato reduzindo-o a arsenito, uma forma que já não imita o fosfato e que pode ser prontamente excluída por raízes de volta ao ambiente externo.

A redução do arsenato é o primeiro passo para a desintoxicação. Além da exclusão por raízes, a desintoxicação pode envolver a complexação com peptídios ricos em tiol, como glutatona reduzida (GSH) e fitoquelatinas (PC), o sequestro vacuolar ou uma combinação de ambos (Tripathi *et al* 2012; Zhao *et al* 2010). Os ésteres de arsenato quando formados, são extremamente lábeis, o que limita a capacidade da vida terrena de substituir o arsênio pelo fósforo - um dilema crítico da química que seria problemático para ser superado pelos organismos vivos (Rosen *et al* 2011).

Isto nos levar a considerar o fato de que o enxofre é um elemento essencial e vital no crescimento da planta e na resposta a estresses. A absorção e a assimilação do sulfato são partes essenciais do metabolismo primário das plantas. A maioria das bactérias parasitas e os metazoários não reduzem o sulfato, portanto se especializaram na oxidação de formas reduzidas de enxofre para produção de energia (Kopriva *et al* 2015). A cisteína é o precursor ou doador de enxofre reduzido para a maioria dos outros compostos orgânicos de enxofre em plantas, servindo como um precursor para uma gama de compostos de defesa contendo S, tais como metionina, S-adenosilmetionina (SAM), glucosinolatos, formação do agrupamento de Fe-S no aparelho fotossintético e na cadeia de transporte de elétrons e GSH. (Iqbal *et al* 2013).

É notável que plantas tenham desenvolvido mecanismos para detectar e responder a mudanças ocasionadas pela presença de diferentes agentes estressores, incluindo metais pesados. De acordo com Rejeb *et al.* (2014), esses mecanismos são extremamente elaborados e multigênicos, muitas vezes convergindo em genes compartilhados por diferentes estresses. Os estresses abióticos desencadeiam uma ampla

gama de sinais locais e de longa distância, que devem ser coordenados e integrados em processos de planta inteira, como o crescimento e o desenvolvimento, para que a planta responda adequadamente e sobreviva. (O'Brien & Benková 2013). Vários hormônios funcionam como reguladores chave da tolerância ao estresse, conectando estímulos locais a respostas sistêmicas.

Pesquisas recentes têm permitido o avanço na compreensão dos diversos papéis de fitohormônios em resposta a estresses abióticos (Chandrakar *et al* 2016; Faroq *et al* 2016; Keunen *et al* 2016; Mohan, *et al* 2016; Bielach *et al* 2017; Vishwakarma *et al* 2017). O uso de abordagens genômicas, proteômicas e metabolômicas estão ganhando espaço não apenas em plantas modelo assim como em diferentes culturas (Joshi *et al* 2016) e tem demonstrado que diversos genes relacionados a fitohormônios estão envolvidos em resposta a metais pesados ou que a aplicação exógena de determinados fitohormônios seja capaz de reverter efeitos tóxicos em resposta a diferentes tipos de estresses ou ainda ou então descobrindo possíveis mecanismos de sinalização e regulação de vias metabólicas (Khan *et al* 2015; Hossain, *et al* 2013; Srivastava *et al* 2013; Srivastava *et al* 2015).

Essas estratégias investigativas estão desvendando novos crosstalk entre as diferentes classes de hormônios do estresse, o que poderá permitir entender melhor o papel de fitohormônios no controle do crescimento mediado pelo arsênio, o que segundo Zwack & Rashotte (2015), ainda é de conhecimento bastante remoto. Com auxílio de espectrometria de massas, pretendemos auxiliar na compreensão das alterações decorrentes da oferta diferenciada de enxofre e como isso afeta o crescimento em *E. crassipes*, o acúmulo de arsênio e as interações com fitormônios na percepção e resposta ao estresse.

2. Metodologia

2.1- Obtenção do material vegetal

As plantas aquáticas da espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, foram coletadas na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa (MG – Brasil) e mantidas por 24 horas em água desionizada, esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% durante 1 min, sendo então lavados em água corrente e água destilada. Em seguida, as plantas foram transferidas para recipientes de polietileno, com solução nutritiva de Clark (Clark 1975), pH 6,5, e colocadas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $230 \mu\text{mol f\u00f3tons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), sob fotoper\u00edodo de 16 horas, onde permaneceram por tr\u00eas dias. Ap\u00f3s o per\u00edodo de aclima\u00e7\u00e3o, as plantas foram selecionadas de acordo com a massa fresca, uniformidade de tamanho e n\u00famero de folhas (2 a 3 folhas expandidas), sendo posteriormente mantidas em caixas de pl\u00e1sticos sob aera\u00e7\u00e3o em solu\u00e7\u00e3o nutritiva de Clark, pH 6,5 conforme o pr\u00e9-tratamento.

2.2 – Pr\u00e9-Tratamento

Plantas foram pr\u00e9-tratadas por 6 dias em caixas pl\u00e1sticas aeradas contendo solu\u00e7\u00e3o nutritiva de Clark com 1/4 da for\u00e7a i\u00f4nica, com baixa disponibilidade de enxofre no meio ($2,5 \mu\text{M SO}_4^{2-}$), trocada a cada 48h. O MgCl_2 foi usado como fonte de magn\u00e9sio em detrimento do MgSO_4 .

2.2.1- Aplica\u00e7\u00e3o do stress por Ars\u00eanio em plantas contendo ou n\u00e3o a suplementa\u00e7\u00e3o de enxofre

Ap\u00f3s o pr\u00e9-tratamento, plantas foram transferidas, individualmente, para frascos de vidro, contendo 500ml de solu\u00e7\u00e3o nutritiva de Clark 1/4 for\u00e7a. Os tratamentos contendo doses distintas de enxofre foram os seguintes: Tratamento com baixa disponibilidade de enxofre (LS); tratamento com enxofre dispon\u00edvel (NS); tratamento com alta disponibilidade de enxofre (HS). Em cada um destes tratamentos, quatro (4) repeti\u00e7\u00f5es contendo $8,0 \mu\text{M}$ de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, e 4 repeti\u00e7\u00f5es controle para cada um dos tratamentos.

2.3 – Determina\u00e7\u00e3o do teor de ars\u00eanio (As) enxofre (S) e f\u00f3sforo (P)

Para determina\u00e7\u00e3o dos teores de ars\u00eanio, enxofre e f\u00f3sforo o material vegetal foi

separado entre folhas e raízes, que foram secas em estufas a 80°C. Após a secagem, o material foi macerado, e aproximadamente 0,1 g de massa seca de raízes e folhas foram submetidos à mineralização úmida com 3 mL de uma mistura nítrico-perclórica 2:1, à temperatura de 100-130 °C até a completa oxidação da matéria orgânica (Allan 1969). As amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, analisadas por ICP- MS (Departamento de Solos – UFV).

2.4- Determinação da taxa de crescimento relativo (TCR)

A taxa de crescimento relativo das plantas foi calculada utilizando-se a equação proposta por Hunt (1978): $TCR = (\ln MS_1 - \ln MS_0) \times 1000 / (t_1 - t_0)$ em que: TCR = taxa de crescimento relativo, em termos de massa seca (MS), no período experimental ($mg\ g^{-1}\ dia^{-1}$); $\ln MS_1$ e $\ln MS_0$ = logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente; $t_1 - t_0$ = duração do experimento (em dias).

2.5 -Determinação do fator de transferência (FT)

O fator de transferência (FT) será calculado pela seguinte equação: $FT = CPA/CR$, em que: CPA = concentração de As na parte aérea, em $mg\ g^{-1}\ MS$; CR = concentração de As na raiz, em $mg\ g^{-1}\ MS$. (Mishra *et al* 2008)

2.6- Determinação de Malondialdeído (MDA)

Amostras de 0,16 g de folhas e de raízes foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), seguido de filtração através de quatro camadas de gaze e centrifugação a 10.000 xg por 15 minutos a 4 °C. A uma alíquota de 0,8 mL do sobrenadante (modificado) foi adicionado a 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Em outra alíquota de mesmo volume foi adicionada 1,5 mL de solução de TCA 20% sem TBA. Os tubos contendo as amostras e o meio de reação foram fechados e incubados em banho-maria, à temperatura de 95 °C, por 2 horas. Em seguida, a reação foi paralisada em banho de gelo, por 10 minutos. Posteriormente foi centrifugada a 3.000 xg, por 10 minutos, a 4 °C. A absorvância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro UV/visível Hitachi, modelo U-5100, utilizando o comprimento de onda de 532 nm. A absorvância inespecífica foi determinada a 600nm e 400nm e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi obtida mediante utilização do coeficiente de absorvidade molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Hodges *et al* 1999), sendo os resultados expressos em nmol g⁻¹ de massa fresca.

2.7- Determinação teor de Peróxido de Hidrogênio

Aproximadamente 200mg de matéria vegetal foram homogeneizados em nitrogênio líquido e almofariz, acondicionando o extrato em eppendorfs. Foi adicionado 1ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e as amostras agitadas no vortex. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000g por 15 minutos e 4°C. O sobrenadante foi medido e recolhido em novo tubo. A reação foi realizada com 0,8ml de extrato + 0,5ml de tampão fosfato 0,2M (pH 7,0) + 2,0ml de iodeto de potássio (KI) 1M e incubada por 2 horas no escuro (Alexiava *et al* 2001, com modificações), tendo a leitura em espectrofotômetro sido realizada a 390nm.

2.8- Determinação dos teores de Tióis e Hormônios Vegetais

Cerca de 150mg de material fresco de folhas e raízes foram trituradas em nitrogênio líquido para rompimento do material vegetal. Em seguida foram adicionados 400 µL de uma solução extratora (metanol 20% - Isopropanol 79% - ácido acético 1%) a 110 mg de material vegetal. Nessa etapa, foi adicionado ácido naftaleno acético (NAA) como normalizador interno na concentração de 50 ng/g e cada amostra foi vortexada 4 vezes por 20 seg, mantendo-as no gelo, e sonicadas em ultrassom por 5 min a 4°C. As amostras foram deixadas no gelo por 30 min e sonicadas em ultrassom por 5 min e centrifugadas 14.000 g por 30 min a 4°C para que os restos celulares se sedimentassem.

Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos. Um novo ciclo de extração foi realizado com o precipitado da extração anterior para maximizar a eficiência de extração. As amostras contendo os hormônios extraídos foram armazenadas a -80°C até o momento da análise por LC/MS do tipo UHPLC QqQ.

2.8.1- Monitoramento e quantificações de hormônios

Aproximadamente 300 µL das amostras extraídas foram colocadas em vials e 5,0 µL dos extratos foram injetados no sistema LC/MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV. Utilizou-se a coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,3 mL/min, acoplada online a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (Agilent). O espectrômetro de massa operou alternando o modo positivo e negativo de acordo com tempo de retenção para cada hormônio e escaneou a amostra no modo MRM (multiple reaction monitoring) para detecção de cada hormônio como mostrado na Tabela S1. Os ensaios foram realizados para quatro réplicas biológicas para cada

tratamento. Os espectros de massas gerados foram processados utilizando o software MassHunter para obtenção dos cromatogramas extraído (XIC) de cada transição e para obtenção dos valores de área como indicativo da abundância de cada hormônio. Uma curva padrão de cada hormônio, variando concentrações de 0,1 a 300 ng/mL, foi utilizada para converter os valores de área em quantidade massas em ng/g de tecido vegetal.

2.9- Extração e determinação da atividade das redutases da glutathiona (GR)

Amostras de massa fresca de raízes e folhas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados um meio de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 1 mM, triton 0,02%, DTT (ditiotreitól) 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1%, conforme metodologia recomendada por Carlberg & Mannervik (1985). O homogeneizado, depois de filtrado, centrifugado a 12.000 xg por 15 min, a 4°C e o sobrenadante utilizado para análise da atividade enzimática. A atividade das GRs será determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, GSSG 20 mM, NADPH 2 mM. O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30° C, será medido no primeiro minuto de reação, sendo a atividade da GR determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,4 a 0,8 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática será calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em nmol de glutathiona oxidada min⁻¹ mg⁻¹ proteína. (Leão *et al* 2014).

2.10- Determinação de parâmetros de trocas gasosas

Os parâmetros relacionados às trocas gasosas foram determinados em casa de crescimento de plantassistema aberto, sob luz saturante (1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração ambiente de CO₂, com um analisador de gases a infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho modelo LI-6400-02B (LI-COR) conforme descrito em DaMatta *et al* (2002) e Lima *et al* (2002).

2.11- Determinação dos teores de Clorofilas e carotenoides

Para a extração dos pigmentos cloroplastidiais, utilizou-se como extrator o dimetilsulfóxido (DMSO) com carbonato de cálcio. Foram usados 25g de carbonato de cálcio para cada 500 ml de solução. Após misturar, a solução foi agitada por 2 horas e em seguida, filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo até ficar transparente. Foram

retiradas cinco discos foliares, os quais tiveram sua massa fresca aferida (valores médios totais de 0,12 g de massa fresca). Os discos foliares foram colocados em tubos de ensaios com 10 ml de solução com DMSO, em conformidade com Barnes *et al* (1992). Os frascos foram vedados com plástico filme pvc e envolvidos com papel alumínio por 24 horas. As análises foram feitas nos comprimentos de onda de 480nm, 645nm e 660nm de acordo com Arnon (1949). As equações para o cálculo das clorofilas foram baseadas em metodologia descrita por Arnon (1949) e para os carotenoides, conforme descrita por Lichtenthaler (1987).

2.12- Determinação dos teores de amido e sacarose

Amostras de folhas contendo 10mg de material liofilizado foram submetidas à extração metanólica. Foram adicionados 700µl de metanol para maceração. Após a maceração, o material foi coletado em eppendorf de 2ml e levado ao vortex por 15s. Em seguida, o material foi levado ao termomix por 15 minutos a 70°C. A reação foi parada com gelo. Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a 14.000 RPM. O sobrenadante foi coletado, adicionando-se 375 µl de clorofórmio e 750 µl de H₂O pura. Os novos tubos foram então centrifugados por 15 minutos a 4000 RPM. O sobrenadante foi então novamente recolhido (1000µl aproximadamente) em novos tubos (fração solúvel) de onde se determinou os teores de sacarose. As amostras em sua fração insolúvel foram secas em speed vacuum over-night. A partir da fração insolúvel, os teores de amido foram determinados (Ferne *et al* 2001).

2.13- Delineamento experimental e Análises estatísticas

Os experimentos foram montados em DIC num arranjo fatorial 3 x 2, com quatro repetições. Foram realizados a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de TUKEY com auxílio do Software SAS System 9.0 e Software R.

3-Resultados

3.1- O reabastecimento de enxofre potencializa a translocação de arsênio para folhas de Eichhornia crassipes pré-tratadas com fome de enxofre

Após 24h do reabastecimento de enxofre e aplicação do estresse pelo metal, os níveis de enxofre e arsênio presentes na parte aérea e raízes de *E. crassipes* foram mensurados e encontram-se representados na figura 1.

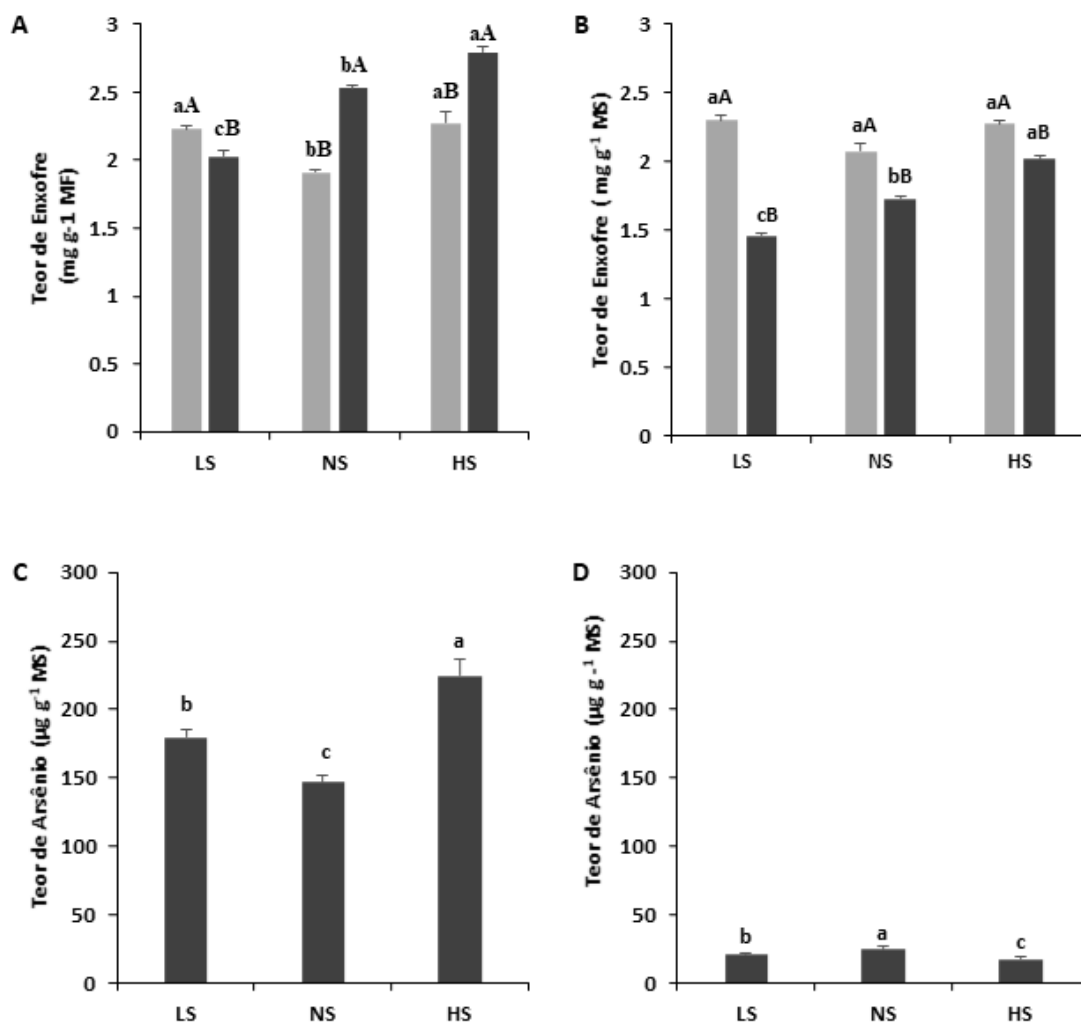


Figura 1 - Partição de enxofre e arsênio em *Eichhornia crassipes*. A e C) Teores de enxofre e arsênio em folhas de *E. crassipes*. B e D) Teores de enxofre e arsênio em raízes de *E. crassipes*. Legenda: - CTR – Controle ; (LS) baixo teor de enxofre disponível ; (NS) enxofre disponível; (HS) alto teor de enxofre disponível. – contendo As (V): 0μM (Cinza Claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Na ausência de As (V), os teores de enxofre em folhas nos tratamentos LS e HS foram semelhantes e superiores ao encontrado em NS, mas não foram significativamente distintos entre si. Na presença do arsênio em meio LS+As, os teores de enxofre foram reduzidos enquanto que nos meios NS+As e HS+As, os teores de enxofre em folhas foram aumentados (32,07% e 22,7 % respectivamente), sendo em meio HS+As observado os maiores valores (Figura 1A). Em raízes, na ausência do metal, os teores de enxofre não diferiram significativamente após 24h do

reabastecimento. Quando presente, arsênio reduziu os teores de enxofre em raízes (38,03% em LS+As; 16,48% em NS+As; 11,04% em HS+As) (Figura 1B). No que diz respeito ao arsênio acumulado, folhas em meio HS+As acumularam os maiores teores de arsênio, seguida pelas folhas em meio LS+As. Em raízes, o acúmulo de arsênio após 24hs foi significativamente inferior ao observado em folhas, sendo que os menores teores de arsênio acumulado foram observados em meio HS+As (Figuras 1C e 1D).

Decorridos 72h após o reabastecimento e aplicação do metal, os teores de enxofre em folhas foram reduzidos, principalmente na presença do metal, sendo em meio LS+As, a queda mais proeminente (27,4%) (Figura S1.1A). No caso de raízes, após 72hs, o teor de enxofre foi drasticamente reduzido em meio LS (39,98%). Na presença do metal, mesmo com o aumento do teor de arsênio acumulado em raízes após 72, nos meios NS+AS e HS+As os teores de enxofre não foram modificados em relação ao observado com 24hs. Contudo, na presença do metal, os teores de enxofre foram reduzidos após 72hs, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura S1.1B.).

É importante salientar que após 72h, os teores de arsênio encontrados na parte aérea foram consideravelmente superiores, chegando a $700\mu\text{g g}^{-1}$ MS ou seja, $0,7\text{mg g}^{-1}$ MS em meio HS+As. Da mesma forma, os teores de arsênio em raízes foram de forma significativa aumentados. Em ambos os casos, após 72h do reabastecimento, os teores de arsênio foram maiores, quanto maior a disponibilidade de enxofre (Figura S1.1C e S1.1D). Em outras palavras, é possível observar que o aumento dos teores de arsênio nas raízes é acompanhado por um decréscimo nos teores de enxofre na parte aérea, que por sua vez, também aumenta os teores de arsênio acumulados, no mesmo instante em que as raízes também o fazem.

Como uma forma de ilustrar melhor essas diferenças na translocação do metal para parte aérea nos diferentes tratamentos, a tabela1 mostra um comparativo entre os diferentes valores de obtidos para o fator de translocação (FT) de arsênio entre os tratamentos LS, NS e HS.

Tabela 1- Fator de Translocação de arsênio em *E. crassipes*. Legenda: Ls: baixa de enxofre; NS: enxofre disponível normal e HS: enxofre alto; FT: fator de translocação

Parâmetro	Tempo (h)	Tratamentos		
		LS	NS	HS

FT	24	5,91 A*c**	8,42Ab	12,64Aa
FT	72	2,66 Bb	2,53 Bb	3,02Ba

* Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.** Médias seguidas por letras minúsculas dentro de um mesmo intervalo de tempo não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Nela é possível observar que durante as primeiras 24h, o fator de translocação de arsênio para a parte aérea chegou a ser 4x maior como observado no tratamento HS. Tal situação promoveu um acúmulo inicial de metal na parte aérea de *E. crassipes*, em detrimento das raízes, visto que o acúmulo de enxofre na parte aérea leva também a um maior acúmulo de arsênio. Após 72h de exposição, há uma redução considerável do fator de translocação de arsênio em ambos os tratamentos.

3.2- Maior disponibilidade de enxofre aumenta o crescimento foliar e reduz a perda de biomassa radicular em *E. crassipes*

Na ausência de As(V), a TCR na parte aérea aumentou em folhas de maneira crescente com o aumento da disponibilidade de enxofre (Figura 2A). Folhas de *E. crassipes* cultivadas em meio HS obtiveram as maiores taxas de crescimento relativo de sua parte aérea, tanto na ausência, como na presença de As(V). A presença de arsênio afetou o crescimento em ambos os tratamentos, sendo que em NS+As, o crescimento foi o mais afetado (queda de 43,17%). Em contrapartida, folhas cultivadas em meio LS+AS e HS+As foram menos susceptíveis ao retardo na taxa de crescimento relativo foliar (queda de 19,68% e 19,92%, respectivamente). Entretanto, cabe ressaltar que mesmo que os valores de queda na taxa de crescimento tenham sido equivalentes, a TCR foliar no meio HS na presença de arsênio foi superior àquela observada em meio LS. Em meio LS, o acúmulo de biomassa em folhas não estressadas por arsênio foi inferior aos demais tratamentos (NS < HS).

Quando presente, AS(V) proporcionou uma queda de 58,91% no crescimento das raízes cultivadas em meio com baixa disponibilidade de enxofre (Figura 2B). Raízes de plantas cultivadas em meio LS, na ausência do metal, obtiveram o maior valor de TCR em relação aquelas cultivadas em meio com maior disponibilidade de enxofre (NS e HS).

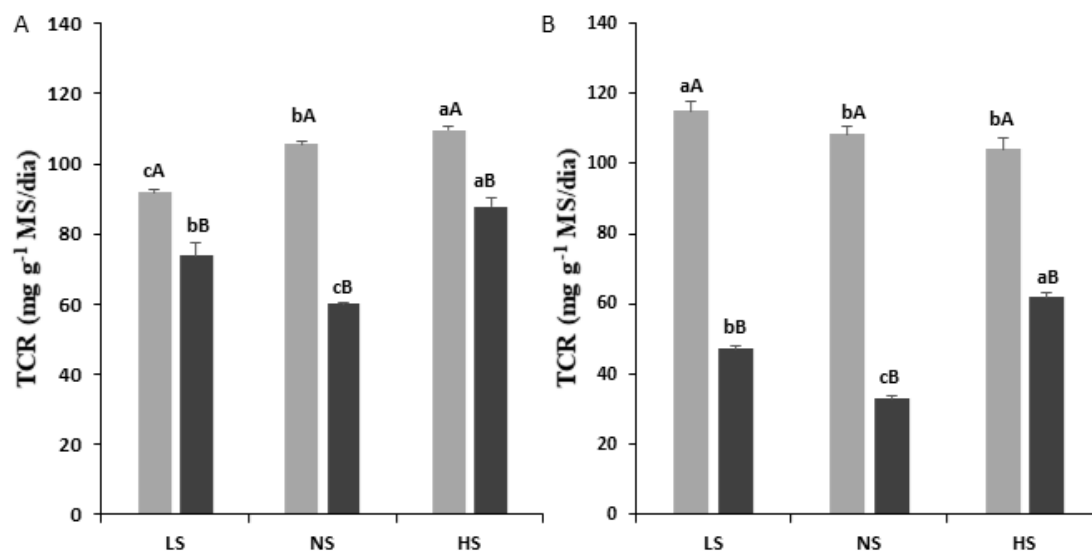


Figura 2 – Taxa de Crescimento Relativo (TCR) em folhas e raízes de *Eichhornia crassipes* Legenda: A) Folhas; B) Raízes; (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza Claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro) *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Entretanto, a maior queda observada em relação a TCR em raízes de *E. crassipes* (69,73%) foi observada em raízes crescendo em meio NS. Por outro lado, a maior disponibilidade de enxofre (HS) em solução parece ter contribuído para uma menor taxa de redução no crescimento de raízes (34,12%).

3.3- A absorção e a translocação de arsênio afetam a integridade das membranas celulares

Os teores de peróxido de hidrogênio em folhas e raízes de *E. crassipes* estão representados na figura 3. É possível perceber que na presença do metal, a produção do peróxido foi acentuada, sendo mais elevada em folhas. Além disso, os maiores teores de peróxido, coincidem com os maiores teores de arsênio acumulados em folhas e raízes. Em folhas no meio HS+As, foram observados os maiores teores, seguidos por LS+AS. Já em raízes, os maiores valores de peróxido de hidrogênio observado foi em NS+As e os menores teores observados em meio HS+As.

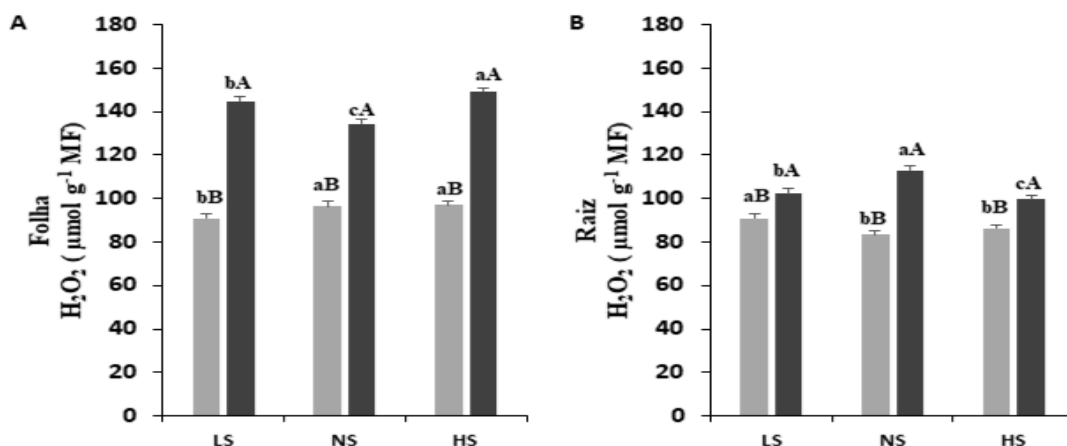


Figura 3 – Teor de Peróxido de hidrogênio em folhas e raízes de *Eichhornia crassipes* após 24hs do reabastecimento. Legenda: A) Folhas; B) Raízes; (LS) baixo enxofre; (NS) disponível enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As (V): 0μM (Cinza Claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro) *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey

O acúmulo de arsênio na parte aérea e raízes afeta a integridade de membranas celulares, ocasionando danos a essas estruturas, o que pode ser comprovado pelo aumento considerável na concentração de malondialdeído (MDA) (Figura 4). Durante as primeiras 24h iniciais após o reabastecimento de enxofre, a peroxidação lipídica aumentou em folhas e raízes. Entretanto um aumento considerável na concentração de malondialdeído foi observado principalmente na parte aérea de *E. crassipes* (Figuras 4A e 4B).

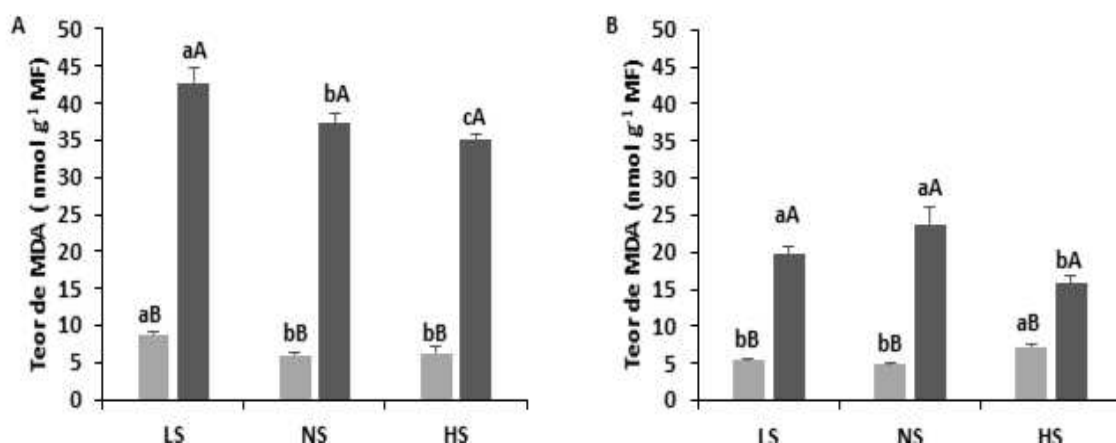


Figura 4 - Teor de Malondialdeído (MDA) folhas (A) e raízes (B) de *Eichhornia crassipes*. *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio (cinza claro) e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio (cinza escuro) não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey

teste de Tukey

Plantas em meio com baixa disponibilidade de enxofre sofreram mais as consequências da peroxidação lipídica. Em raízes estressadas pelo metal durante as primeiras 24h, o teor de MDA foi estatisticamente indistinto entre plantas cultivadas em meio LS+As e NS+As, sendo inferior em meio HS. No entanto, decorridos cerca de 72h, a formação de MDA foi aumentada, especialmente em folhas e raízes crescendo em meio LS+AS (Figura Suplementar S1.2 A e B).

3.4- O impacto sobre o Metabolismo Fotossintético em folhas de *Eichhornia crassipes* ajuda a compreender os efeitos deletérios do arsênio.

A presença de arsênio e outros metais pesados afetam diretamente o metabolismo central de plantas. A rápida translocação de arsênio para folhas de *E. crassipes* trouxe consequências em diversos parâmetros relacionados ao processo central do metabolismo vegetal (Figuras 5 e 6).

A concentração de clorofilas (Figura 5A) foi reduzida na presença do metal, sendo que em folhas crescendo em meio HS, essa redução foi menor. Além disso, folhas em meio HS tiveram teores de clorofilas, de uma forma geral, superiores aos observados nos demais tratamentos, independente da presença do metal, enfatizando o papel preponderante do enxofre na formação de metabólitos envolvidos na biossíntese de clorofilas. Cabe ainda ressaltar, que plantas em meio LS, na ausência de arsênio, também elevaram num primeiro momento, seus teores de clorofilas, quando comparados a folhas crescendo em meio NS. Após 72hs, a redução no teor de clorofilas se acentuou, especialmente em folhas LS+As (Figura Suplementar S2.2 A).

O teor de carotenoides (Figura 5B) em folhas de *E. crassipes* também foi afetado pela presença de arsênio, sendo que a maior oferta de enxofre em solução contribuiu para que este decréscimo fosse menor (em torno de 10%, contra 16,7% em NS e 20,5% em LS). Por outro lado, a menor oferta de enxofre contribuiu para um decréscimo mais acentuado. No entanto, decorridos 72h o teor de carotenoides continuou a cair, sendo que em meio HS+As, os teores permaneceram maiores que nos demais tratamentos na presença do metal (Figura Suplementar 2.2B).

A eficiência de operação do fotossistema II foi prejudicada, sendo o impacto maior em LS+As (Figura 5C). Essa perda de eficiência está relacionada diretamente com a queda acentuada na taxa de assimilação líquida de carbono após as 24h iniciais após o

reabastecimento (Figura 5D).

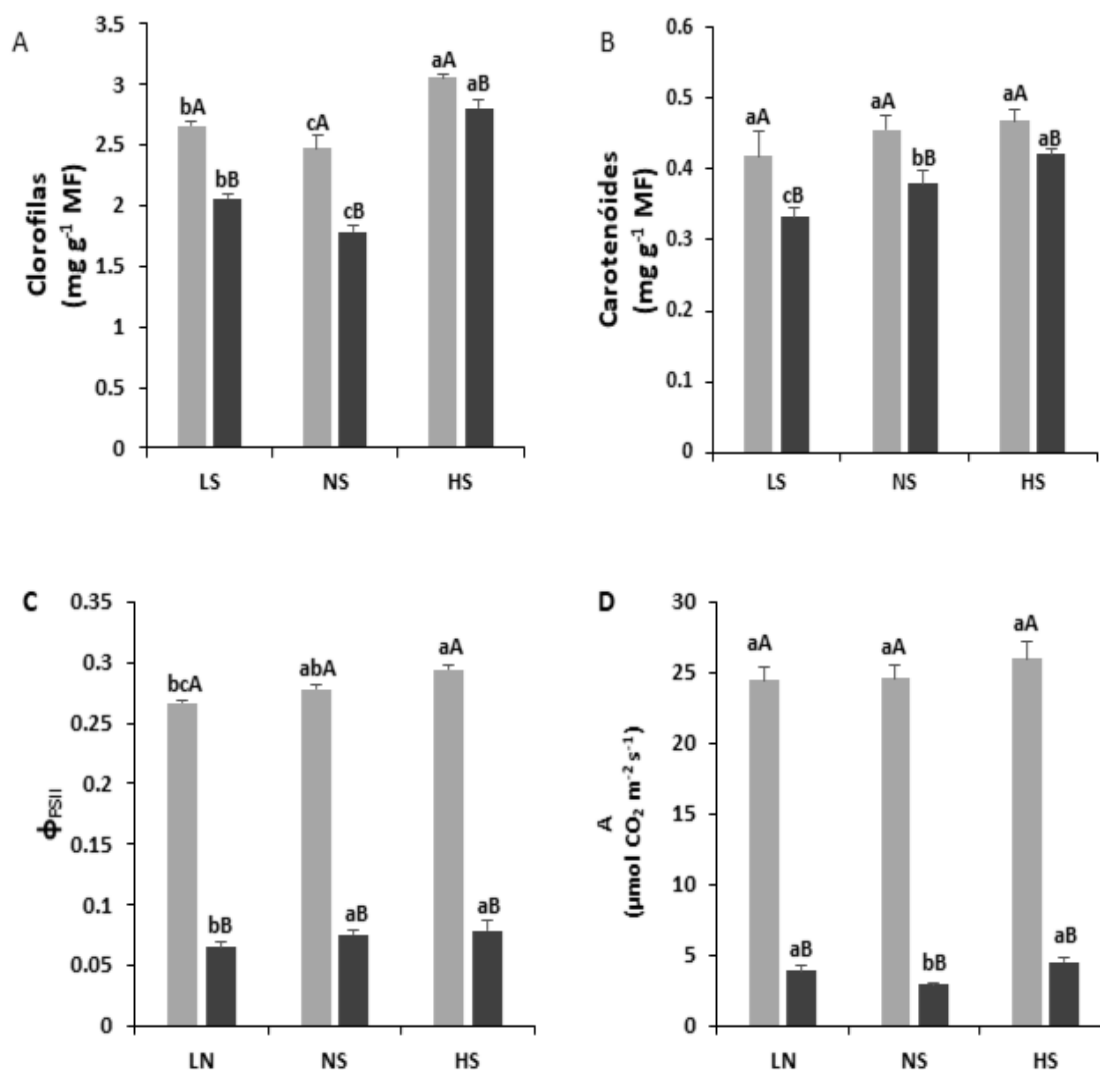


Figura 5 – Clorofila Total (A), Carotenóides (B), Eficiência de operação do fotossistemaII (ETR) (C) Taxa de assimilação líquida de Carbono (D) em folhas de *Eichhornia. crassipes*.- *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio (cinza claro) e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo 8μM de arsênio (cinza escuro) não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Esse comportamento permanece pelas próximas 72h, sendo que LS+AS, reduz um pouco mais a sua taxa fotossintética, permanecendo HS+As com uma taxa “levemente” superior aos demais (Figura Suplementar S2.1).

Em se tratando da taxa transpiratória (*E*) (Figura 6A), a presença do metal não alterou este parâmetro nas primeiras 24h, sendo observado um decréscimo posterior a

este período (Figura Suplementar S. A condutância estomática (g_s) também foi reduzida pela presença do metal (Figura 6B), sendo que os valores encontrados em folhas LS+As foram superiores aos demais.

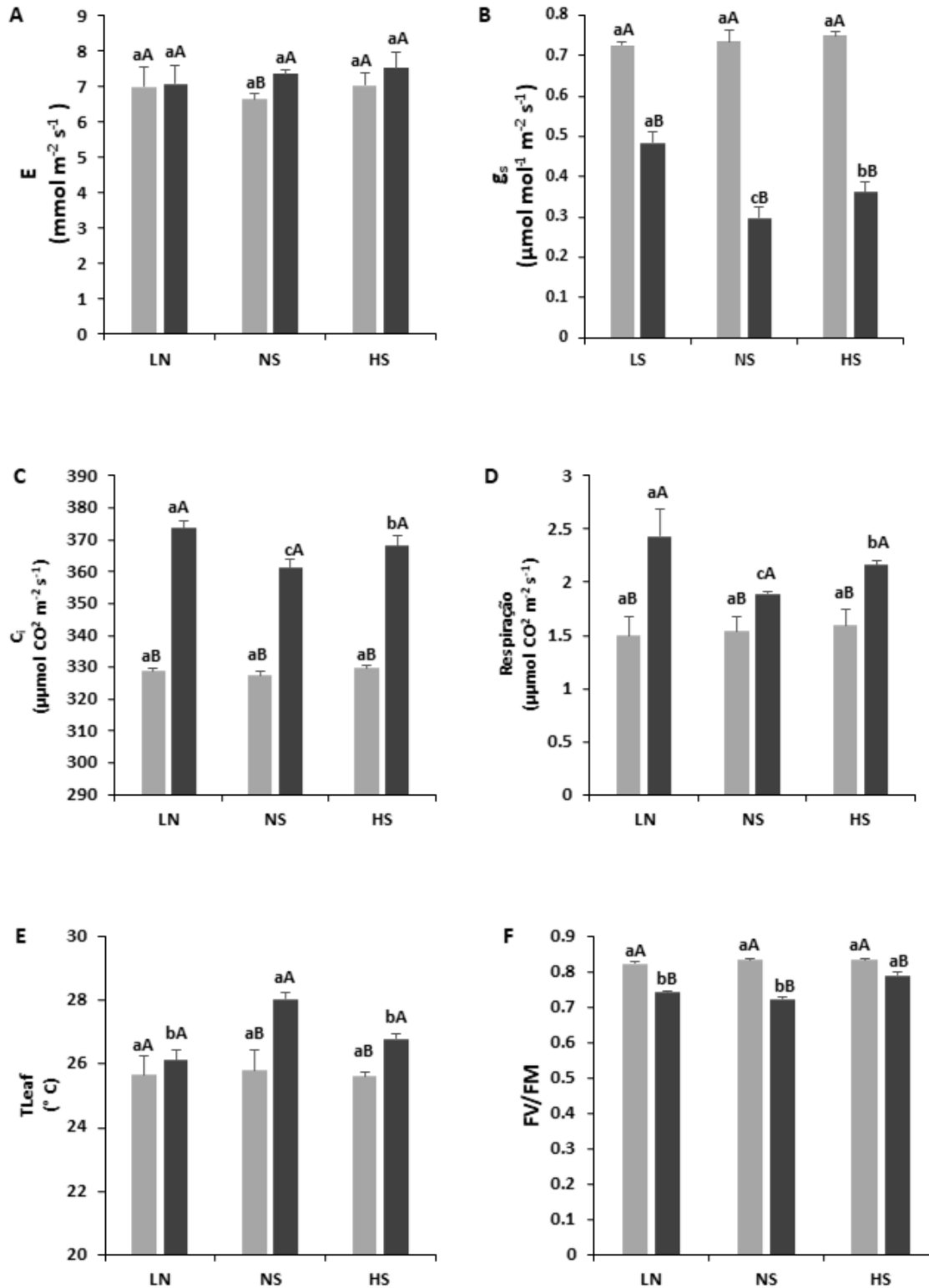


Figura 6 – Transpiração (A), Condutância estomática (B), Concentração interna de Carbono (C), Taxa Respiratória (D) Temperatura foliar (E) e Rendimento quântico do

fotossistema II (F) em folhas de *Eichhornia crassipes*. *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio (**cinza claro**) e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo 8µM de arsênio (**cinza escuro**) não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey

A exposição ao metal elevou de uma maneira geral a concentração interna de CO₂ em folhas de *E. crassipes* (Figura 6C). Entretanto, essa elevação ocorreu de maneira diferenciada em função da disponibilidade de enxofre, tendo folhas em meio LS+AS e HS+As demonstrado teores mais elevados do que NS+As. A taxa respiratória foi outro parâmetro alterado em folhas de *E. crassipes*, sendo elevada na presença do metal, especialmente em folhas crescendo em meio LS+AS (Figura 6D).

Um outro efeito observado foi a elevação da temperatura foliar nas primeiras 24h após o contato com o metal, especialmente em folhas no meio NS+AS. No entanto, decorridos 72h, uma elvação mais destacada foi observada em plantas que acumulam mais arsênio (Figura Suplementar S7.1). Além disso, o rendimento quântico do fotossistema II é reduzido na presença do metal, especialmente em NS+As nas primeiras 24h, tendo no entanto sido mais afetado em LS+As após 72h de exposição ao metal (Figura Suplementar 8.1).

3.5- Arsênio afeta negativamente o pool de amido e sacarose enquanto a maior disponibilidade de enxofre permite o aumento das reservas energéticas em folhas de *E. crassipes*

Arsenato afeta o metabolismo de sacarose de amido em folhas de *E. crassipes* (Figura 7). Os teores de amido na ausência de arsenato foram maiores, quanto maior a disponibilidade de enxofre em solução. Na presença do metal, plantas em meio NS+As apresentaram os menores teores de amido e o maior decréscimo proporcional em seus teores.

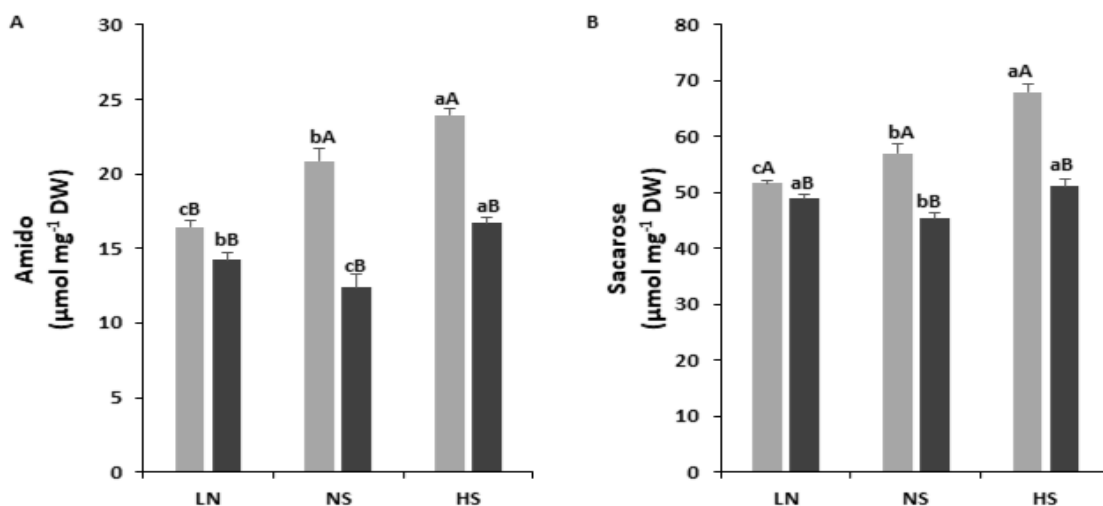


Figura 7-Teores de amido (A) e sacarose (B) em folhas de *E. crassipes*.- *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio (**cinza claro**) e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo 8µM de arsênio (**cinza escuro**) não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey

Da mesma forma que o amido, os teores de sacarose foram maiores à medida que a concentração de enxofre em solução aumentou na ausência do metal. Quando presente, os teores de sacarose foram reduzidos. É importante ressaltar, que mesmo ocorrendo um decréscimo nos teores de amido e sacarose, em meio LS+As, está queda foi menos pronunciada do que nos demais tratamentos.

3.6- O acúmulo de cisteínas em *E. crassipes* é potencializado com a maior oferta de enxofre e acumulação de arsênio.

Produto primário da rota de assimilação de enxofre, cisteína (Cys) é essencial para a estrutura e dobramento de proteínas, para o balanço redox e a síntese de várias biomoléculas essenciais as plantas. Na figura 4, os teores do “pool” de Cys em folhas e raízes de *E. crassipes* estão demonstrados. Folhas, de uma maneira geral apresentaram teores mais elevados de cisteínas do que raízes, independentemente da presença ou não do metal pesado.

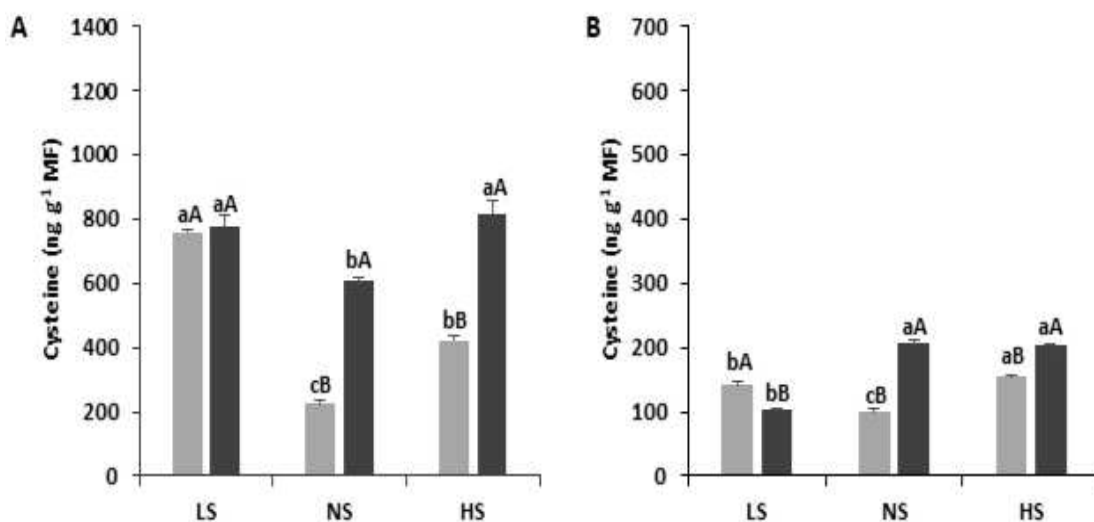


Figura 8 - Teores do pool de L-Cisteína (Cys) em folhas (A) e raízes (B) de *Eichhornia crassipes* após 24h do reabastecimento Legenda- (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0µM (Cinza claro) ou As(V): 8µM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Na Figura 8A, folhas de *E. crassipes* cultivadas em meio com baixa

disponibilidade de enxofre elevaram seus teores de Cys, não diferindo entre si quanto a presença do metal. Em meio NS+As e HS+As os teores de cisteínas aumentaram em folhas, sendo que o teor em meio HS+As foi similar ao encontrado em folhas em meio com pouca disponibilidade de enxofre. Em raízes, na ausência do metal, plantas em meio HS obtiveram maiores teores. Quando presente, raízes em meio LS+As reduziram seu *pool* de cisteínas, enquanto NS+As e HS+As elevaram seus teores (figura 8B).

Após 72h do reabastecimento, folhas em meio LS reduziram seus teores de cisteínas, especialmente em meio LS+As. Folhas em meio NS+As mantiveram valores superiores na presença do metal, contudo, inferiores aos observados nas primeiras 24h. Folhas em meio HS+As elevaram seus teores após 72h (Figura Suplementar S3.1A). Já raízes em meio LS, reduziram consideravelmente seus teores de cisteínas. De uma forma geral, o pool de cisteínas foi reduzido após 72h do reabastecimento, sendo essa redução mais acentuada em raízes crescendo nos meios HS+As, LS e HS, respectivamente (Figura Suplementar S3.1B).

3.7- Arsenato eleva os teores de γ -glutamil-cisteína (yGC) em *E. crassipes*, impactando a rota de biossíntese de glutatona.

Os teores de yGC foram maiores em folhas do que aqueles observados em raízes de *E. crassipes* (Figuras 9A e 9B), independentemente de As (V) estar presente ou não no meio. A presença do arsênio eleva os níveis de yGC em folhas de *E. crassipes*, especialmente em HS+As (Figura 9A).

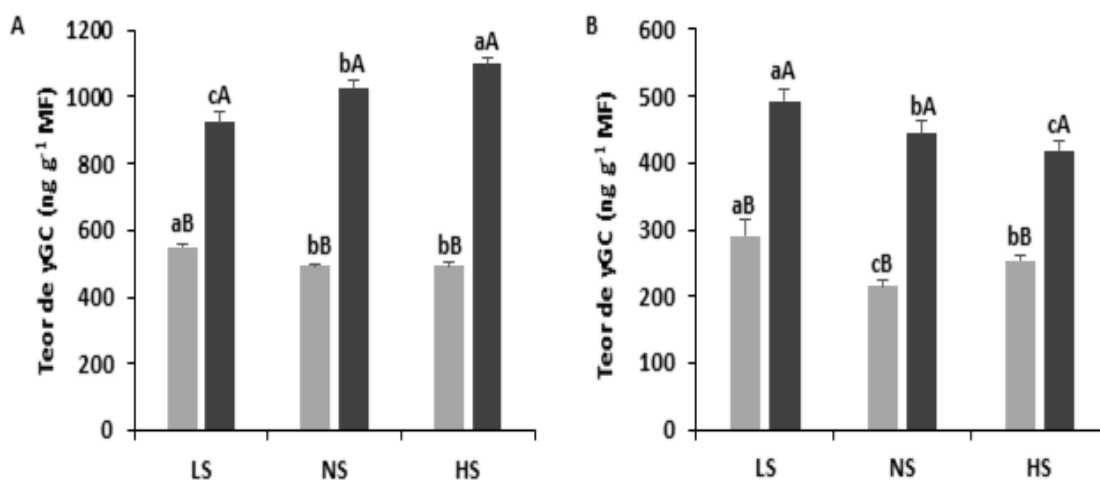


Figura 9 - Teores de γ -Glutamil Cisteína (yGC) em folhas (A) e raízes (B) de *Eichhornia crassipes*. Legenda: - (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0 μ M (Cinza claro) ou As(V): 8 μ M (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Quando ausente, folhas em meio LS mostraram-se com teores mais elevados de γ GC. Em raízes, a presença do metal também aumentou o nível de γ GC. Em meio menor disponibilidade de enxofre foram observados os maiores valores, tanto na ausência, quanto na presença do metal, especialmente em meio LS+As. Após 72hs, os teores de γ GC foram aumentados em folhas na ausência do metal, quando comparados com os valores obtidos após 24h. No entanto, em raízes crescidas na presença do metal, os teores de γ GC foram reduzidos em meio NS+AS e HS+As, principalmente neste último. Além disso, em meio HS, os teores de γ GC foram maiores com o passar do tempo (Figura Suplementar S4.1A e S4.1).

3.8- Glutathione redutase (GR) é essencial na tentativa de manutenção da homeostase redox em *E. crassipes* após o estresse por arsenato, contribuindo para alterar a disponibilidade de GSH.

A glutathione redutase e glutathione são dois componentes principais da via de ascorbato-glutathione (AsA-GSH) que desempenham um papel significativo na proteção de células contra ROS. Em folhas de *E. crassipes* (Figura 11A), a atividade de GR foi superior aos valores encontrados em plantas cultivadas sem a presença do metal.

Folhas de plantas em meio LS, na ausência de As(V) apresentaram-se com uma atividade de GR superior aos demais tratamentos, seguido por folhas em meio HS. Em raízes (Figura 11B), da mesma forma que em folhas, arsenato aumenta a atividade de GR e quando ausente, LS não diferiu de HS, mas ambos foram superiores a NS. De uma forma geral, os teores de atividade de GR em folhas foram superiores a raízes.

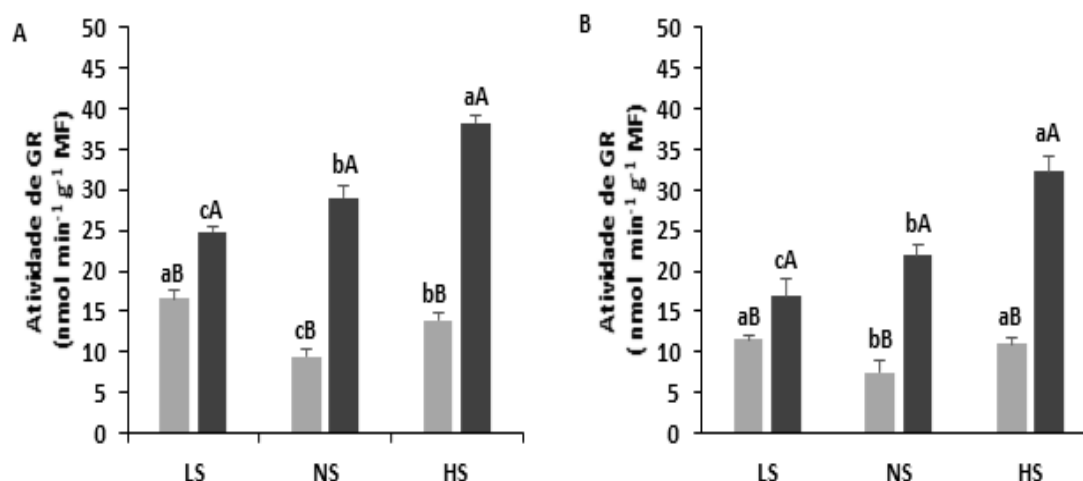


Figura 11 – Atividade de Glutathione redutase (GR) em folhas (A) e raízes (B) de *Eichhornia crassipes*. Legenda: - (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0 μ M (Cinza claro) ou As(V): 8 μ M (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de

Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Em plantas, GSH está envolvida em uma infinidade de processos celulares, incluindo uma importante forma de transporte e armazenamento de enxofre reduzido. Na ausência de arsenato, folhas de *E. crassipes* (Figura 10A) tanto em meio LS, quanto em meio NS tiveram teores inferiores aquelas cultivadas em meio HS. Na presença do metal, os teores de GSH elevaram-se, sendo que em meio HS+AS encontrado os maiores valores. Raízes de *E. crassipes* (Figura 10B) na ausência de As(V), mantiveram valores similares aos encontrados em folhas. Na presença do metal, raízes crescendo no meio NS+As obtiveram os maiores teores de GSH, sendo em meio LS+AS observado os menores.

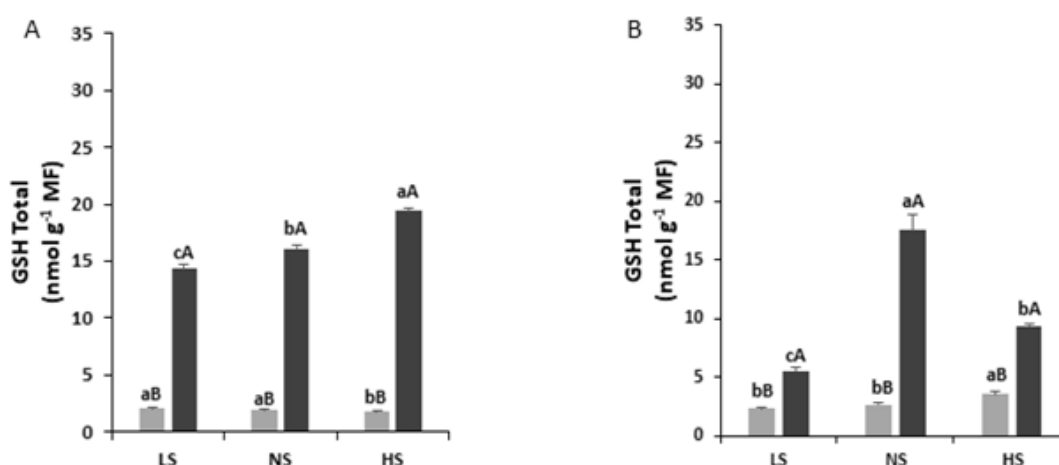


Figura 10- Teores de Glutathiona Total (GSH) em folhas (A) e raízes(B) de *Eichhornia crassipes*. Legenda: - (LS) baixo enxofre; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro).(Figura 4B) Teores de Glutathiona total (GSH) após 72hs nos respectivos tratamentos. *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Em folhas após 72h, os teores de glutathiona em meio LS+AS e HS+As foram aumentados. Após 72hs, o teor de glutathiona em raízes aumenta significativamente, assim como o acúmulo de arsênio. No entanto, raízes em meio LS+As apresentam os maiores teores de GSH. (Figura Suplementar S5.1A e S51.B).

3.9- Fitormônios atuam na percepção e resposta ao estresse por arsenato em *E. crassipes*

Os fitohormônios desempenham papéis essenciais na mediação da fisiologia das plantas e no alívio de várias perturbações ambientais. Jasmonatos ocorrem de forma

ubíqua no reino vegetal e desempenham papéis fundamentais em resposta ao desenvolvimento e percepção do ambiente. Na figura 12A, folhas de *E. crassipes* elevaram seus teores de ácido jasmônico de maneira considerável, sendo em meio LS+As observado os maiores valores. Em raízes, os teores de jasmonatos foram bastante inferiores ao observado em folhas. Na baixa disponibilidade de enxofre, independentemente da presença do metal, os níveis foram similares. No entanto, raízes em meio NS+As e HS+As tiveram teores inferiores de ácido jasmônico em relação aos respectivos controles (Figura 12B). Após 72h de exposição ao metal, raízes de *E. crassipes* elevaram seus teores de ácido jasmônico, especialmente em meio LS+AS (Figura Suplementar S6.2).

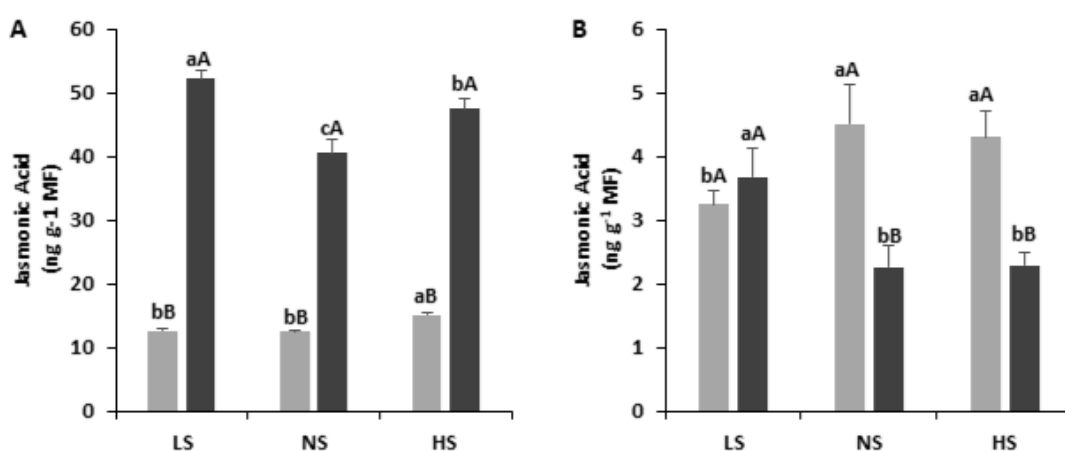


Figura 12 – Teores de Ácido Jasmônico (AJa) em folhas (A) e raízes(B) de *Eichhornia crassipes*. Legenda: - (LS) baixo enxofre ; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro).(Figura 4B) Teores de Glutathiona total (GSH) após 72hs nos respectivos tratamentos. *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Ácido salicílico é mais um fitormônio vegetal, assim como ácido jasmônico, que foram primeiramente associados a defesa contra estresses bióticos, que respondeu a presença do metal. Na figura 13, os teores de SA estão representados. Os teores de ácido salicílico foram em geral similares em folhas e raízes. Na ausência do metal, folhas LS e HS acumularam os maiores teores, especialmente em HS (Figura 13A). Em raízes, os teores encontrados foram inferiores aos observados em meio LS+As e HS+As (13B).

Quando presente, os teores de ácido salicílico foram superiores. Em folhas, os maiores valores foram encontrados em plantas crescendo em meio NS+AS. Já em meio LS+As foram registrados os menores valores. Raízes crescendo em meio LS+As não diferiram dos teores encontrados em folhas. Raízes em meio NS+As, assim como em

folhas, apresentaram os maiores valores. No caso de raízes crescendo em meio HS+As, os teores de ácido salicílico foram superiores aos encontrados em folhas HS+AS.

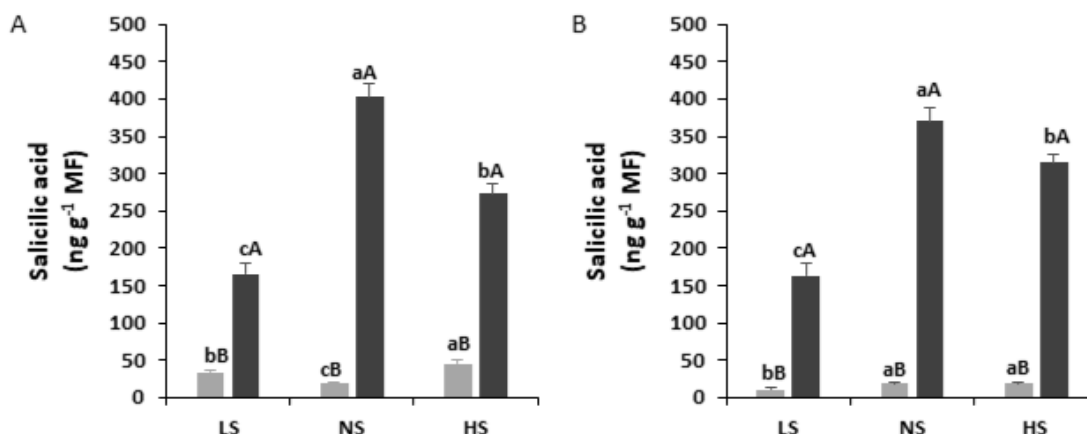


Figura 13-Teores de ácido salicílico (AS) em folhas (A) e raízes (B) de *Eichhornia crassipes*. Legenda- (LS) baixo enxofre ; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0µM (Cinza claro) ou As(V): 8µM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Existem inúmeros processos que estimulam o desenvolvimento e o crescimento das plantas. Entre os cinco principais hormônios de plantas, ABA ajuda a controlar muitas características de desenvolvimento e crescimento das plantas, como a abscisão da folha, a inibição da maturação dos frutos, a abertura e fechamento estomático, etc. Em folhas de *E. crassipes* sob condições axênicas, os teores de ABA se elevaram abruptamente, sendo que em meio HS, atingiu seus maiores teores (Figura 14A).

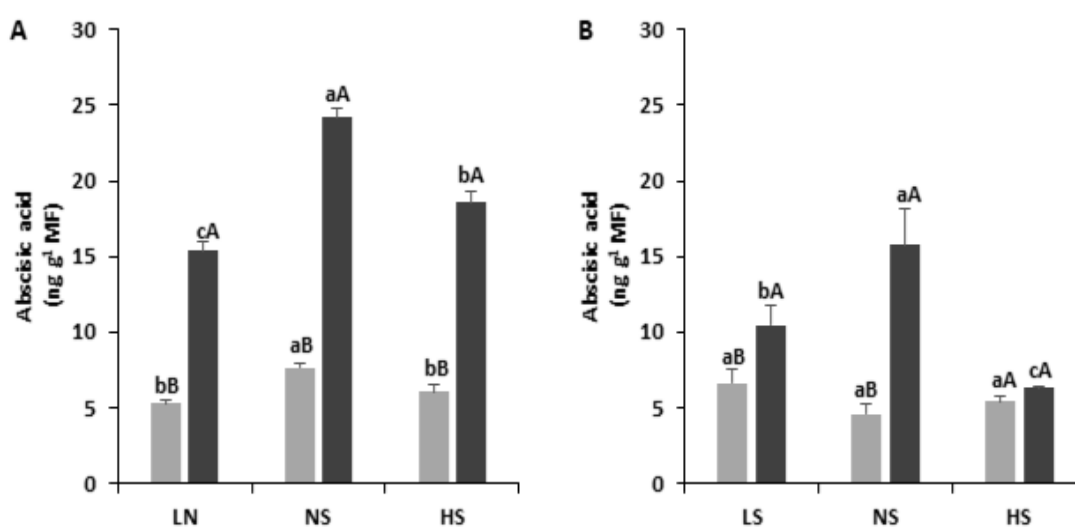


Figura 14 – Teores de Ácido Abscísico (ABA) em folhas (A) e raízes(B) de *Eichhornia crassipes*. Legenda: - (LS) baixo enxofre; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0µM (Cinza claro) ou As(V): 8µM (Cinza escuro) *Médias seguidas por letras minúsculas

iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Por outro lado, em condições de baixa disponibilidade de enxofre, os teores de ABA na presença do metal foram inferiores ao encontrado em meio HS e NS sob as mesmas condições (figura 14A).

Em raízes, os teores de ABA foram bastante elevados em raízes cultivadas em meio NS+As. Sob condições de oferta reduzida de enxofre, os teores de ABA em LS+As se elevaram, contudo foram inferiores aos encontrados em meio NS+AS, mas superiores ao que foi observado em HS+As (Figura 14B). NA ausência do metal, econdições de maior oferta de enxofre (NS), os teores de ABA sofreram pouquíssimas alterações, elevando-se, mas não ao ponto de diferir significativamente dos demais tratamentos controles em meios HS, NS e LS.

A auxina é um dos mais versáteis hormônios vegetais, tendo também papel de destaque em quase todos os aspectos do crescimento e do desenvolvimento de plantas. Na figura 15 os teores de auxina em folhas e raízes de *E. crassipes* estão demonstrados.

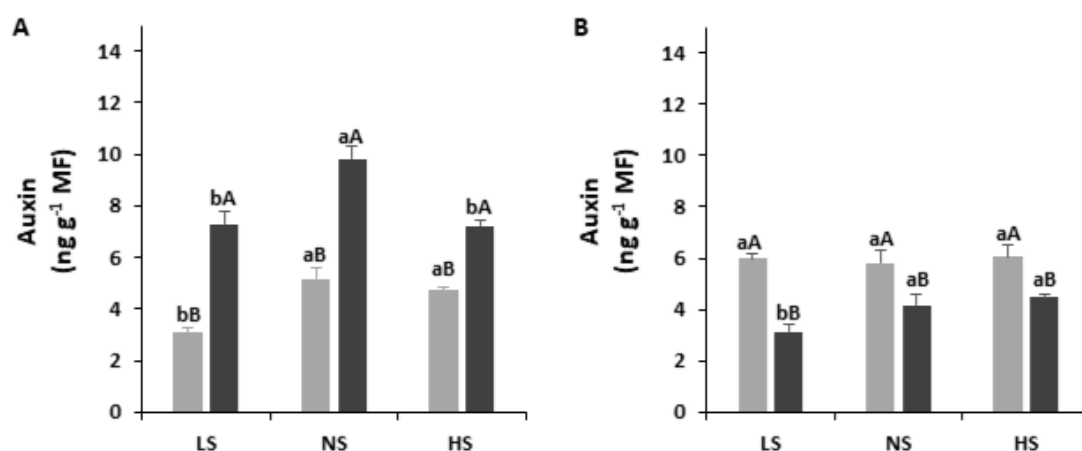


Figura 15 - Teores de Auxinas (AUX) em folhas (A) e raízes (B) de *Eichhornia crassipes*. Legenda- (LS) baixo enxofre ; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

Em folhas de *E. crassipes* (Figura 15A), na ausência do metal, os níveis de AUX em meio LS, foram inferiores aos demais tratamentos. Quando presente, arsenato induziu a um aumento nos teores de auxinas, especialmente no meio NS+As. Em raízes,

os teores de auxinas foram superiores aos encontrados em folhas na ausência do metal (Figura 15B). No entanto, ao contrário do que ocorrera em folhas, arsenato reduziu os teores de auxinas em raízes, sendo a queda mais acentuada em meio LS+As.

Assim como auxinas são importantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal, as citocininas também o são, além de participar de respostas a adaptação das plantas às condições de estresse, como alterações no crescimento vegetal. Na figura 16, os teores de citocininas” tipo tZ “ em *Eichhornia crassipes* encontram-se representados.

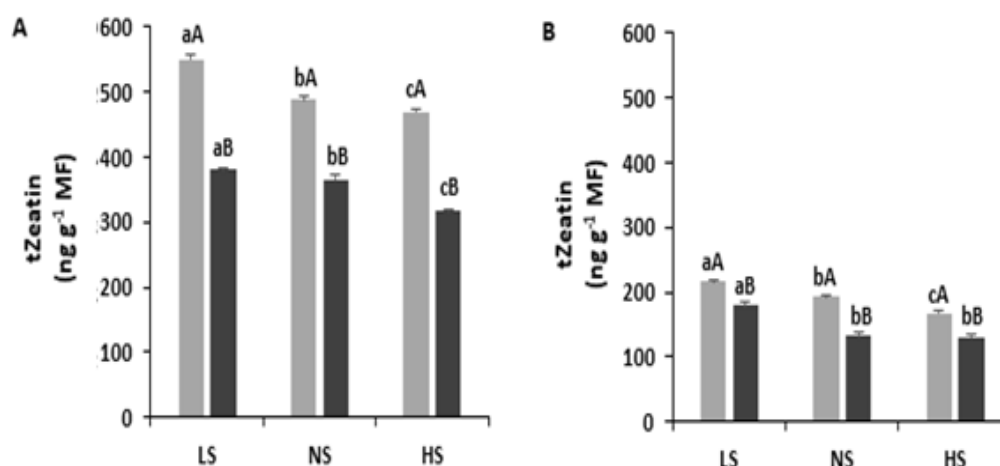


Figura 16 - Teores de Trans-Zeatina (tZ) em folhas (A) e raízes (B) de *Eichhornia crassipes*. Legenda- (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey

Folhas de *E. crassipes* (Figura 16A) apresentaram teores elevados de citocininas em suas folhas, sendo que, plantas cultivadas em meio LS apresentaram os maiores teores (LS>NS=HS) em condições de ausência do metal. Quando presente, arsênio reduziu os teores de citocininas em folhas, sendo os níveis mais baixos encontrados em HS+As. Nas raízes os teores de citocininas foram bem inferiores aos encontrados em folhas (Figura 16B), especialmente em NS+As e HS+As.

Não menos importante, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) é um aminoácido não proteico e é o precursor direto do etileno, sabidamente um hormônio que controla vários processos ligados ao crescimento vegetativo das plantas, germinação de sementes, amadurecimento de frutos, senescência de folhas e flor e

abscisão. A presença de As(V) aumentou os teores de ACC nas folhas obtidas nos meios LS+As e NS+As (Figura 17A). No entanto em folhas em meio HS+As, os teores de ACC permaneceram inferiores ao seu controle. No caso de raízes, os teores de ACC foram elevados naquelas crescidas em meio LS+As e NS+As

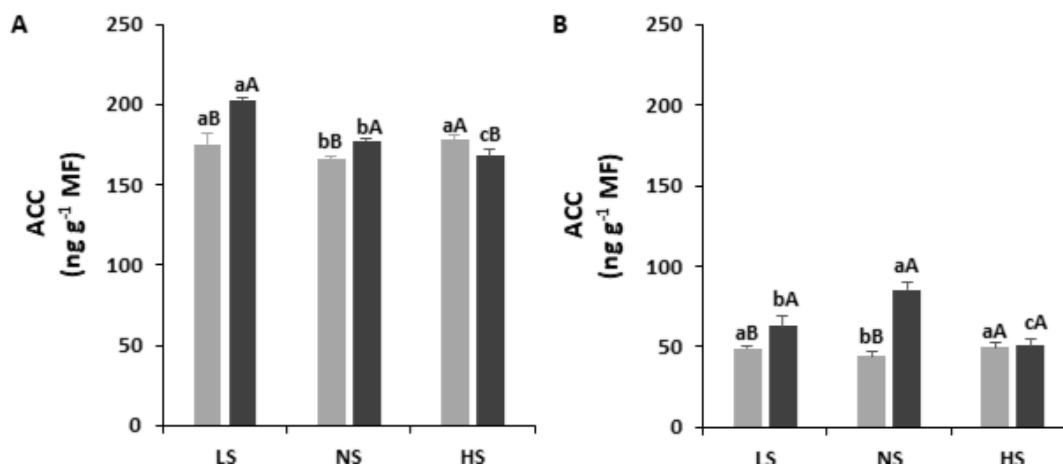


Figura 17 - Teores de 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) em folhas (A) e raízes (B) de *Eichhornia crassipes*. Legenda- (LS) baixo enxofre; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0 μM (Cinza claro) ou As(V): 8 μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey.

3.10- Arsênio afeta drasticamente a parte aérea de *E. crassipes*, levando a necrose e senescência foliar

A Figura 18 apresenta o fenótipo das folhas de *E. crassipes* submetidas aos diferentes tratamentos de enxofre e ao arsênio.

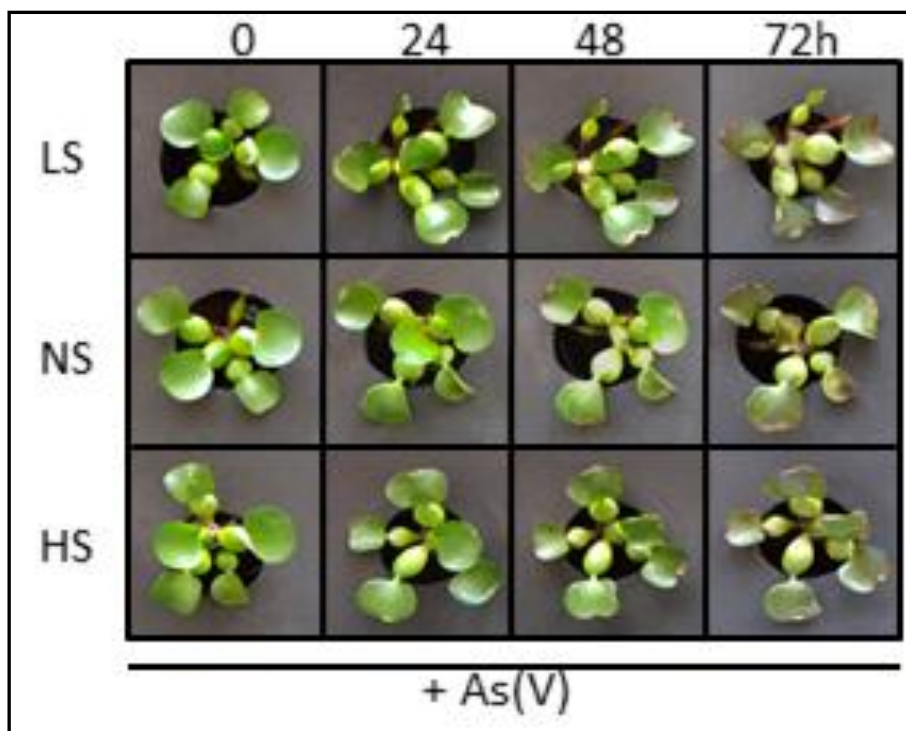


Figura 18 – Fenótipo de *Eichhornia crassipes* submetidas ao estresse por arsenato em diferentes tratamentos contendo enxofre ao longo de 72hs. Legenda: - CTR – Controle; (LS) baixo teor de enxofre; (NS) teor normal de enxofre; (HS) alto teor de enxofre. – contendo As (V): 8 μ M.

Nela podemos observar que com 24 horas começam a surgir os primeiros efeitos fitotóxicos de As(V), destacadamente com clorose no ápice foliar. Plantas de *E. crassipes* em meio LS+As começam a apresentar sinais de murcha nas bordas marginais das folhas já com 24h após a exposição, que aumentam consideravelmente após 48h, com sinais de necrose bastante. Isto evolui para necrose e morte celular. Notadamente, plantas cultivadas em meio HS+As não mostram sinais avançados de murcha, começando a apresentar sinais mais evidentes de toxicidade mais tardiamente, com indícios de necrose foliar após 48h. de exposição ao metal. Ao final de 72h, plantas em meio LS+As apresentam-se com folhas amplamente necrosadas, de maneira mais acentuada. Ao contrário, folhas em meio HS+AS, mostram-se danificadas, contudo em proporções menores.

4-Discussão

Embora a presença de metais pesados no ambiente seja, em sua ampla maioria, prejudicial às plantas, o enxofre é um macronutriente essencial, não somente para o mecanismo de desintoxicação, como para o crescimento e desenvolvimento vegetal. De acordo com Bielecka *et al* (2015), durante as últimas décadas pesquisas em torno de diferentes aspectos sobre o metabolismo do enxofre tem ganhado mais espaço, haja vista que a deficiência de enxofre tenha se tornado um problema crescente em culturas, especialmente na Europa Ocidental.

Recentemente, Srivatava *et al* (2015) relacionou um total de 1.285 genes alterados após a exposição de As (V) em *Brassica juncea*. Os genes diferencialmente expressos, além de estarem relacionados com o metabolismo do enxofre, foram classificados em várias vias de sinalização, incluindo hormônios (jasmonato, ácido abscísico, auxinas e etileno) e alterações em genes relacionados ao metabolismo de lipídios e fotossíntese, dentre outros. Nossos resultados comprovam que essas principais alterações foram também observadas em folhas e raízes de *Eichhornia crassipes* submetidas ao estresse por arsenato.

4.1- Reabastecimento de enxofre após fome induzida ativa a via de assimilação de enxofre, permitindo uma maior acumulação de enxofre e arsênio.

Pesquisas envolvendo o papel do enxofre sobre a tolerância e acumulação de metais pesados tem também ganhado espaço, contudo os resultados têm ainda se mostrado complexos. Nossos resultados demonstram que plantas pré-tratadas com deficiência de enxofre e reabastecidas com alta disponibilidade acumularam altos teores de arsênio, especialmente em folhas (Figura S1.1). Neste sentido, Srivastava & D'Souza (2009) identificaram que a maior oferta de enxofre em *Hydrilla verticillata* aumentava a tolerância e acumulação de arsênio. Da mesma forma, Zhang *et al* (2011) relataram que plantas pré-tratadas com baixa disponibilidade de enxofre, acumulavam mais arsênio em folhas de arroz do que aquelas pré-tratadas com alta disponibilidade de enxofre.

Em contrapartida, Fan *et al* (2013) identificaram que a oferta em excesso de enxofre reduz a acumulação de arsênio em arroz integral. Logo em seguida, Leão *et al* (2014) ao avaliarem o efeito do metabolismo do enxofre sobre a tolerância ao arsênio em duas macrófitas aquáticas, *Lemna gibba* e *Salvinia mínima*, identificaram que *L. gibba* mesmo acumulando cerca de 20% a mais de arsênio, sentiu menos os efeitos tóxicos do metal. Eles atribuíram isso a presença de um sistema de defesa mais eficiente, baseada na maior absorção, assimilação e metabolismo do enxofre. Novamente, Dixit *et al* (2015) concluíram que o enxofre alivia a toxidez do arsênio, reduzindo a acumulação do metal, modulando o proteoma, o metabolismo de tióis e de aminoácidos em folhas de arroz.

Partindo da premissa de que a assimilação de sulfato é altamente regulada de acordo com a demanda (Kopriva *et al* 2015; Takahashi *et al* 2011), podendo ser induzida quando há uma alta demanda de crescimento e desenvolvimento ou por estresses nutricionais de enxofre e nitrogênio, principalmente, que modulam também a absorção de enxofre (Saito 2004), o pré-tratamento em condições de baixa disponibilidade de enxofre parece ter estimulado a absorção e transporte de sulfato para a parte aérea de *E. crassipes* nas primeiras 24h após o reabastecimento e aplicação do arsênio (Figura 1A e 1B). Após 72 os teores de enxofre foram reduzidos na presença do metal, especialmente em folhas, tendo em meio LS+As, sua queda mais acentuada. (Figura S1.1A e S1.1B). De acordo com Saito (2004), a remobilização de enxofre em plantas é menos eficiente do que o nitrogênio, o que segundo Hawkesford (2000) pode levar a sinais de clorose nas plantas. A presença de clorose foi um dos primeiros sinais da toxicidade do arsênio em folhas, evoluindo para necrose especialmente em folhas

LS+As (Figura 18) onde os teores de enxofre foram menores.

Vestena *et al* (2009), ao avaliar os efeitos da oferta de sulfato sob absorção de cádmio em *Salvinia auriculata* e *E. crassipes*, sendo que as plantas de aguapé foram obtidas no mesmo ambiente de coleta deste presente estudo, observaram que o aumento na concentração de enxofre de 400 μM para 800 μM não resultou em aumento adicional nos acúmulos de enxofre ou de cádmio. Nossos resultados ao contrário, não só indicaram que o aumento na concentração de enxofre disponível (2,5 μM \rightarrow 200 μM e 600 μM) após o reabastecimento, permitiu um maior acúmulo de arsênio em plantas cultivadas nos meios NS+As e HS+As, como demonstram que a aclimação em solução nutritiva com baixa disponibilidade de enxofre ativou a via de absorção e assimilação de enxofre (Figuras 1 e Suplementar S1). Entretanto, um fator a ser considerado é que Liu *et al* (2009) isolaram um gene de tolerância a deficiência de enxofre em *E. crassipes* e sua overexpressão em *Arabidopsis thaliana* demonstrou um fenótipo tolerante a deficiência de enxofre, notadamente ao promover o crescimento de raízes. Isto poderia ser uma resposta ao maior crescimento de raízes em meio LS+As. Plantas cultivadas sobre baixa disponibilidade de enxofre, acumularam menores teores de metal, o que poderia também ser associado ao menor decréscimo em sua TCR.

4.2- Citocininas são essenciais para a acumulação de enxofre e fitorremediação do metal

Recentemente, Mohan *et al* (2016) descobriram que os mutantes de sinalização CK (citocininas) e plantas transgênicas com níveis de CK endógenos reduzidos, especialmente tZeatin, apresentavam um fenótipo tolerante ao arsenato. Nossos resultados demonstram uma redução considerável nos níveis de tZeatin na presença do metal em folhas. Após 24h de aplicação do stress os níveis endógenos de citocininas nas raízes foram reduzidos abruptamente em meio HS+As e mais sutilmente em meio LS+As, sendo elevado em meio NS+As (Figura 16B).

Isto nos remete a sugerir que uma relevância biológica a se considerar seria o fato de tZeatin atuar negativamente sobre o crescimento de raízes NS+As em resposta ao metal durante as primeiras 24 horas do stress. Kiba *et al* (2013) apontam o gene CYP735A, como responsável pela biossíntese de citocininas tipo tZ em raízes e poderia ser esse um alvo potencial para o arsênio. Essa provável relevância biológica foi mencionada por Mohan e colaboradores ao descobrirem que mutantes CK (níveis

baixos de citocininas) mostravam uma parada no crescimento menor em todas as linhas mutantes e transgênicas. De fato, nossos dados também mostram que raízes em meio NS+As tiveram uma maior redução no crescimento de raízes (Figura 2B).

Wani *et al* (2016) recentemente enfatizaram que ABA e citocininas tem papel antagonista conforme afirmara Pospíšilová (2003) sendo que a redução nos níveis endógenos de citocininas em folhas serviriam para aumentar a dominância apical e o aumento nos níveis de ABA regularia a abertura estomática em condições de déficit hídrico. Em folhas de *E. crassipes* os níveis endógenos de citocininas foram reduzidos e os de ABA aumentado na presença do metal, tendo em vista que a murcha também é um sintoma da toxidez do metal em folhas, conforme observado (Figuras 16A e 18A).

É necessário ressaltar que arsenato possuía afinidade química com proteínas transportadoras de fosfato e que o enxofre é absorvido pelos vegetais na forma de sulfato (SO_4^{2-}) e distribuído por todo o tecido vegetal por uma intrincada rede de transportadores que pertencem a uma família de proteínas de membrana que diferem em localização e afinidade pelo sulfato (Takahashi *et al* 2011). Isto se faz necessário pois citocininas são conhecidas por serem reguladoras negativas de transportadores de sulfato e fosfato de alta afinidade (AtSulTR1;1 e AtSulTR1;2; PHT1; 2 e PHT1; 4) (Brenner *et al* 2012; Takahashi *et al* 2000; Shibagaki *et al* 2002; Yoshimoto *et al* 2002).

Outros dois papéis biológicos relevantes desempenhado pela redução nos níveis endógenos de citocininas em raízes, conforme observado após 72h (Figura Suplementar S6.1) poderiam ser: primeiro na down regulação em transportadores de fosfato homólogos a PHT1;2 e PHT1;4 de *Eichhornia*, auxiliando na redução da captação de arsênio por intermédio da repressão desses transportadores conforme Brenner *et al* (2012), especialmente sob baixa disponibilidade de enxofre (LS+As), o que ajudaria a explicar a baixa acumulação de arsênio. Diante do controle repressor sobre esses transportadores, limitando a absorção de fosfato, isso poderia trazer danos ao crescimento vegetal. A figura Suplementar S7.1 nos mostra que de fato os teores de fósforo caem abruptamente na parte aérea após 72h, podendo ser um forte indício de que isto seja um reflexo desta repressão em raízes, levando em conta ainda a maior queda em LS+As.

Segundo papel biológico poderia ser o de auxiliar na captação de enxofre em condições de stress, pela redução dos níveis endógenos de citocininas, diminuindo a repressão sobre SulTR1;2 e SulTR1;1, conforme (Maruyama-Nakashita *et al* 2003). Quando se observa os níveis de enxofre em raízes e de citocininas após 72h nota-se que

que há de fato uma correlação entre os níveis reduzidos na presença do metal e os maiores teores de enxofre observados em raízes nesses mesmos tratamentos (Figuras Suplementares S1.1 e S6.1). Entretanto, a disponibilidade de tióis em plantas em meio LS+As pode ter a outra parte da explicação nessa baixa acumulação do metal. Ressalta-se ainda, que o maior acúmulo de enxofre é acompanhado pelo maior acúmulo de arsênio.

Cabe ainda ressaltar que Zwack *et al* (2016) descrevem que fatores de transcrição em resposta a citocininas (CRFs) podem ser induzidos independente de citocininas, mas em resposta ao estresse oxidativo, regulando a expressão de genes envolvidos em vários aspectos da função biológica (biossíntese, transporte e sinalização de citocininas), possivelmente permitindo melhorar a resposta ao estresse. Portanto, a manipulação do status de citocininas pode ser uma abordagem viável para a engenharia genética de plantas em programas de fitorremediação com macrófitas aquáticas, assim com compreender melhor os mecanismos de defesa e tolerância a metais.

4.3- Auxinas participam da sinalização do estresse e na regulação do crescimento

Diversos trabalhos vêm demonstrando que os metais pesados reduzem o acúmulo de biomassa como resultado de efeitos adversos sobre os principais processos metabólicos (Elobeid & Polle 2011; Ghavri & Singh 2012; Zhao *et al* 2012; Beyer *et al* 2013; Krishnamurthy & Rathinasabapathi 2013; Bucker-Neto *et al* 2017). Auxinas são importantes fitormônios envolvidos na coordenação do crescimento e defesa da planta. Metais pesados induzem a produção de ROS e conseqüentemente ativam oxidases de auxinas (Elobeid & Polle 2011). Raízes de *Eichhornia* podem ter iniciado essa via de degradação, especialmente em meio LS+As, podendo inclusive ser um indicativo indireto da maior taxa de produção de ROS nesse meio. Ao contrário, folhas acumulam auxinas durante o stress podendo ser este resultado tomado como mais um biomarcador do stress em plantas de aguapé expostas ao arsenato. Srivastava *et al* (2013) mostraram que o arsênio é capaz de alterar os níveis de auxinas em *Brassica juncea.*, aumentando os teores de IAA em folhas e reduzindo em raízes e sugeriram que apesar das plantas de *Brassica* perceberem o estresse do arsênio através da percepção indireta do estresse sobre o metabolismo de S, a possibilidade de detecção direta do stress por arsênio não poderia ser descartada.

Um modelo para tentar explicar a função da proteína AUX1 (proteína de transporte de auxinas) na tolerância ao arsenito foi elaborado por Krishnamurthy &

Rathinasabapathi (2013). Para eles, AUX1 poderia ser diretamente envolvido na indução da sinalização ROS através de via mediada por H₂O₂, o que poderia evitar o aumento adicional do dano oxidativo ou influenciar indiretamente o alongamento celular e a divisão celular, regulando os níveis de auxina e a rede de sinalização de auxina, controlando o crescimento da raiz sob o estresse. Mutantes *aux1* apresentaram menores taxas de crescimento de raiz primária, e aumento na taxa de crescimento de raízes laterais (Krishnamurthy & Rathinasabapathi 2013). A baixa disponibilidade de enxofre em meio LS+As, não resultou numa redução do dano oxidativo, mas permitiu uma redução menor na TCR do que raízes em meio NS+As. Isto coincide com os menores níveis de auxinas em raízes LS+AS, o que pode ter impedido reduções mais drásticas na TCR de raízes (Figuras 2B e 15B).

Para Wang *et al* (2015) um papel importante foi creditado à proteína PINFORMED1 (PIN1), um transportador de efluxo de auxina para o crescimento e manutenção do meristema de raiz em condições normais. Segundo eles, PIN1 está envolvido na distribuição de hormônio sob condições de estresse de metais pesados. Notadamente em *Brassica juncea* estressadas por arsênio, Srivastava *et al* (2015) encontraram genes de duas proteínas de efluxo de auxina (PIN3 e PIN6) down regulados em folhas. A regulação negativa de PIN6 parece estar relacionada à inibição do crescimento da raiz primária e desenvolvimento de raízes laterais, crescimento de pêlos radiculares, formação de raízes adventícias e dominância apical (Cazzonelli *et al* 2013). Pode-se inferir que a presença de arsenato tenha afetado proteínas de efluxo em *E. crassipes*, trazendo redução nos níveis de auxinas em raízes, tendo consequências sobre o crescimento.

Ao avaliarem o impacto dos estresses de diferentes metais pesados na homeostase de auxinas e sobre o crescimento de mudas de *Arabidopsis*, Wang *et al* (2015) relataram vários defeitos morfológicos, incluindo além das mudanças no comprimento e densidade de raízes, a perda de peso fresco e área foliar. A presença de arsênio afetou a TCR em folhas de *E. crassipes*, especialmente em meio NS+As aonde foram encontrados os maiores teores de auxinas. Segundo Wang e colaboradores, a acumulação de auxinas e a sua distribuição, dinamicamente e diferencialmente poderiam atuar na regulação na transcrição de genes relacionados a auxinas para melhorar a adaptação e sobrevivência.

Srivastava *et al* (2013) sugeriram que micro-RNAs (miR167, o miR164, o miR390) estão envolvidos com ARFs que afetam o crescimento da raízes de *Brassica*

juncea sob o estresse por arsênio, tendo sido observado que o miR167 foi down regulado em raízes e up regulado em folhas. Apesar de ainda não identificados em *Eichhornia crassipes*, pelos níveis diferenciados de auxinas orientando as modificações na fisiologia das plantas, pode-se acreditar que tais mecanismos reguladores possam estar atuantes também aqui. Ressalta-se que Huang *et al* (2010) já haviam demonstrado também que o miR167 responde à deficiência de enxofre e ao estresse por cádmio, enquanto que Tabata *et al* (2010) relataram ainda que o miR167 poderia regular a biossíntese de jasmonato, sugerindo também uma interação complexa entre jasmonatos e auxinas na regulação do crescimento e na sinalização sob o estresse por arsênio.

4.4- A biossíntese de ABA é essencial na percepção do estresse e ajuda a compreender os efeitos sobre o metabolismo central, a acumulação de arsênio e o crescimento de *E. crassipes*.

Folhas de *E. crassipes* estressadas por arsenato elevaram seus níveis de ABA, reduziram sua taxa de assimilação líquida de carbono, reduziram os teores de clorofilas e carotenoides assim como a eficiência de operação do fotossistema II, reduzindo ainda a taxa transpiratória após três dias de estresse e aumentando a taxa respiratória (Figuras). Entretanto, esses resultados se mostram distintos daqueles observados a longo prazo em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas por 20 dias ao estresse por arsenato, sem uma pré-aclimatação, onde Pereira *et al* (2011) relatam que as plantas demonstraram um aumento na taxa fotossintética, na condutância estomática, na transpiração e na relação Ci/Ca. Por outro lado, essas reduções foram via de regra, mais atenuadas na maior oferta de enxofre após três dias de estresse, o que demonstra uma maior proteção ao aparato fotossintético.

Meneguelli-Souza *et al* (2016) ao estudarem respostas ecofisiológicas de *Eichhornia crassipes* sob diferentes condições de estresse por arsenato também observaram resultados similares aos mostrados aqui, em concentrações mais altas do metal (2.0 mg L⁻¹ e 20.0 mg L⁻¹). No entanto, a redução na condutância estomática e o aumento na concentração interna de carbono na presença do metal especialmente nos meios LS+As e NS+As (Figuras 6C e Figura Suplementar) indica que a fixação de CO₂ já foi comprometida tanto em níveis ecofisiológicos quanto em nível bioquímico (Gusman *et al.* 2013; Farnese *et al* 2017) após as 24h iniciais de estresse.

Outro componente nessa história é que após a redução da condutância estomática, os valores da taxa transpiratória, que num primeiro momento se mantiveram elevadas e fundamental para a rápida translocação do metal para a parte aérea, foram

reduzidas após 72h, o que pode ter contribuído também para o aumento nos teores de arsênio em raízes. A sustentação de uma taxa transpiratória alta nesse primeiro momento poderia contribuir também para uma maior absorção de nutrientes numa condição de estresse (Pereira *et al* 2010). Meneguelli-Souza *et al* (2016) apontam que o efeito direto de arsênio em gs pode ser devido à interrupção da captação de água e transporte que resulta de mudanças nas raízes durante a absorção do metal. Entretanto, num primeiro momento não se observou uma queda no mecanismo transpiratório de *Eichhornia*, o que colaboraria com a questão levantada sobre gs. Pereira *et al* (2011) ao avaliar mudanças na anatomia de *E. crassipes* submetidas ao estresse por arsenato, relata que uma resposta imediata em folhas de plantas sob as maiores concentrações de arsênio foi o aumento na densidade estomática, no índice estomático e na espessura do parênquima esponjoso, podendo inclusive estar relacionado a ação de citocininas e auxinas, conforme demonstram nossos resultados.

A elevação dos níveis de ABA está relacionada, direta ou indiretamente com muitas destas alterações, especialmente com a translocação de metal e redução de gs ao induzir o fechamento estomático na presença do metal (Figura 14). Bucker-Neto *et al* (2017) destacam que o fechamento estomático induzido por ABA possa provocar a supressão do fluxo transpiracional, resultando na restrição da translocação de metais de raízes para parte aérea. No entanto, outros fatores são importantes neste transporte de metais, como a presença de tióis.

Níveis mais altos de ABA em folhas coincidem com maiores temperaturas foliares em função do fechamento estomático. A maior elevação dos níveis de ABA, ao promover o fechamento estomático, promoveu a elevação de temperatura foliar em folhas NS+AS e HS+As após 24h, tendo em vista também uma maior quantidade de arsênio acumulado do que a encontrada em meio LS+AS, ao mesmo tempo que demonstra uma maior tolerância de HS+As, ao acumular mais arsênio. A elevação de temperatura foi contornada em NS+AS após 72h de exposição, permanecendo em HS+As. Plantas em meio HS+As, apesar de reduzir suas taxas transpiratórias, conseguem mantê-las mais elevadas do que nos demais tratamentos (Figura Suplementar S2.3 S2.4). Pitta-Barbosa *et al* (2015) detectaram recentemente um aumento de temperatura foliar após a exposição ao arsênio em plântulas de *Cajanus cajan* (L.) e, assim como Oerke *et al* (2006), creditaram ao fechamento estomático o aumento da temperatura superficial das plantas em função da queda das taxas transpiratórias.

Uma das características marcantes no estresse por arsenato é a murcha marginal de folhas, especialmente em meio LS+As (Figura 18), onde foram observados os menores teores de ABA. De acordo com Bücken-Neto *et al* (2017) o ABA é normalmente considerado um composto de sinalização e comentam que está bem estabelecido que a exposição a concentrações tóxicas de metais prejudica o equilíbrio hídrico da planta, conforme Mukhopadhyay & Mondal (2015). Portanto, o ABA, neste contexto, desempenharia um papel importante na proteção contra o estresse por arsenato.

Na verdade, ABA é comumente conhecido como "hormônio do estresse" que responde à uma grande variedade de estresses ambientais, incluindo diferentes estresses abióticos (Zhang 2014) como o estresse promovido pelo arsênio. Os níveis de ABA foram aumentados tanto em folhas quanto em raízes de *E. crassipes* sugerindo também um envolvimento desta fitohormônio na indução de mecanismos de proteção contra toxicidade do metal. O microRNA 159 up regulado em folhas e raízes de Brassica na presença de arsênio, o que de acordo com Srivastava *et al* (2013) indicaria um papel importante para o ABA também na percepção e sinalização do estresse. É necessário ressaltar ainda que o microRNA 159 atua também na biossíntese de etileno e na sinalização de giberilinas (Achard *et al* 2004), tendo sido GA3 up regulado na presença de arsenato em folhas de *E. crassipes* (Nascimento *et al* 2017).

Um outro dado relevante seria que folhas de *E. crassipes* reduziram os teores de pigmentos após o estresse pelo metal tendo um menor impacto sobre plantas em meio HS+AS. De acordo com Srivastava *et al* (2013), essa redução de pigmentos seria uma resposta comumente observada na presença de arsênio, já registrada também em macrófitas aquáticas estressadas por arsênio como: *Salvinia minima*, *Lemna gibba*, *Pistia stratioides* e *Eichhornia crassipes* (Farnese *et al* 2017; Meneguelli-Souza *et al* (2016); Farnese *et al* 2014; Leão *et al* 2014). A redução no teor de clorofilas poderia ocorrer em função de fatores como a peroxidação lipídica conforme relatado por Farnese *et al* (2017) e poderia ser também responsável pela queda na eficiência de operação do fotossistema II de *E. crassipes*. A forte redução observada da fotossíntese pode também ser correlacionada com um declínio substancial das proteínas de ligação Rubisco e clorofila a / b (Giordano *et al* 2000), tendo em vista inclusive que Rubisco além de ser alvo do metal, é um importante reservatório de enxofre em plantas. Desta forma, a maior disponibilidade de enxofre no meio parece ter amenizado a degradação de clorofilas ou uma inibição maior em sua biossíntese.

Carotenóides tem um papel essencial na proteção contra o dano fotoxidativo e podem ainda servir na via de biossíntese de ABA (Vishwakarma *et al* 2017), favorecendo a via de xantofilas. Plantas de *E. crassipes* em meio HS+As tiveram uma redução menor e mantiveram maiores teores de carotenoides, acompanhado de uma maior taxa fotossintética. Mishra *et al* (2014) ao descrever uma sequência de eventos que leva a danos induzidos pelo arsênio na macrófita aquática *Ceratophyllum demersum* L. relatam que a violaxantina atua como pigmento da antena enquanto antheraxantina e pigmentos tipo b-caroteno desempenham um papel protetor através da extinção não fotoquímica do excesso de energia, o que é particularmente importante nas condições de estresse.

Em função do arsenato ter induzido a redução de pigmentos, a elevação dos níveis de ABA e a redução na condutância estomática, à taxa de assimilação líquida de carbono foi reduzida e acompanhada também pela redução nos teores de amido e sacarose. Plantas em meio LS+AS tiveram uma redução menor em seus teores, possivelmente numa tentativa de compensar maiores taxas respiratórias, buscando produzir energia e metabólitos para mecanismos de defesa (Bolton 2009 in Farnese *et al* 2017) ou apenas uma resposta em função do menor teor de arsênio acumulado. Mishra *et al* (2014) comentam que inicialmente as plantas tentaram se defender contra toxicidade por algum mecanismo, como o aumento da síntese de aminoácidos relacionados à desintoxicação e outros metabólitos como compostos fenólicos em *E. crassipes* (Nascimento *et al* 2017) e induzindo processos catabólicos como a respiração e consumo do amido.

Ao constatar um aumento nas taxas respiratórias de *E. crassipes* após a exposição ao metal, é salutar imaginar que poderia ser uma tentativa de fornecer ATP para síntese de sacarose ou uma válvula na tentativa de regular o balanço redox, conforme sugerido por Farnese *et al* (2017). Ou ainda conforme Wang *et al* (2010) haviam sugerido, sendo esse aumento na respiração seguido de um aumento simultâneo na atividade da citocromo c oxidase e da oxidase alternativa, recompondo ATP sem a formação de ROS. Srivastava *et al* (2015) mostraram que genes pertencentes à cadeia de transporte de elétrons mitocondriais apresentaram elevação significativa em raízes e folhas de *Brassica juncea*, incluindo oxidase alternativa, sugerindo seu envolvimento crítico na regulação dos níveis de ROS, no estado redox e de energia sob o estresse por arsênio.

O quadro de alterações apresentados ajuda a compreender que essas alterações

abruptas após 24h iniciais de exposição, assim como a translocação em massa do metal para a parte aérea, especialmente em meios NS+As e HS+As, assim como a disponibilidade de enxofre foram determinantes nessas diferenças no crescimento.

Desta forma, ABA mostra-se como um dos principais hormônios em resposta ao estresse por arsênio em *E. crassipes*, estando relacionado com importantes processos fisiológicos e metabólicos, essenciais para a tentativa de adaptação ao estresse e uma forte molécula sinalizadora, importante na comunicação entre raízes e parte aérea

4.5- Acumulação de Tióis: Defesa, tolerância e sua relação com o controle hormonal em *E. crassipes*.

Alterações na composição de ácidos graxos de membranas celulares em *E. crassipes* são indicativo de que ocorrem mudanças na permeabilidade de membranas celulares (Nascimento *et al* 2017), o que pode ser comprovado pelos teores de MDA aumentados na presença do metal, tanto em folhas quanto em raízes, haja vista a ocorrência de peroxidação lipídica (Figuras 4 e S1.2). Essas alterações parecem se agravar com o tempo e maior acúmulo de arsênio, sendo mais intensas em folhas e raízes cultivadas em meio LS+AS. Por outro lado, a maior disponibilidade de enxofre parece ter atuado na ativação de mecanismos que aumentaram a tolerância a fitotoxicidade do metal. Jasmonatos são derivados do metabolismo de ácidos graxos.

Conforme já comentado anteriormente, Srivastava *et al* (2009) relataram que o estresse por arsênio poderia ser percebido através da detecção indireta do estresse sobre o metabolismo do enxofre, ativando vias metabólicas comuns. Tempos depois, Srivastava *et al* (2013) propuseram que jasmonatos seriam responsáveis pela percepção do estresse ocasionado por arsênio com conseqüente estimulação do metabolismo do enxofre em *Brassica juncea*. Ao quantificar os teores de ácido jasmônico em folhas de *E. crassipes* e comparar com seus respectivos controles, constatamos um aumento significativo em seus teores, sendo maiores quanto menor a disponibilidade de enxofre (311% em LS+AS, 221% em NS+AS e 214% em HS+As) (Figura 12A). Níveis elevados de ácido jasmônico e salicílico foram relatados em várias espécies de plantas estressadas por cádmio (Chmielowska-Bąk *et al* 2014), incluindo ervilhas, feijão e *Arabidopsis thaliana*. Contudo, apenas raízes LS+As o arsenato foi capaz de elevar os teores de ácido jasmônico, porém numa taxa bem inferior, podendo ser um indício de que a baixa disponibilidade de enxofre no meio tenha induzido genes da via de biossíntese de ácido jasmônico. Novamente, Srivastava *et al* (2015), ao investigarem o

transcriptoma de *Brassica juncea* estressadas por arsênio, encontraram que arsenato estimularia a expressão de genes da biossíntese de jasmonatos OPR1, OPR2 e OPR3 em folhas e raízes e down regularia genes repressores da sinalização de jasmonatos, JAZ1 e JAZ5 em raízes.

Ao encontro do que Srivastava e seus colaboradores sustentavam, Iqbal *et al* (2013) descreveram que a retirada do sulfato do meio de crescimento diminui os níveis de sulfato, Cys e GSH nos tecidos das plantas, levando à indução de sistemas de transporte de sulfato e enzimas chave ao longo da via assimilatória. Cys é o primeiro composto orgânico contendo enxofre reduzido sintetizado pela planta (Takahashi *et al* 2011). Outra característica igualmente importante da cisteína é ser precursora de inúmeros metabolitos contendo enxofre que são necessários para o desenvolvimento como metionina, vitaminas, cofatores e Clusters de Fe-S (Romero *et al* 2014). Folhas e raízes que foram reabastecidas com maior disponibilidade de enxofre (Ns+As e HS+As), após a fome induzida mostraram-se com maiores teores de cisteínas (Figura 8). No entanto, ao contrário do que afirmara Iqbal *et al* (2013), os teores de cisteínas foram maiores em folhas crescendo em meio com baixa disponibilidade de enxofre do que em meio NS e/ou NS+As. Em raízes crescendo sob baixa disponibilidade de enxofre, com o maior acúmulo de arsênio, aumentaram seus teores de cisteínas. Watanabe *et al* (2014) relata que a síntese de tióis de baixo peso molecular foi estimulada pela presença de arsênio na hiperacumuladora *Pteris vitatta*.

Logo, parece que outros mecanismos regulatórios estejam atuando, não somente aqueles já discutidos sobre a absorção de enxofre, mas também sobre o seu metabolismo. Novas evidências vêm demonstrando que ácido jasmônico é capaz de induzir genes que codificam enzimas de síntese de glutathione e glutathione redutase (GR) e que os mutantes *gr1* (com capacidade de GR na folha diminuída) mostram repressão da via de ácido jasmônico, tanto em nível basal como num contexto de estresse oxidativo (Xiang & Oliver 1998; Mhamdi *et al* 2010; Han *et al* 2013).

A presença de arsenato na solução nutritiva estimulou a via de assimilação do sulfato elevando o pool de cisteínas em meios com maior disponibilidade de enxofre em folhas e raízes de *E. crassipes* num primeiro momento, quando foi translocado em massa para a parte aérea. Normalmente, as células não estressadas contêm baixas concentrações de Cys livres, sendo que na maioria dos estudos, o aumento no pool de cisteínas em condições de stress abiótico ocorre em conjunto com o aumento das concentrações de GSH, levando à conclusão de que o Cys é principalmente necessário

para a biossíntese de compostos ricos em enxofre com atividade anti-stress (Zagorchev *et al* 2013). Inclusive, Watanabe *et al* (2014) comentam que *Pteris vitatta* crescendo sob baixa disponibilidade de enxofre aumentam a absorção de sulfato para a síntese de tióis na parte aérea.

Mohan *et al* (2016) afirmam que a depleção nos teores de citocininas, conforme observado em folhas e raízes de *E. crassipes* (Figura 16), são capazes de provocar a ativação coordenada dos mecanismos de tolerância ao arsenato levando ao acúmulo de tióis, como fitoquelatinas e GSH, que são essenciais para o seqüestro de arsênio. Cheng *et al* (2015) revela ainda que os resultados da análise do transcriptoma após o aumento dos níveis endógenos de GSH foi capaz de ativar genes da biossíntese e de sinalização do ácido jasmônico. No entanto, de acordo com Zagorchev *et al* (2013), os fatores mais importantes que afetam a taxa de síntese de GSH são a disponibilidade de enxofre e a atividade de GSH1 (γ -glutamylcisteíναςintetase). Folhas e raízes de *E. crassipes* parecem ter de fato correlação com esta limitada disponibilidade de enxofre, mantendo-se com níveis de GSH inferiores aos demais tratamentos (Figura 11). Em raízes, os altos níveis de GSH em NS+As parecem estar mais correlacionados com o teor de arsênio acumulado, que possivelmente possa ter induzido estes maiores teores.

GSH é sintetizado em duas etapas, sendo que na primeira, γ -glutamil-cisteína é formada numa reação dependente de ATP, catalisada pela GSH1, que é um passo limitante na via (Noctor *et al* 2012; Zagorchev *et al* 2013). A presença de arsenato elevou os teores de γ -glutamilcisteína em folhas e raízes, especialmente em folhas (Figura 9) em função da maior oferta de enxofre após 24h de stress. Após 72h esses teores foram ainda maiores, no entanto, conforme mencionado, os teores de GSH foram reduzidos em relação às 24h iniciais.

Em plantas e animais, a regulação pós-traducional de γ GC é realizada pela inibição do seu produto final, ou seja, um feedback com GSH (Jaz *et al* 2004). Após 72h, o acúmulo maior de arsênio nas raízes está ligado diretamente ao aumento no conteúdo de GSH, que pode ter ampliado a capacidade de imobilização do metal em raízes, o que potencialmente envolve fitoquelatinas (Figura S1.1). Um outro dado relevante é de que após o aumento nos teores de GSH, conforme relatos para a amioria das plantas, arsênio possa ter ficado complexado com GSH e/ou fitoquelatinas e armazenado em vacúolos. (Zhao *et al* 2009; Song *et al* 2010; Moore *et al* 2011). Uma outra possibilidade para ajudar na compreensão de como *E. crassipes* possa ter reduzido a translocação para a parte aérea, além dos danos irreversíveis aos tecidos foliares, como

necroses, estaria na atuação de mecanismos de exclusão do metal. Uma arsenato redutase, HAC1 (Chao *et al* 2014) ou ATQ1 (Sánchez-Bermejo *et al* 2014) demonstrou desempenhar um papel crucial no metabolismo de arsênio em *Arabidopsis thaliana* através do efluxo As(III) das raízes, minimizando assim translocação para a parte

Paralelamente, os teores de γ -GC após 72h em folhas manteve-se alto, entretanto o nível de GSH foi diminuído, o que pode ser mais um indício de que a biossíntese de fitoquelatinas é crucial para essa acumulação do metal. A redução nos níveis de γ GC em raízes NS+As e HS+As após 72h pode ser um resultado desse controle pós-traducional, limitando a capacidade de retenção do metal (Figura S4.1).

Vários relatos confirmam o papel de fitoquelatinas na tolerância a metais pesados, incluindo especialmente arsênio e cádmio e eles tem recebido muita atenção nos programas de fitorremediação (Pal & Rai 2010). Wu *et al* (2008) caracterizou em *E. crassipes* estressadas por cádmio um complexo de fitoquelatina (PC3). Os complexos de fitoquelatinas com íons são seqüestrados no vacúolo, melhorando assim os efeitos tóxicos dos metais. Em 2014, foi anotado no GenBank o isolamento de uma fitoquelatina sintetase em *E. crassipes* responsiva a metais pesados (Sadhukhan & Sahoo 2014), dando ainda mais indícios de que este seja um mecanismo atuante e responsável em partes pela eficiência de *E. crassipes* na remoção de diferentes metais.

De acordo com Stroiński *et al* (2010) ABA pode elevar a atividade de fitoquelatina sintetase, mas não requer necessariamente a presença de íons metálicos. No entanto, o acúmulo de fitoquelatinas pode também não ser benéfico, levando a uma depleção de GSH resultando em mais condições oxidativas. Jasmonatos são conhecidos por estimular a atividade de GSH1 em plantas e os genes relacionados ao ácido jasmônico estão correlacionados com o conteúdo de glutathione (Han *et al* 2013).

Os níveis de GR foram aumentados na presença de arsenato em folhas e raízes de *E. crassipes* sendo maiores, quanto maior a oferta de enxofre. Glutathione redutase (GR) opera principalmente nos cloroplastos através de isoformas citossólicas além de isoformas mitocondriais conhecidas em plantas superiores. No entanto, um aumento da atividade de GR sozinho não é suficiente para conferir tolerância ao estresse. Com os níveis de peróxido de hidrogênio aumentando com o passar do tempo, é necessário uma ação coordenada e finamente regulada de todas as enzimas do ciclo ascorbato-glutathione em todos os compartimentos celulares para sustentar a tolerância ao estresse da planta.

Adicionando ainda mais a discussão, os níveis de ácido salicílico também foram elevados na presença do metal em *E. crassipes*, especialmente nos meios com maior

disponibilidade de enxofre, onde os maiores teores de GSH foram observados em raízes, NS+As e HS+As respectivamente. De acordo com Singh *et al* (2015) o ácido salicílico, um composto fenólico, seria também importante molécula sinalizadora e envolvido na resposta ao estresse. Eles descobriram que a aplicação exógena de ácido salicílico em *Oryza sativa* é capaz de melhorar a tolerância ao arsenato, reduzindo a translocação do metal de raízes para parte aérea. Além disso, eles afirmam que SA modula a atividade de enzimas antioxidantes (glutathione transferase, glutathione peroxidase, ascorbate peroxidase) e compostos antioxidantes (glutathione e ascorbate) conforme observado também por Nazar *et al* (2014). No entanto, Saidi *et al* (2017) ao avaliarem o alívio da toxicidade de arsênio em folhas de girassol após a aplicação exógena de ácido salicílico, apesar de observarem melhoras em parâmetros como crescimento e lesões por danos oxidativos, observaram uma redução nos teores de GSH e ascorbate.

Em *Artemisia annua* L. a aplicação exógena de ácido salicílico, acompanhada do aumento dos níveis endógenos foram capazes de induzir uma maior acumulação de metabólitos secundários, reduzir a ação de ROS e melhorar a atividade de enzimas antioxidantes (Kumari *et al* 2017). Desta forma, pode-se inferir que ao se observar os resultados à cerca da peroxidação lipídica (MDA) após esse pico de ácido salicílico, a maior peroxidação em LS+As pode estar também relacionada aos baixos níveis de ácido salicílico, quando comparado aos demais tratamentos.

Paralelamente às questões envolvendo GSH, Zagorchev *et al* (2013) comentam que cisteínas são as principais doadoras de enxofre para a biossíntese de metionina (Met) e que ao contrário de Cys, a acumulação de Met livre em células de plantas sob estresse não parece estar ligada à defesa antioxidante. Metionina é precursora da síntese de várias poliaminas, como esperminas, produzidas em *E. crassipes* em resposta ao arsenato (Nascimento *et al* 2017). Contudo, a biossíntese de poliaminas pode ser realizada em uma rota independente do SAM em condições de baixa disponibilidade de enxofre. S-adenosilmetionina (SAM) também participa da biossíntese de etileno.

Em folhas e raízes de *E. crassipes* expostas ao arsenato, um intermediário entre SAM e etileno teve seus teores elevados nos tratamentos contendo menor disponibilidade de enxofre (LS+As e NS+As). Trata-se de 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Plantas de arroz estressadas com cromo (Steffens 2014; Trinh *et al* 2014) e *Arabidopsis thaliana* estressadas por cádmio (Schellingen *et al* 2014) mostraram aumento na expressão de genes relacionados a biossíntese de ACC e etileno.

O etileno por ser uma molécula gasosa, pode difundir-se livremente de uma célula para outra vizinha, evocando principalmente respostas locais, sendo facilitado pela presença de aerênquima ou grandes vazios intercelulares em *Eichhornia crassipes*, auxiliando no transporte rápido. Mas de acordo com Van-de-Poel & Straeten (2014), as respostas de etileno de longa distância também podem ser alcançadas pelo transporte de ACC.

Ademais, de acordo com Bucker-Net *et al* (2017), recentes estudos apontam que sob condições de estresse de metais pesados, as plantas mostram um rápido aumento na produção de etileno e reduzem o crescimento e desenvolvimento da planta, indicando um forte envolvimento deste fitohormônio na resposta da planta à toxicidade de metais pesados (Maksymiec 2007; Schellingen *et al* 2014). Isto poderia ajudar a explicar a maior redução na taxa de crescimento observado em folhas e raízes crescendo nos meios LS+As e NS+As.

Iqbal *et al* (2014) relatam que sob condições ambientais ideais, enxofre e etileno regulam os processos fisiológicos interdependentes, enquanto que em condições de ambientes estressantes, aumentam-se a capacidade de assimilação de S e síntese de GSH. Nestas condições, a sinalização de etileno também regula a síntese de GSH para uma melhor adaptação das plantas. Assim, existe uma interação entre S e etileno para controlar o desenvolvimento da planta em ambientes ótimos e estressantes. Van-de-Poel & Straeten (2014) ressaltam que ACC foi identificado como uma molécula de sinalização potencial, independente do etileno, abrindo novas vias a serem descobertas, incluindo agora a resposta ao estresse por arsenato em *Eichhornia crassipes*.

5. Considerações finais

-A privação de enxofre permitiu a ativação da via de absorção de enxofre em *E.*

crassipes. Após o reabastecimento, folhas e raízes responderam de maneira diferenciada ao estresse por arsenato, também em função da oferta de enxofre.;

-Além disso, se mostrou uma estratégia extremamente eficaz quando se trata de novas possibilidades em programas de fitorremediação de arsênio usando a espécie, demonstrando inclusive que a maior oferta de enxofre no reabastecimento, potencializou a capacidade de acumulação do metal, permitindo um acúmulo mais elevado de cisteínas e γ -glutamilcisteína, impactando a biossíntese de glutatona;

-A maior disponibilidade de enxofre permitiu ainda uma maior taxa de crescimento e menor perda de biomassa radicular;

- Citocininas, ácido abscísico, auxinas, ACC, ácido salicílico e ácido jasmônico atuam na percepção e resposta ao estresse por arsenato e respondem ainda a oferta diferenciada de enxofre;

- A acumulação de tiós está diretamente ligada a defesa, tolerância e acumulação de arsênio em *E. crassipes*, tendo íntima relação com o controle hormonal;

- Devido a escassez de informações sobre esses mecanismos regulatórios em macrófitas aquáticas, novas abordagens moleculares podem auxiliar na compreensão e na reversão do conhecimento acumulado em novas intervenções visando a fitorremediação e /ou na tolerância ao estresse por arsênio.

6. Referências

Ahmad P, Rasool S, Gul A, Sheikh SA, Akram NA, Ashraf M, Kazi AM & Guzel S. (2016). Jasmonates: Multifunctional Roles in Stress Tolerance. *Frontiers Plant Science*; 7: 813.

Alexiava V, Sergiev I, Mapelli S & Karanov E (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, cell and environment*. 24:1337-1344.

Allan J. E. (1969) The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectrometry. *Varian Techtron Bulletin* 12/69, 15p.

Achard P, Herr A, Baulcombe DC & Harberd NP (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*. 131, 3357–3365.

Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, v.24, p. 1-15.

Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S & Davison AW (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, v. 32, p.85-100.

Bielach A, Hrtyan M & Tognetti VB (2017). Plants under Stress: Involvement of Auxin and Cytokinin. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul; 18(7): 1427.

Bielecka M, Watanabe M, Morcuende R, Scheible WR, Hawkesford MJ, Hesse H, Hoefgen R (2015) Transcriptome and metabolome analysis of plant sulfate starvation and resupply provides novel information on transcriptional regulation of metabolism associated with sulfur, nitrogen and phosphorus nutritional responses in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 5:805

Brenner, W. G., Ramireddy, E., Heyl, A., & Schmölling, T. (2012). Gene Regulation by Cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. 3;8

Bücker-Neto L., Paiva ALS, Machado RD, Rafael, Arenhart RA & Margis-Pinheiro M (2017). Interactions between plant hormones and heavy metals responses. *Genet Mol Biol*. Apr; 40(1 Suppl 1): 373–386

Bolton M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense - fuel for the fire. *Mol. Plant Microbe Interact*. 22 487–497. 10.1094/MPMI-22-5-0487

Cazzonelli CI, Vanstraelen M, Simon S, Yin K, Carron-Arthur A & Nisar N (2013). Role of the *Arabidopsis* PIN6 Auxin Transporter in Auxin Homeostasis and Auxin-Mediated Development. PLoS ONE 8(7): e70069.

Chandrakar V, Dubey A, & Keshavkant S. (2016). Modulation of antioxidant enzymes by salicylic acid in arsenic exposed *Glycine max* L. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 16(3), 662-676

Clark R. B., (1975). Characterization of phosphatase of intact maize roots. J. Agric. Food Chem. 23, 458-460

DaMatta FM, Loos RA, Silva EA & Loureiro ME (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. Journal of Plant Physiology, 159: 975-981.

Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J & Hirt H (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol Adv.* Jan-Feb; 32(1):40-52.

Dixit G, Singh AP, Kumar A, Dwivedi S, Deeba F, Kumar S, Suman S, Adhikari B, Shukla Y, Trivedi PK, Pandey V & Tripathi RD (2015). Sulfur alleviates arsenic toxicity by reducing its accumulation and modulating proteome, amino acids and thiol metabolism in rice leaves. *Sci Rep.*; 5: 16205.

Elobeid M & Polle A (2011). Interference of Heavy Metal Toxicity with Auxin Physiology. *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation* pp 249-259

Farnese FS, Oliveira JA, Farnese MS, Gusman GS, Silveira NM & Siman LI (2014). Uptake arsenic by plants: Effects on mineral nutrition, growth and antioxidant capacity. *IDESIA Volumen 32, N° 1.* pp. 99-106 (Chile).

Farnese FS, Oliveira JA, Paiva EAS, Menezes-Silva PE, da Silva AA, Campos FV & Ribeiro C (2017). The Involvement of Nitric Oxide in Integration of Plant Physiological and Ultrastructural Adjustments in Response to Arsenic. *Front Plant Sci.* 2017 Apr 19;8:516

Fan J, Xia X, Hu Z, Zia N & Liu C (2013). Excessive sulfur supply reduces arsenic accumulation in brown rice. *Plant Soil Environ.* Vol. 59, 2013, No. 4: 169–174

Farooq MA, Gill RA, Islam F., Ali B, Liu H, Xu J, He S & Zhou W (2016). Methyl Jasmonate Regulates Antioxidant Defense and Suppresses Arsenic Uptake in *Brassica napus* L. *Front Plant Science*; 7: 468

Ghavri SV & Singh RP (2012). Growth, biomass production and remediation of copper contamination by *Jatropha curcas* plant in industrial wasteland soil. *J. Environ Biol.* 33:207–214.

Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS & Cambraia J (2013). Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. *Acta Physiologiae Plantarum.* V.35. pp 1201–1209

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

Huang SQ, Xiang AL, Che LL, Chen S, Li H, Song JB & Yang ZM (2010). A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulphate-deficiency and cadmium stress. *Plant Biotechnology Journal.* 8,887–899.

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

Iqbal NM, Asim MM, Iqbal RK, Mohd A, Fatma M. & Khan NA. (2013). Cross-talk between sulfur assimilation and ethylene signaling in plants. *Plant Signal Behav.* Jan; 8(1)

Joshi R., Wani SH, B; Singh B.; Bohra A.; Dar ZA; Lone AA; Pareek A. & Singla-Pareek SL. (2016). Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. *Front Plant Sci.*; 7: 1029.

Kopriva S, Calderwood A, Weckopp SC & Koprivova A (2015). Plant sulfur and Big Data. *Plant Science*. Volume 241, December, Pages 1-10

Keunen, E., Schellingen, K., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2016). Ethylene and Metal Stress: Small Molecule, Big Impact. *Frontiers in Plant Science*, 7, 23.

Khan MIR, Fatma M., Per TS, Anjum NA & Khan NA (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front Plant Sci.* 2015; 6: 462.

Kiba T, Takei K, Kojima M & Sakakibara H (2013). Side-Chain Modification of Cytokinins Controls Shoot Growth in *Arabidopsis*. Volume 27, Issue 4, 25 November 2013, Pages 452-461

Kopriva S., Calderwood A., Weckopp SC & Koprivova A. (2015). Plant sulphur and Big Data. *Plant Science*. vol: 241; pp. 1-10

Kumar B, Prakash A, Ruhela RK & Medhi B. (2014) Potential of metabolomics in preclinical and clinical drug development. *Pharmacol Rep.* 66:956–963.

Krishnamurthy A & Rathinasabapathi (2013). Auxin and its transport play a role in plant tolerance to arsenite-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. Volume 36, Issue 10, pp 1838–1849.

Lichtenthaler HK (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, v. 148, p. 350 - 382, 1987.

Lin CY, Trinh NN, Lin CW and Huang HJ (2013) Transcriptome analysis of phytohormone, transporters and signaling pathways in response to vanadium stress in rice roots. *Plant Physiol Biochem* 66:98-104.

Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HÁ, Totola MR & Loureiro ME (2002). Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canéfora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.* 47: 239-247.

Meadows R (2014). How Plants Control Arsenic Accumulation. *PLoS Biol* 12(12): e1002008.

Meneguelli-Souza AC, Vitória AP, Vieira TO, Degli-Esposti MSO & Souza CMM (2016). Ecophysiological responses of *Eichhornia crassipes*(Mart.) Solms to As⁵⁺ under different stress conditions. *Photosynthetica*. Volume 54, Issue 2, pp 243–250

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

Mohan TC, Castrillo G, Navarro C, Zarco-Fernández S, Ramireddy E, Mateo C, Zamarreño AM, Paz-Ares J, Muñoz R, García-Mina JM, Hernández LE, Schmülling T & Leyva A. (2016). Cytokinin Determines Thiol-Mediated Arsenic Tolerance and Accumulation. *Plant Physiology*, Vol. 171, pp. 1418–1426

Müller, M. & Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene Response Factors: A Key Regulatory Hub in Hormone and Stress Signaling. *Plant Physiology*, 169(1), 32–41.

Mukhopadhyay M & Mondal TK (2015) Effect of ainc and boron on growth and water relations of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. T-78. *Natl Acad Sci Lett* 38:283-286.

O'Brien JA & Benková E. (2013). Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses *Front Plant Sci.*; 4: 451.

Pereira FJ, Castro EM, Oliveira C, Pires MF & Pasqual M (2011). Anatomical and physiological mechanisms of water hyacinth plants to Arsenic contamination tolerance. *Planta Daninha*. vol.29 n.2.

Pospíšilová J. (2003). Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biol. Plant.*, 46, pp. 491-506

Reid R., Gridley K., Kawamata Y. & Zhu, Yongguan (2013). Arsenite elicits anomalous sulfur starvation responses in barley. *Plant Physiology*, 162(1), 401–9.

Rejeb IB, Pastor V. & Mauch-Mani B. (2014). Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants (Basel)*. Dec; 3(4): 458–475.

Rosen BP, Ajees AA & McDermot TR (2011). Life and death with arsenic-Arsenic life: An analysis of the recent report “A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus” *Bioessays*. May; 33(5): 350–357.

Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K & Hell R (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 62, pp. 157-184

Tripathi D. K., Singh V. P., Kumar D. & Chauhan D. K. (2012). Impact of exogenous silicon addition on chromium uptake, growth, mineral elements, oxidative stress, antioxidant capacity, and leaf and root structures in rice seedlings exposed to hexavalent chromium. *Acta Physiol. Plant.* 34, 279–289. 10.1007/

Shibagaki N, Rose A, McDermott JP, Fujiwara T & Hayashi H, (2002). Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify SULTR1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J.* 29:475–86

Srivastava S, Srivastava A. K, Suprasanna P, D'Souza S. F (2009) Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. *J Exp Bot* 60:3419–3431

Srivastava, S.; Srivastava, A.K.; Suprasanna, P. & D'Souza, S. F. (2013). Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in *Brassica juncea*. *J Exp Bot.* Jan;64(1):303-1.

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

Tabata R, Ikezaki M, Fujibe T, Aida A, Tian C, Ueno Y, Yamamoto KT, Machida Y, Nakamura K & Ishiguro S (2010). Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 Regulate Jasmonic Acid Biosynthesis and Floral Organ Development via Repression of Class 1 *KNOX* Genes, *Plant and Cell Physiology*, Volume 51, Issue 1, 1. Pages 164–175.

Takahashi H, Buchner P, Yoshimoto N, Hawkesford MJ & Shiu SH (2011). Evolutionary relationships and functional diversity of plant sulfate transporters. *Front. Plant Sci.*, 2 (119).

Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, et al. 2000. The role of three functional sulfate transporters involved in uptake and translocation of sulfate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23:171–82

Van de Poel, B., & Van Der Straeten, D. (2014). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Frontiers in Plant Science*, 5, 640.

Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., ... Sharma, S. (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8, 161.

Yoshimoto N, Takahashi H, Smith FW, Yamaya T, Saito K. 2002. Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 29:465–73

Yoshimoto N, Inoue E, Saito K, Yamaya T & Takahashi H. (2003). Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131:1511–17

Wang R, Wang J, Zhao L, Yang S & Song Y.(2015). Impact of heavy metal stresses on the growth and auxin homeostasis of Arabidopsis seedlings. *Biometals*. Feb;28(1):123-32.

Wang Y, Wang Y, Kai W, Zhao B, Chen P, Sun L, Ji K, Li Q, Dai S & Sun Y (2014) Transcriptional regulation of abscisic acid signal core components during cucumber seed germination and under Cu²⁺, Zn²⁺, NaCl and simulated acid rain stresses. *Plant Physiol Biochem* 76:67-76.

Wani SH, Kumar V, Shriram V. & (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*. v4. Pages 162-176.

Zhang J., Zhao Quan-Zhi, Duan Gui-Lan & Huang Yan-Chao (2011) Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings. *Environmental and Experimental Botany* Volume 72, Issue 1, Pages 34-40.

Zhang D. (2014). *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling*. New York, NY: Springer.

Zhao FJ, McGrath SP & Meharg AA. (2010). Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 535–559.10.1146

Zhao H, Wu L, Chai T, Zhang Y, Tan J & Ma S (2012). The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *J Plant Physiol.* 69:1243–1252

Zwack PJ, DeClercq I, Howton TC, Hallmark HT, Hurny A, Keshishian EA, Parish AM, Benkova E, Mukhtar MS, Breusegem FV & Rashotte AM (2016). Cytokinin Response Factor 6 Represses Cytokinin-Associated Genes during Oxidative Stress. *Plant Physiology*. Oct; 172(2): 1249–1258.

7. Material Suplementar

Tabela Suplementar TS1

Tabela S1. Lista das transições utilizadas na análise por MRM para o monitoramento e quantificação de hormônios e tióis. São mostrados a massa do íon molecular, o fragmento analisado no MS2 no espectrômetro QqQ.

Metabolites (thiols and phytohormones)	MS1	MS2
Cysteine (Cys)	122	58
Glutathione reduced (GSH)	308	76
Glutathione Oxidized (GSSH)	613	355
Auxin (AUX)	176	130
Zeatin-trans (tZ)	220	202
1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)	102	56
Jasmonic acid (JA)	209	59
Salicylic Acid (AS)	137	93
Abcisic acid (ABA)	263	153
NAA	185	141

Suplemento 1 - Teores de Enxofre, Arsênio e Teores de Malondialdeído (MDA) em folhas *E. crassipes* após 72h do reabastecimento.

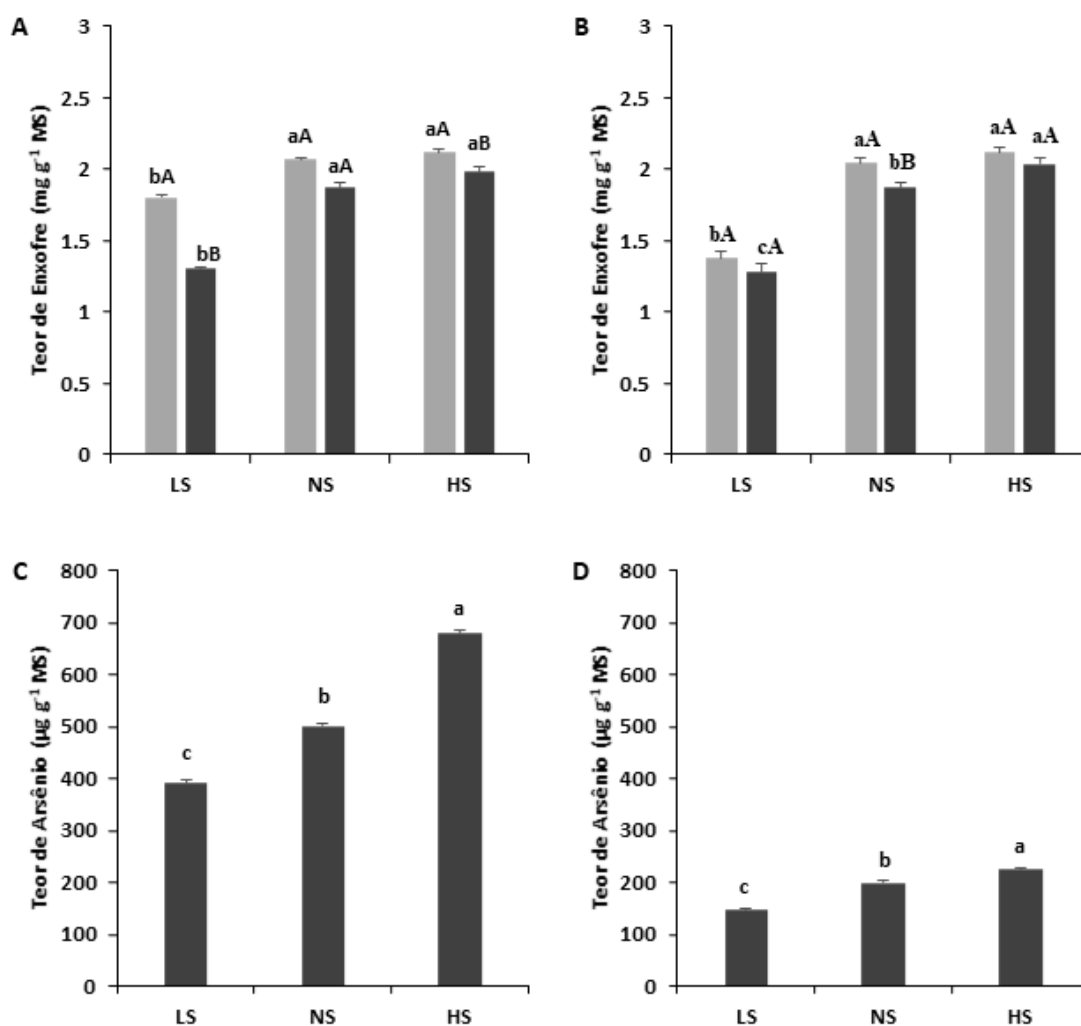


Figura S1.1- Teores de Enxofre e Arsênio em folhas (A) e raízes(B) de *E. crassipes* após 72h do reabastecimento. (A e C) Teores de enxofre e arsênio em folhas; (B e D) Teores de enxofre e arsênio em raízes. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

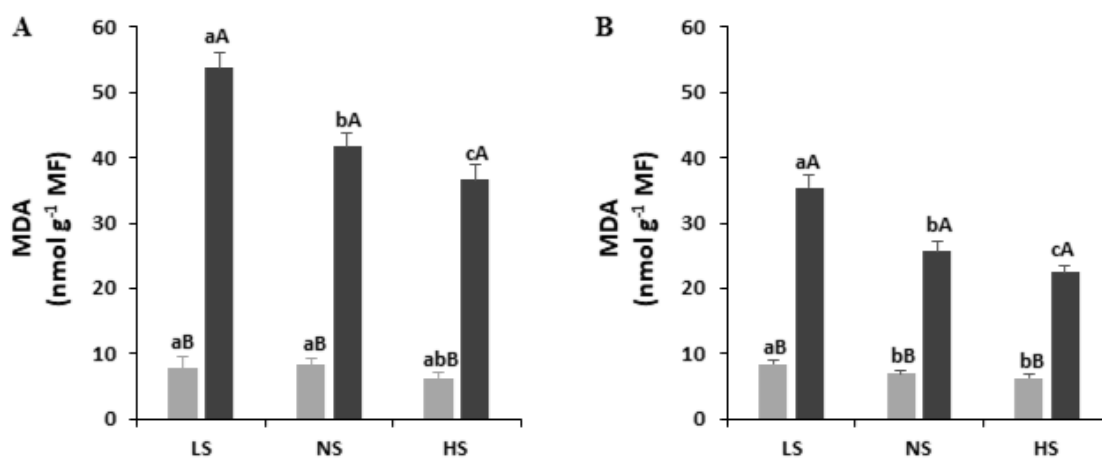


Figura S1.2- Teores de Malondialdeído (MDA) em folhas (A) e raízes (B) de *E. crassipes* após 72h do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Suplemento 2- Taxa de Assimilação Líquida de Carbono (*A*), teor de clorofilas, temperatura e transpiração foliar.

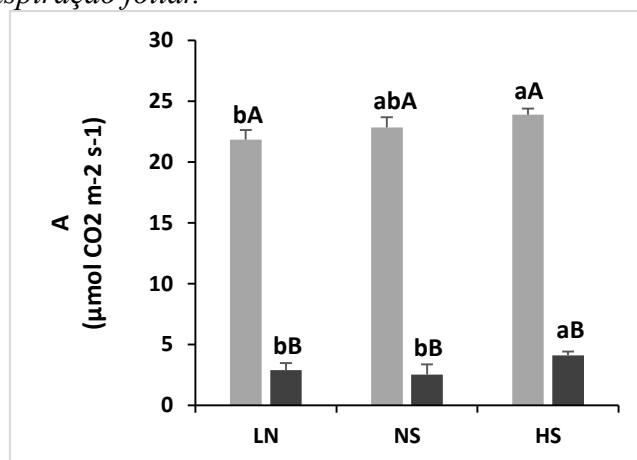


Figura S2.1- Taxa de Assimilação Líquida de Carbono (*A*) em folhas de *E. crassipes* após 72h do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey

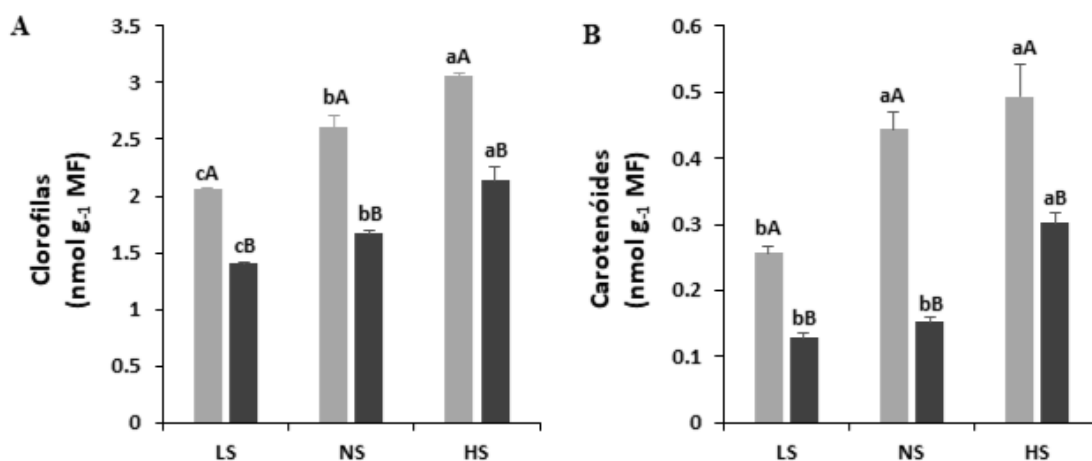


Figura S2.2- Teor de clorofilas e carotenóides em folhas de *E. crassipes* após 72h do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos

diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

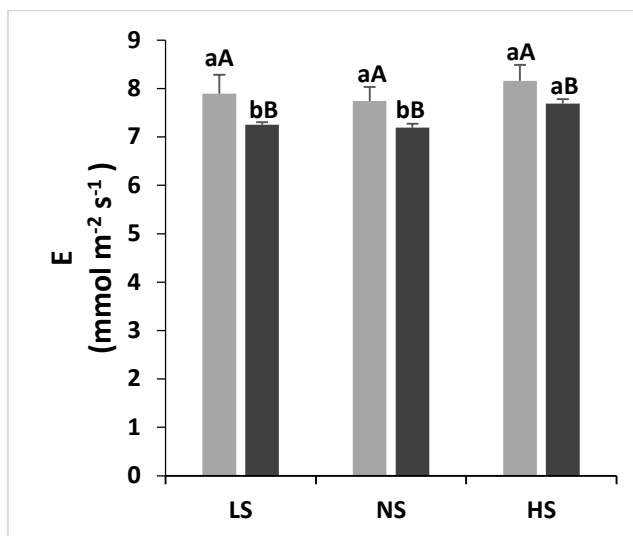


Figura S2.3-Transpiração foliar em *E. crassipes* após 72h do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) normal enxofre; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As(V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

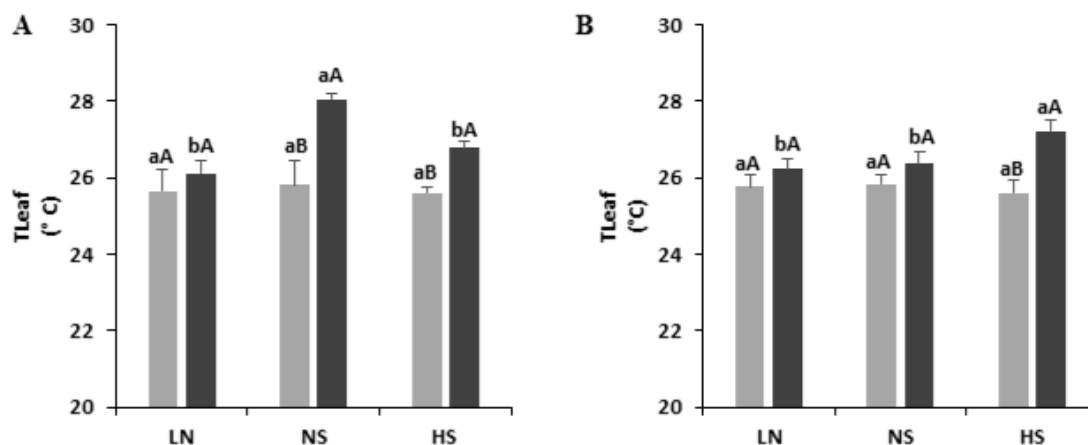


Figura S2.4 – Temperatura foliar após 24h (A) e 72h(B) de exposição ao arsenato em *E. crassipes*. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0µM (Cinza claro) ou As (V): 8µM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Suplemento 3 – Teor de cisteínas em folhas e raízes

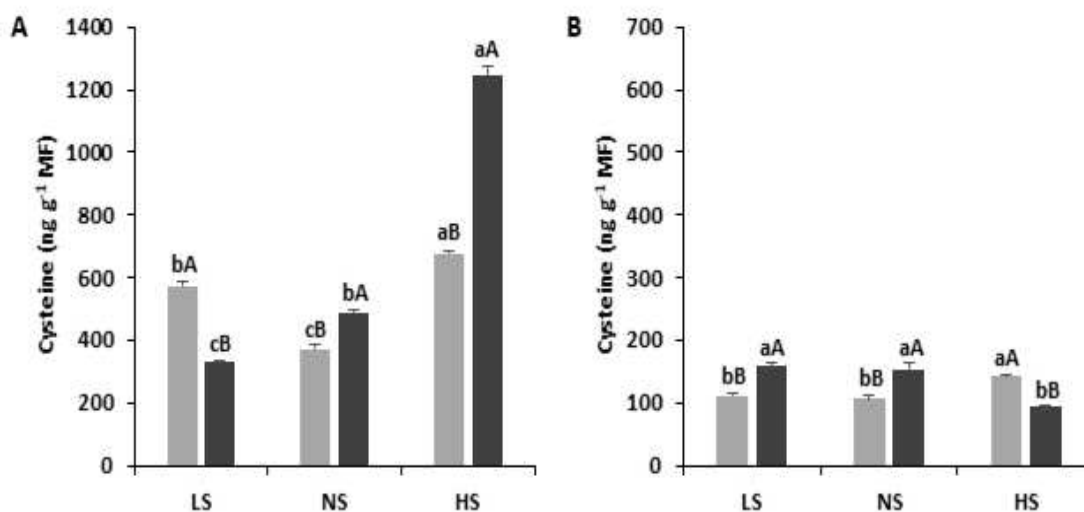


Figura S3.1- Teor de cisteínas em folhas (A) e raízes (B) após 72 do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0 μM (Cinza claro) ou As(V): 8 μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Suplemento 4 - Teor de Gama-glutamil-cisteína (γ -GC) em folhas(A) e raízes(B) após 72h.

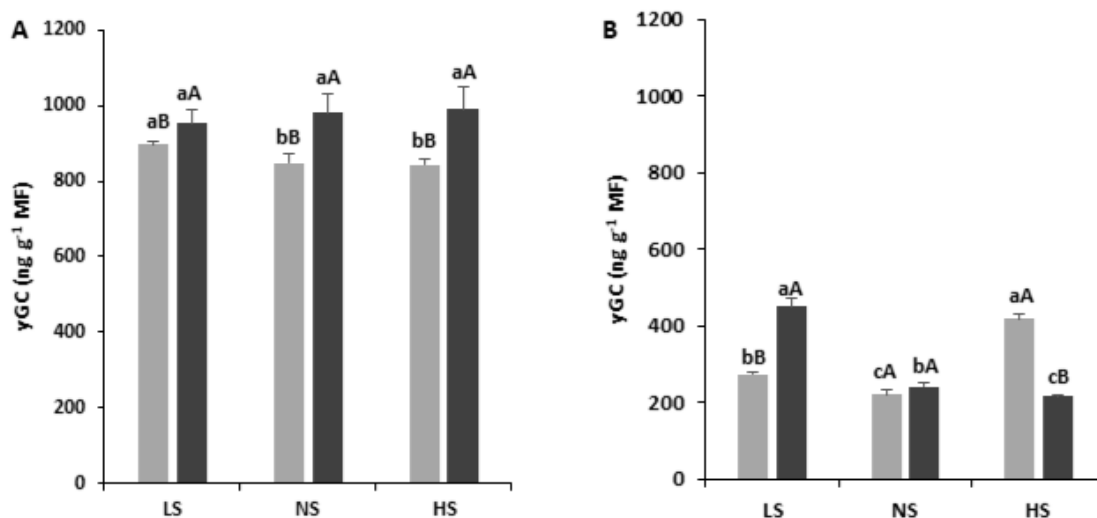


Figura S4.1- Teor de Gama-glutamil-cisteína (γ -GC) em folhas(A) e raízes(B) após 72 h do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As (V): 0 μ M (Cinza claro) ou As (V): 8 μ M (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Suplemento 5 - Teor de Glutathiona Total (GSH+GSSH) em folhas (A) e raízes (B) após 72h.

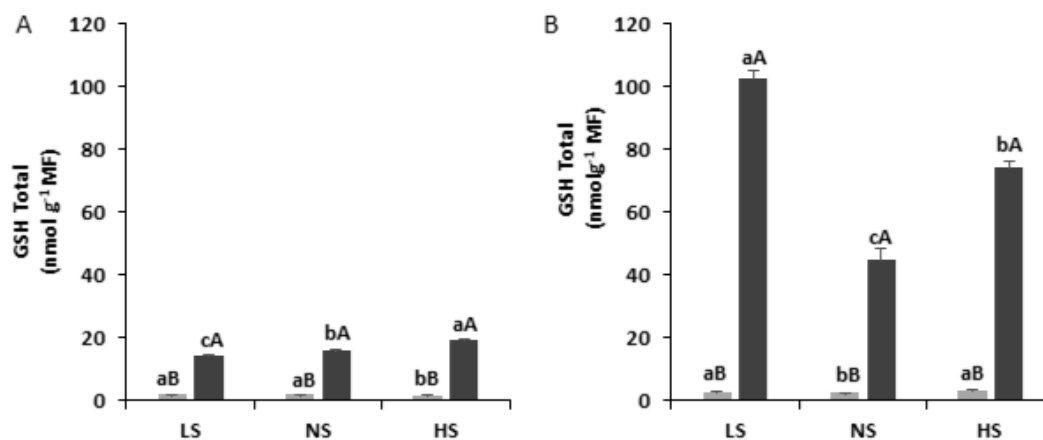


Figura S5.1- Teor de Glutathiona Total (GSH+GSSH) em folhas (A) e raízes (B) após 72h do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As (V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Suplemento 6 – Teor de fitormônios tzeatin, ácido jasmônico e ácido salicílico após 72h.

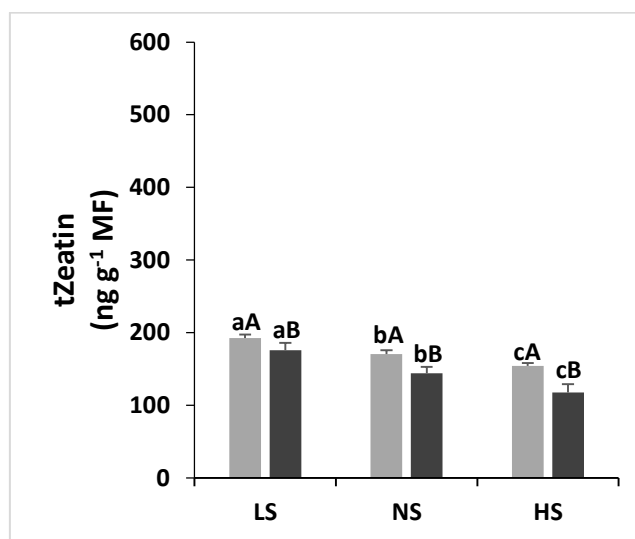


Figura S6.1- Teor de tZeatin em raízes após 72 do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As (V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

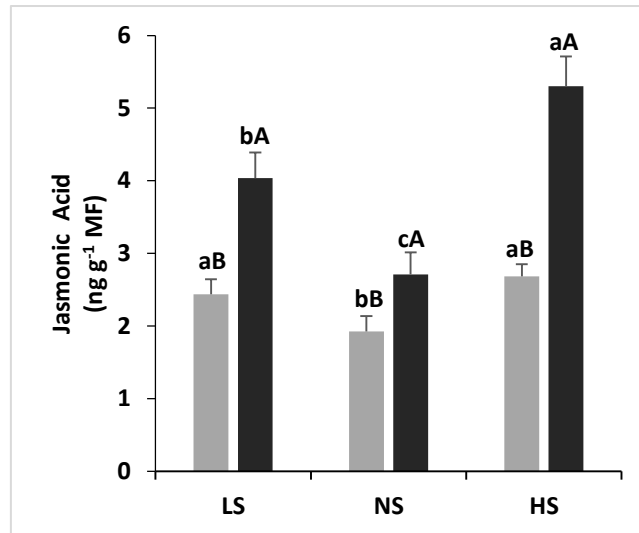


Figura S6.2- Teor de ácido jasmônico em raízes após 72 do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0 μ M (Cinza claro) ou As (V): 8 μ M (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

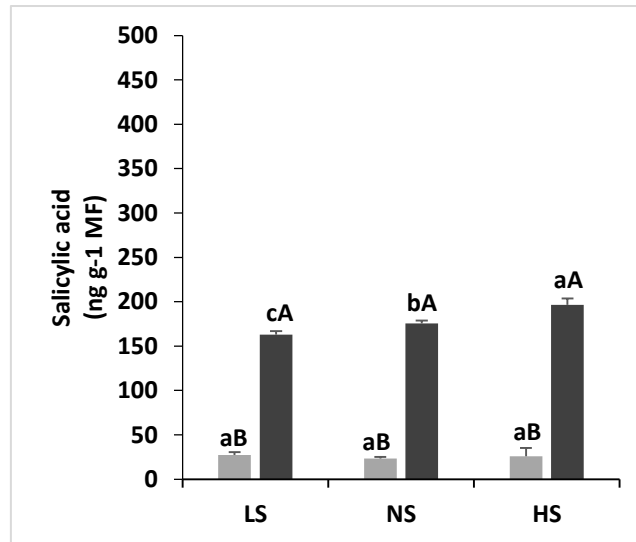


Figura S6.3- Teor de Àcido Salicílico em raízes após 72 do reabastecimento. Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0 μ M (Cinza claro) ou As (V): 8 μ M (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Suplemento 7 – Teor de fósforo

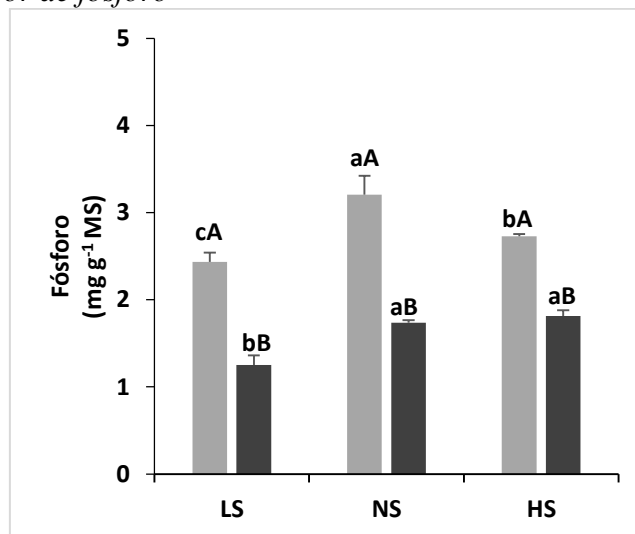


Figura S7.1 – Teor de fósforo em folhas 72h de exposição ao arsenato em *E. crassipes*.
Legenda: (LS) baixo enxofre; (NS) enxofre disponível; (HS) alto enxofre – contendo As(V): 0μM (Cinza claro) ou As (V): 8μM (Cinza escuro). *Médias seguidas por letras minúsculas iguais nos diferentes tratamentos na ausência de Arsênio e minúsculas iguais nos diferentes tratamentos contendo arsênio não diferem significativamente entre si a 5% de pelo teste de Tukey. **Médias seguidas por letras maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.