

ADINAN ALVES DA SILVA

**RESPOSTAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO E
METABOLISMO DA GLUTATIONA EM *Salvinia molesta* D. S. Mitchell
(Salviniaceae) SUBMETIDA AO ARSENITO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2014**

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

T

S586r
2014
Silva, Adinan Alves da, 1982-
Respostas do sistema antioxidativo e metabolismo da glutathione
em *Salvinia Molesta* D. S. Mitchell (Salviniaceae) submetidas ao arsenito /
Adinan Alves da Silva. - Viçosa, MG, 2014.
vii, 41f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.30-41.

1. Salviniaceae. 2. Arsenito. 3. Fitorremediação. 4. Enzimas
Antioxidantes. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II.
Título.

CDD 22. ed. 587.3

ADINAN ALVES DA SILVA

**RESPOSTAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO E
METABOLISMO DA GLUTATIONA EM *Salvinia molesta* D. S. Mitchell
(Salviniaceae) SUBMETIDA AO ARSENITO**

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

APROVADA: 7 de fevereiro de 2014.

Luzimar Campos da Silva

Wagner Luiz Araújo

Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais essa conquista.

Aos meus amados pais, Sebastião e Edna que mesmo não estando mais presentes materialmente, continuam sendo a minha força para seguir em frente.

Aos meus queridos irmãos Djalma, Cássia Renata e Paulo pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, professor Juraci Alves de Oliveira pela orientação e ensinamentos, aliados a uma agradável convivência.

Ao professor Cleberson Ribeiro pela coorientação e disponibilidade em ajudar sempre.

Aos amigos de Viçosa, especialmente ao David, Fernanda, Rebeca e Amanda por terem compartilhado comigo momentos de desespero e de alegrias.

Aos meus amigos de Rio Verde, Goiás.

Aos meus amigos do Laboratório de Ecofisiologia do IFG – Campus Rio Verde, pela parceria durante a graduação, especialmente ao professor Alan Carlos pela orientação e incentivo.

Aos amigos do Laboratório que contribuíram diretamente para a realização desse trabalho: Luciana, Cristiane e Regiane.

Às “Fernandas” do laboratório, pela ajuda essencial na realização desse trabalho e pelos momentos de descontração e boas risadas.

Aos funcionários Carlos e Beringh pela ajuda prestada.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal por me proporcionar esta oportunidade.

A CAPES e a FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores membros da banca examinadora.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. METODOLOGIAS	5
3.1. Obtenção, aclimatação das plantas e aplicação dos tratamentos	5
3.2. Absorção de As e efeitos no crescimento de <i>Salvinia molesta</i>	6
3.2.1. Determinação do teor de As e fator de translocação (FT).....	6
3.2.2. Determinação da taxa de crescimento relativo (TCR)	6
3.3. Sintomatologia visual	6
3.4. Avaliação do teor de pigmentos cloroplásticos, parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo antioxidativo	6
3.5. Determinação da concentração de pigmentos cloroplásticos	7
3.6. Determinação do teor espécies reativas de oxigênio (ROS)	7
3.7. Avaliação dos danos em membranas celulares	8
3.7.1. Determinação da peroxidação de lipídios	8
3.7.2. Determinação do extravasamento de eletrólitos	8
3.8. Avaliação das enzimas antioxidativas	9
3.8.1. Obtenção dos extratos enzimáticos	9
3.8.2. Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD)	9
3.8.3. Determinação da atividade da catalase (CAT)	10
3.8.4. Determinação da atividade da peroxidase total (POX)	10
3.8.5. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX)	10
3.9. Avaliação do metabolismo da glutationa	11
3.9.1. Teor de glutationa total (GSH +GSSG)	11
3.9.2. Atividade da sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS)	11
3.9.3. Atividade da redutase da glutationa (GR)	12
3.9.4. Atividade da peroxidase da glutationa (GPX)	12
3.9.5. Atividade da sulfotransferase da glutationa (GST)	13
3.10. Delineamento experimental	13

4. RESULTADOS	13
4.1. Teor de As absorvido e FT	13
4.2. Taxa de crescimento relativo (TCR)	14
4.3. Sintomatologia visual	15
4.4. Teor de espécies reativas de oxigênio (ROS)	16
4.5. Concentração de pigmentos cloroplastídicos	17
4.6. Integridade de membranas celulares	18
4.7. Atividade das enzimas antioxidativas: SOD, CAT, POX e APX	18
4.8. Metabolismo da glutathiona	20
4.8.1. Teor de glutathiona total (GSH +GSSG)	20
4.8.2. Enzimas do metabolismo da glutathiona: γ -GCS, GR, GPX e GST.....	20
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

SILVA, Adinan Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Respostas do sistema antioxidativo e metabolismo da glutathione em *Salvinia molesta* D. S. Mitchell (Salviniaceae) submetida ao arsenito.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientadores: Cleberson Ribeiro e José cambraia.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do As^{III} no metabolismo antioxidativo de *Salvinia molesta*, indivíduos dessa espécie foram expostos às concentrações de 0, 5, 10 e 20 μM desse elemento em solução nutritiva, permanecendo sob tratamento por 24 h para as análises bioquímicas e 96 h para verificar a absorção de As , a taxa de crescimento relativo (TCR) e a sintomatologia visual. Plantas de *S. molesta* acumularam As nas folhas submersas e nas flutuantes, resultando em redução na TCR desses órgãos. Sintomas visuais, como clorose e necrose aumentaram com o incremento na concentração do poluente e tempo de exposição aos tratamentos. As respostas antioxidativas diferiram entre folhas flutuantes e folhas submersas, havendo nestas últimas, redução na atividade das enzimas dismutase do superóxido e catalase em plantas expostas a maior concentração de As^{III} . Com isso, houve aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nas folhas submersas e consequentes danos em membranas celulares. Nas folhas flutuantes, verificou-se atividade absoluta mais elevada das enzimas antioxidativas (catalase, peroxidase total, peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido) e menor acúmulo de As , em comparação com as folhas submersas. Em conjunto, esses fatores podem ser os responsáveis pela ausência de danos significativos em membranas celulares e de alterações no conteúdo de pigmentos cloroplastídicos nas folhas flutuantes. O teor de glutathione total e a atividade de algumas enzimas envolvidas no seu metabolismo, também foram alterados em resposta ao As^{III} em *S. molesta*. A presença do poluente estimulou, tanto em folhas flutuantes, quanto nas folhas submersas, incrementos nas concentrações de glutathione total e na atividade da sintetase da γ -glutamilcisteína. As enzimas peroxidase da glutathione e sulfotransferase da glutathione, também apresentaram incrementos em suas atividades em ambos os órgãos avaliados, enquanto a redutase da glutathione aumentou somente nas folhas submersas. De modo geral, as folhas flutuantes demonstraram maior tolerância ao As do que as folhas submersas. No entanto, essa resposta diferenciada entre os órgãos necessita de estudos adicionais para ser esclarecida. O tempo de exposição aos tratamentos e a concentração de As^{III} influenciaram nas respostas das plantas e indicam a necessidade de novas pesquisas, no sentido de caracterizar os efeitos desses fatores no

metabolismo antioxidativo de *S. molesta* e definir o seu potencial como espécie fitorremediadora de As.

ABSTRACT

SILVA, Adinan Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2014. **Respostas do sistema antioxidativo e metabolismo da glutathione em plantas de *Salvinia molesta* D. S. Mitchell submetida ao arsenito.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisers: Cleberson Ribeiro and José cambraia.

In order to evaluate the effects of As^{III} in antioxidant metabolism of *Salvinia molesta*, individuals of this specie were exposed to concentrations of 0, 5, 10 and 20 µM of this element in nutrient solution, remaining under treatment for 24 h to biochemical analyzes and 96 h to verify As absorption, relative growth rate (RGR), and visual symptoms. *S. molesta* plants accumulated As in the submerged and on the floating leaves, resulting in reduction in the RGR of this organs. Visual symptoms, such as chlorosis and necrosis increased with the increase in pollutant concentration and duration of exposure to treatments. Antioxidative responses differ between floating leaves and submerged leaves, having is this last, reduction in the activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase in higher concentrations of As^{III}. This led to increased production of reactive oxygen species and consequent damage to cell membranes in the submerged leaves. In the floating leaves, it was found the highest absolute activity of antioxidant enzymes (catalase, total peroxidase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase) and less accumulation of As, as compared to the submerged leaves. Together, these factors may be responsible for the absence of significant cell membranes damage and changes in the content of chloroplastidic pigments in floating leaves. The glutathione content and the activity of some enzymes involved in its metabolism were also changes in response to As^{III} in *S. molesta*. The presence of pollutant stimulated both in floating leaves and in the submerged leaves, increases in concentrations of total glutathione and the γ-glutamylcysteine synthetase activity. The glutathione peroxidase and glutathione sulfotransferase also showed increases in their activities, while glutathione reductase showed no change in the floating leaves, but increased significantly in the submerged leaves. In general, the floating leaves showed greater tolerance than the submerged leaves. However, this differential response between the organs needs further studies to be clarified. The exposure time and the concentration of As^{III} influenced in plant responses and indicate the need for further research, in order to characterize the effects of these factors in antioxidative metabolism of *S. molesta* and define its potential as As phytoremediation species.

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por metais e metaloides tóxicos está disseminada globalmente devido às atividades antropogênicas e geogênicas, o que pode ser potencialmente danoso para todas as formas de vida (Sytar et al., 2013). Muitos desses elementos apresentam elevada toxidez, com características de bioacumulação e biomagnificação ao longo da cadeia alimentar (Bhargava et al., 2012), tornando esses poluentes um dos mais sérios problemas de saúde ambiental na sociedade moderna (Mudhoo et al., 2012). Inserido nesse contexto, o arsênio (As) é um metaloide altamente tóxico, podendo ser liberado no ambiente por meio de atividades geológicas, mineração e fundição de metais, queima de combustíveis fósseis, uso de fertilizantes, pesticidas e herbicidas (Zhao et al., 2010a; Gupta et al., 2011).

Atualmente, existem diversos relatos de ampla contaminação por As dos suprimentos de águas superficiais e subterrâneas em diversos países ao redor do mundo (Sharma et al., 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As como um valor de referência para água potável (World Health Organization, 2011), pois concentrações acima desse limite podem causar danos biológicos diretos ou indiretos, por meio do processo de biomagnificação (Rahman et al., 2012). Diante dessa realidade, medidas que visem diminuir a concentração de As em ambientes aquáticos contaminados tornam-se relevantes, como uma forma de proteção à saúde humana e ambiental.

Uma das técnicas possíveis de utilização para esse fim é a fitorremediação, que emprega plantas com a capacidade de absorver e acumular altas quantidades de certos poluentes em suas raízes e/ou folhas (Vithanage et al., 2012). Diversas espécies de macrófitas têm demonstrado potencial para a fitorremediação de vários metais tóxicos e As, dentre elas: o aguapé (*Eichhornia crassipes*) (Alvarado et al., 2008), a *Pistia stratiotes* (Farnese et al., 2013), algumas espécies da família Lemnaceae (*Lemna gibba*, *Lemna minor* e *Spirodela polyrhiza*) (Rahman et al., 2007; Alvarado et al., 2008), do gênero *Azolla* (*A. caroliniana* e *A. filiculoides*) (Rahman et al., 2008a; Zhang et al., 2008) e do gênero *Salvinia* (*S. natans* e *S. minima*) (Hoffmann et al., 2004; Rahman et al., 2008b).

Outra macrófita, cujo potencial de fitorremediação de poluentes ainda é pouco conhecido é a *Salvinia molesta*. Essa planta é uma pteridófito flutuante e livre, nativa do Sudeste do Brasil, constituída por um par de folhas de flutuação e uma folha submersa unidas em um mesmo nó, sendo a folha submersa modificada para agir como uma raiz

(Estrella-Gómez et al., 2012). Em um ensaio realizado sob condições controladas, *S. molesta* demonstrou a capacidade de absorver o As^{V} (Hariyady et al., 2013), porém, ainda não são encontrados na literatura trabalhos que avaliem os efeitos do As^{III} no metabolismo antioxidativo dessa planta. Esses estudos são importantes no sentido de indicar o uso dessa espécie na fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por metais e metaloides tóxicos.

Para uma planta ser considerada como potencial fitorremediadora, além de acumular o poluente é interessante que ela também consiga tolerar os seus efeitos deletérios (Sood et al., 2012). O As é um metaloide que afeta a morfofisiologia das plantas (Rahman et al., 2009) e nesse caso, pode limitar o uso de determinada espécie na aplicação da técnica de fitorremediação. Os sintomas de toxidez por esse elemento, variam desde murcha e necrose foliar até o comprometimento de processos essenciais à manutenção da vida do vegetal, como as trocas gasosas (Gusman et al., 2013), a divisão celular (Dho et al., 2010), a biossíntese de clorofilas (Li et al., 2006) e culmina em morte celular (Sharma, 2012a).

As espécies químicas mais comuns de As em ambientes aquáticos são o arsenato (As^{V}) e o arsenito (As^{III}) (Farias et al., 2012). Estas, também são consideradas as mais tóxicas, principalmente a forma trivalente (Zhang et al., 2013). A toxicidade do As^{III} está relacionada, principalmente, com a sua elevada afinidade por grupos sulfidrilas dos aminoácidos cisteína de biomoléculas. A ligação do As^{III} a esses resíduos rompe a estrutura das proteínas e a interação entre elas (Tripathy et al., 2007).

O As^{III} também promove o aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a inibição da atividade catalítica de diversas enzimas, causando estresse oxidativo (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002; Aposhian e Aposhian, 2006; Sharma et al., 2012a). A geração direta de ROS pelo As pode ocorrer durante a conversão do As^{V} para As^{III} , ou pela metilação de espécies inorgânicas de As (Hartley-Whitaker et al., 2001; Mascher et al., 2002; Srivastava et al., 2005). Indiretamente, o As pode promover o aumento na concentração de ROS por meio da inativação de moléculas antioxidativas ao se ligar aos seus grupos sulfidrilas (Singh et al., 2007; Flora, 2011).

As ROS são moléculas que possuem elétrons desemparelhados e por isso, são altamente reativas causando a peroxidação de lipídios (Verma e Dubey, 2003), danos ao DNA (Meriga et al., 2004), oxidação de proteínas e inibição enzimática (Mishra et al., 2011; Srivastava e Dubey, 2011). Por essas razões, seus níveis na planta são regulados

por rigorosos mecanismos de defesa antioxidativos, que podem ser enzimáticos e não enzimáticos (Cao et al., 2004; Sharma e Dubey, 2007).

Dentre os compostos antioxidativos não enzimáticos, o principal é a glutathiona (GSH). Esse metabólito pode ser encontrado na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG) e a razão GSH/GSSG é um indicativo do equilíbrio redox celular, que está envolvido na percepção e sinalização de ROS (Foyer e Noctor, 2005). A GSH desempenha importantes funções no sistema de defesa antioxidativo das plantas, sendo considerada uma molécula marcadora de estresses (Sharma, 2012b). Eltayeb et al. (2010) verificaram que níveis mais elevados de GSH em batata, resultaram em aumento na proteção contra danos oxidativos, sob diferentes condições de estresses ambientais.

A GSH desempenha também um papel fundamental na tolerância de plantas aos metais tóxicos, pelo controle direto nos níveis de H_2O_2 e também por atuar como substrato para a síntese de PCs e de enzimas envolvidas na desintoxicação desses poluentes nas células (Yadav, 2010; Noctor et al., 2012; Zagorchev et al., 2013).

O sistema de defesa antioxidativo enzimático compreende várias enzimas, dentre as principais, temos a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX), a redutase da glutathiona (GR), a peroxidase da glutathiona (GPX) (Syta et al., 2013) e a sulfotransferase da glutathiona (GST). Estas enzimas operam em diferentes compartimentos subcelulares, mas atuam em conjunto em células sob estresse oxidativo (Sharma, 2012b).

A SOD é uma enzima que dismuta o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fridovich, 1995), sendo considerada fundamental na defesa contra o estresse oxidativo em organismos aeróbicos, incluindo as plantas (Gupta et al., 1993; Scandalios, 1993). Aumentos na atividade da SOD têm sido observados em plantas expostas a diferentes tipos de estresses ambientais, sendo correlacionados com a tolerância a seca e elementos tóxicos, como o As^{III} , por exemplo (Sharma e Dubey, 2005; Zaefyzadeh et al., 2009; Mishra et al., 2011).

A CAT possui elevada especificidade pelo H_2O_2 , sendo bastante eficiente na eliminação dessa ROS em condições de estresses ambientais (Sharma, 2012b). Porém, dependendo da intensidade, duração e do tipo de estresse, a atividade dessa enzima pode apresentar reforço ou esgotamento (Moussa e Abdel-Aziz, 2008; Han et al., 2009). Avaliando o papel antioxidativo da CAT, análises em tabaco deficiente nessa enzima revelaram aumento na susceptibilidade das plantas aos estresses salino e luminoso (Willekens et al., 1997), enquanto a superexpressão de um gene da CAT nessa mesma

espécie, aumentou a sua tolerância ao estresse oxidativo induzido pelo cádmio (Guan et al., 2009).

A geração de ROS nos cloroplastos pode afetar algumas enzimas do Ciclo de Calvin (Tanaka et al., 1982) e devido à ausência da CAT nessas organelas, a planta detoxifica o H_2O_2 por atuação de enzimas peroxidases, principalmente através do ciclo ascorbato-glutationa (AsA-GSH). O funcionamento desse ciclo desempenha um importante papel no combate ao estresse oxidativo em plantas, induzido por diferentes condições ambientais adversas (Pallanca e Smirnov, 2000; Sharma e Dubey, 2005).

A enzima APX é um componente central do ciclo AsA-GSH, onde utiliza duas moléculas de AsA para reduzir o H_2O_2 , gerando duas moléculas de monodesidroascorbato nessa reação (Noctor e Foyer, 1998; Sharma e Dubey, 2004). Diferentes isoformas de APX estão amplamente distribuídas em células vegetais e atuam de maneira eficiente na eliminação do H_2O_2 em condições estressantes (Wang et al., 1999). Diversos trabalhos relatam o aumento na atividade da APX em resposta a estresses abióticos como a seca (Boo e Jung, 1999; Sharma e Dubey, 2005), a salinidade (Hefny e Abdel-Kader, 2009), a radiação UV (Han et al., 2009) e a toxicidade de metais (Sharma e Dubey, 2007; Maheshwari e Dubey, 2009).

Ao atuar como um agente antioxidativo em ciclos de oxidação-redução, tanto enzimáticos, quanto não enzimáticos, a GSH é oxidada para GSSG. A GR é uma enzima dependente de NADPH que catalisa a redução da GSSG para GSH, mantendo uma alta razão celular GSH/GSSG (Sharma, 2012b). Alguns autores têm relatado aumento na atividade da GR em plantas sob estresse por arsênio e metais tóxicos (Sharma e Dubey, 2007; Maheshwari e Dubey, 2009; Shri et al., 2009), e ainda, maior tolerância ao estresse oxidativo (Aono et al., 1993; Foyer et al., 1995).

As enzimas GPX e GST desempenham importante papel na detoxificação celular, utilizando a GSH como substrato para suas atividades. A GPX atua degradando o H_2O_2 , gerando a GSSG por meio dessa reação (Sharma, 2012b). A GST é uma enzima, cuja atividade é induzida por metais tóxicos e por estresse oxidativo, sendo sua principal função catalítica, a conjugação da GSH com xenobióticos, resultando na desintoxicação de substâncias citotóxicas (Dixon et al., 2008; Ghelfi et al., 2011).

Diante do que foi exposto, podemos considerar que a contaminação da água com As^{III} , representa uma potencial ameaça para todas as formas de vida. Nesse sentido, a busca por alternativas efetivas e menos impactantes para diminuir a concentração desse elemento em ambientes aquáticos, possui grande importância para a saúde das populações. A capacidade que o As^{III} possui de causar estresse oxidativo pode ser um

dos fatores que limitam a utilização de determinada espécie de planta na fitorremediação de áreas contaminadas. Dessa forma, estudos que avaliem os mecanismos antioxidativos de *S. molesta* em resposta ao As^{III}, poderão fornecer informações acerca da tolerância e do potencial dessa espécie como fitorremediadora desse poluente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do As^{III} em parâmetros indicativos de estresse oxidativo e no metabolismo antioxidativo enzimático e não enzimático de *S. molesta*.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a absorção de As por *S. molesta* e os efeitos tóxicos desse elemento na sintomatologia visual e no crescimento das plantas;

2. Avaliar os teores de ânion superóxido (O₂⁻) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), os danos em membranas biológicas e a atividade das principais enzimas antioxidativas em *S. molesta* submetida ao As^{III}.

3. Caracterizar o metabolismo da glutathione em *S. molesta* na presença do As^{III}.

3. METODOLOGIAS

3.1. Obtenção das plantas, aclimação e aplicação dos tratamentos

Para todos os ensaios, indivíduos de *Salvinia molesta* D. S. Mitchell foram coletadas no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. As plantas foram mantidas em recipientes contendo solução nutritiva de Clark ¼ força iônica e pH 6,5 (Clark, 1975), permanecendo sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), irradiância (230 μmol m⁻² s⁻¹) e fotoperíodo luminoso de 16 h em sala de crescimento, durante sete dias para aclimação.

Cada unidade experimental consistiu de 4g de massa fresca de plantas em vasos com 0,5 L de solução nutritiva de Clark ¼ força, pH 6,5, contendo ou não As nas concentrações de 0 (controle), 5, 10 e 20 μM, fornecido na forma de arsenito de sódio (NaAsO₂). Foram utilizadas plantas uniformes, quanto ao tamanho das folhas flutuantes

e das folhas submersas em todos os ensaios. A exposição aos tratamentos durou 24 h ou 96 h, dependendo da análise a ser realizada.

3.2. Absorção de As e efeitos no crescimento de *S. molesta*

Para avaliar a absorção de As e seus efeitos sobre o crescimento de *S. molesta*, os tratamentos foram impostos por um período de quatro dias (96 h). Após esse período, as plantas foram lavadas com água destilada e separadas em folhas flutuantes e folhas submersas. Essas amostras foram mantidas em estufa convencional a 80°C até a obtenção do peso seco constante. O material seco foi utilizado na determinação do teor de arsênio e da taxa de crescimento relativo.

3.2.1. Determinação do teor de As e fator de translocação (FT)

Amostras de peso conhecido de material vegetal seco, foram submetidas à mineralização úmida com 3 mL de uma mistura nítrico-perclórica 2:1, à temperatura de 100-120 °C para evitar a volatilização do As, até a completa oxidação da matéria orgânica (Marin et al., 1993). Em seguida, as soluções foram diluídas em 10 mL de água desionizada e utilizadas na análise do teor de As por meio de espectrofotometria de emissão em plasma (ICP – OPTIMA 8300, Perkin Elmer).

O fator de translocação (FT) foi calculado através da equação: $FT = C_F/C_R$, em que: C_F = Concentração de As nas folhas flutuantes, em $\mu\text{g g}^{-1}$ MS; C_R = Concentração de As nas folhas submersas, em $\mu\text{g g}^{-1}$ MS.

3.2.2. Determinação da taxa de crescimento relativo (TCR)

A taxa de crescimento relativo das plantas foi calculada utilizando-se a equação proposta por Hunt (1978): $TCR = (\ln_{MS1} - \ln_{MS0}) \times 1000 / (t_1 - t_0)$ em que: TCR = taxa de crescimento relativo, em termos de massa seca (MS), no período experimental ($\text{mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$); \ln_{MS1} e \ln_{MS0} = logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente; $t_1 - t_0$ = duração do experimento (em dias).

3.3. Sintomatologia visual

O registro fotográfico da sintomatologia visual das plantas foi realizado utilizando uma câmera digital (S850, Samsung), após 24, 48 e 96 h de exposição aos tratamentos.

3.4. Avaliação da concentração de pigmentos cloroplastídicos, parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo antioxidativo

Para avaliar a concentração de pigmentos cloroplastídicos, o teor de espécies reativas de oxigênio, os danos em membranas celulares e o metabolismo antioxidativo de *S. molesta* em resposta ao As^{III}, as plantas foram submetidas aos tratamentos por 24 horas. Após esse período, foram lavadas com água destilada e separadas em folhas flutuantes e folhas submersas.

Amostras frescas desses órgãos foram utilizadas para as análises de pigmentos cloroplastídicos, extravasamento de eletrólitos e teor de O₂⁻. Para a determinação da peroxidação de lipídios, teor de H₂O₂, teor de glutathiona total e avaliação de todas as atividades enzimáticas, amostras de folhas flutuantes e de folhas submersas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, seguidas de armazenamento em freezer à -80°C até o momento das análises.

3.5. Determinação da concentração de pigmentos cloroplastídicos

Para a determinação da concentração dos pigmentos cloroplastídicos, quatro discos de folhas flutuantes de 0,6 cm de diâmetro foram imersos em 5 mL do solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO), saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃). Após 24 horas, realizaram-se leituras da absorvância do DMSO em espectrofotômetro UV-visível (Hitachi, modelo U-5100) nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm, para determinação da clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, respectivamente. As concentrações dos pigmentos foram calculadas de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994) e os resultados expressos em µg cm⁻².

3.6. Determinação do teor de espécies reativas de oxigênio

Para determinar o teor de O₂⁻, amostras de 50 mg de folhas flutuantes e de folhas submersas foram maceradas em meio de extração, constituído de sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 100 µM, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) 20 µM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). A reação foi iniciada pela introdução de 100 µL de epinefrina 25,2 mM em ácido clorídrico (HCl) 0,1N e as amostras foram mantidas a 28°C, sob agitação constante por 5 minutos. A leitura da absorvância foi realizada a 480 nm durante 5 minutos (Misra e Fridovich, 1971; Boveris et al., 2002) em espectrofotômetro UV-visível (Varian, modelo Cary 100). A produção de O₂⁻ foi avaliada pela determinação do adenocromo acumulado, utilizando-se o coeficiente de absorvância molar de 4,0 x 10³

$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Boveris et al., 2002).

Para a determinação do teor de H_2O_2 , amostras de 0,2 g de folhas flutuantes e de folhas submersas foram maceradas em meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5; contendo hidroxilamina 1,0 mM, seguidas de centrifugação a 10.000 xg por 15 minutos a 4°C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 50 μL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo sulfato de amônio e ferro (II) 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000).

Após 30 minutos no escuro, determinou-se a absorvância das amostras a 560 nm em espectrofotômetro UV-visível (Hitachi, modelo U-5100). As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 .

3.7. Avaliação dos danos em membranas celulares

3.7.1. Determinação da peroxidação de lipídios

A intensidade da peroxidação de lipídios foi estimada pela concentração de malonaldeído (MDA), por meio de teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Heath e Packer (1968). Amostras de 0,16 g de folhas flutuantes e de folhas submersas foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas 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. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada em um meio de reação com 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v).

Os tubos contendo as amostras e o meio de reação foram fechados e incubados em banho-maria por 95° C, durante 25 minutos. Decorrido esse tempo, a reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 xg por mais 10 minutos a 4 °C. A absorvância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro UV-visível (Hitachi, modelo U-5100) no comprimento de onda de 532 nm. A absorvância inespecífica foi obtida em 600 e 400 nm e subtraídas das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hodges et al., 1999), sendo os resultados expressos em nmol g^{-1} de massa fresca.

3.7.2. Determinação do extravasamento de eletrólitos

A avaliação do extravasamento de eletrólitos foi realizada segundo adaptação das metodologias descritas por Vasquez-Tello et al. (1990) e Pimentel et al. (2002). Aproximadamente 0,2 g de folhas flutuantes e de folhas submersas de *S. molesta* foram coletadas, lavadas por 3 vezes em água desionizada e depois transferidas para frascos de vidro contendo 10 mL de água purificada por osmose reversa, onde permaneceram imersas por 06 horas.

Após este período mediu-se a condutividade livre ($CL, \mu S/cm$), utilizando-se um condutivímetro de bancada (Tecnal, modelo Tec - 4MP). Posteriormente, os mesmos frascos foram colocados em estufa a 100 °C por 1 hora e após resfriamento determinou-se a condutividade total das amostras ($CT, \mu S/cm$). O sensor do condutivímetro foi lavado com água desionizada entre cada leitura. Com os resultados obtidos, calculou-se a taxa de liberação de eletrólitos, dada em porcentagem, por meio da seguinte fórmula:

$$TLE = \frac{(CL)}{(CT)} \times 100$$

Onde:

TLE= Taxa de liberação de eletrólitos;

CL = condutividade livre;

CT = condutividade total.

3.8. Avaliação das enzimas antioxidativas

3.8.1. Obtenção dos extratos enzimáticos

Amostras de 0,3 g de folhas flutuantes e de folhas submersas foram maceradas em nitrogênio líquido, após foram adicionados 2,0 mL do meio de extração. Para as enzimas CAT, POX e SOD o meio de extração era constituído de tampão fosfato de potássio 0,10 M, pH 6,8; EDTA 0,10 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1,0 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Para a APX, o meio de extração continha tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0; ascorbato 1,0 mM e EDTA 1,0 mM (Nakano e Asada, 1981). O extrato obtido após a maceração foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 12.000 xg , durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado na avaliação das atividades enzimáticas, por meio de um espectrofotômetro UV-visível (Varian, modelo Cary 100).

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

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático a 4,95 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM¹, pH 7,8; contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,10 mM e riboflavina 2,0 µM. A reação foi conduzida à temperatura de 25 °C em uma câmara de reação, sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W.

Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971) e expressa em U SOD min⁻¹ g⁻¹ de massa fresca.

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

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 0,10 mL do extrato enzimático a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância pelo consumo de H₂O₂ no primeiro minuto de reação foi medido a 240 nm, em temperatura de 25 °C. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e expresso em µmol de H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

3.8.4. Determinação da atividade da peroxidase total (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da POX foi determinada pela adição de 0,10 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8; pirogallol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm e temperatura de 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em µmol de purpurogalina min⁻¹ g⁻¹ de massa fresca.

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

A atividade da APX foi determinada pela adição de 0,10 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de

potássio 50 mM, pH 6,0; ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1,0 mM (Nakano e Asada, 1981, modificado por Koshiha, 1993). O decréscimo na absorvância foi medido durante o primeiro minuto a 290 nm, em temperatura de 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano e Asada, 1981) e expressa em μmol de ácido ascórbico min⁻¹ mg⁻¹ de massa fresca.

3.9. Avaliação do metabolismo da glutathiona

3.9.1. Determinação do teor de glutathiona total (GSH + GSSG)

Amostras de 0,3 g de folhas flutuantes e de folhas submersas foram trituradas em nitrogênio líquido e maceradas em 2 mL de meio de extração constituído de HCl 0,10 M, contendo EDTA 1mM (Anderson, 1985). O extrato obtido foi filtrado através de quatro camadas de gaze e centrifugado a 12.000 *xg* por 15 minutos a 4 °C. Alíquotas de 200 μL do sobrenadante foram adicionadas a 200 μL de tampão fosfato de sódio 125 μM, contendo EDTA 6,3 mM, pH 7,5; 500 μL de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) 0,3 mM e 100 μL de DTNB [ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzóico)] 6,0 mM.

Após incubação por 5 minutos a 30 °C em banho-maria, foram adicionados 10 μL de redutase da glutathiona (50 U mL⁻¹) e medida a absorvância em 412 nm durante 1 minuto, utilizando um espectrofotômetro UV/visível (Varian, modelo Cary 100). O teor de glutathiona total foi determinado por meio de curva de calibração e os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ de massa fresca.

3.9.2. Determinação da atividade da sintetase da γ-glutamilcisteína (γ-GCS, EC 6.3.2.2)

Para determinar a atividade da γ-GCS, foram maceradas 0,3 g de folhas flutuantes e de folhas submersas em nitrogênio líquido e 2,0 mL do meio de extração, constituído de tampão Tris-HCl 0,10 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0. O extrato obtido foi filtrado através de quatro camadas de gaze, em seguida foi centrifugado a 30.000 *xg* e temperatura de 4 °C por 10 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para avaliação da atividade enzimática.

A atividade da enzima foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático a 0,9 mL de um meio de reação, contendo 10 μM de glutamato de sódio, 10 μM de L-aminobutirato, 2,0 μM de EDTA, 0,2 mg de BSA, 20 μM de MgCl₂, 5,0 μM do sal dissódico de ATP e 100 μM de tampão Tris-HCl, pH 8,2.

Essa mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e a reação foi paralisada pela adição de 100 µL de TCA 50 % (p/ v) (Rueggsegger e Brunold, 1992). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 *xg* por 10 minutos e o teor de fosfato inorgânico no sobrenadante foi determinado a 720 nm pelo método do fosfo-molibdato (Lindeman, 1958).

3.9.3. Determinação da atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7)

Amostras de 0,3 g de folhas flutuantes e de folhas submersas foram maceradas em nitrogênio líquido e 2 mL de meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 0,10 M, pH 7,0; EDTA 1,0 mM, ditioneitol (DTT) 2,0 mM, PMSF 1,0 mM e PVPV 1% (p/v). O extrato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 12.000 *xg* por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para avaliação da atividade enzimática.

A atividade da GR foi determinada pela adição de 100 µL de extrato enzimático a 0,9 mL de um meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 0,10 M, pH 7,5; EDTA 1,0 mM, glutatona oxidada (GSSG) 1,0 mM e NADPH 0,10 mM em tampão TRIS-HCl 0,5 mM, pH 7,5; segundo Carlberg e Mannervik (1985).

O decréscimo na absorvância foi medido durante o primeiro minuto da reação a 340 nm e temperatura de 30 °C, utilizando um espectrofotômetro UV/visível (Varian, modelo Cary 100). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Foyer e Halliwell, 1976) e os resultados foram expressos em nmol min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

3.9.4. Determinação da atividade da peroxidase da glutatona (GPX, EC 1.11.1.9)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de folhas flutuantes e de folhas submersas foram maceradas em nitrogênio líquido, juntamente com 2,0 mL de um meio de extração constituído de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,5, EDTA 1,0 mM e MgCl₂ 10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001). Esse extrato foi filtrado em quatro camadas de gaze, centrifugado a 4° C e 30.000 *xg* durante 10 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para avaliação da atividade enzimática.

A atividade da GPX foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0; EDTA 1,0 mM, cloreto de sódio 0,114 M, glutatona reduzida (GSH) 1,0 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutatona (Nagalakshmi e Prasad, 2001).

A variação na absorvância a 340 nm e à temperatura de 30 °C foi medido no primeiro minuto de reação, utilizando um espectrofotômetro UV/visível (Varian, modelo Cary 100). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Anderson e Davis, 2004) e os resultados foram expressos em nmol min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

3.9.5. Determinação da atividade da sulfotransferase da glutathiona (GST, EC 2.5.1.18)

Amostras de 0,3 g de folhas flutuantes e de folhas submersas foram maceradas em nitrogênio líquido juntamente com 2,0 mL de um meio de extração constituído de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8; EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM, PMSF 0,10 mM e PVPP 5 % (p/v) (Habig et al., 1974). O extrato obtido foi centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos, à temperatura de 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade da GST foi determinada após adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 0,20 M, pH 6,5; GSH 20 mM e 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,10 M (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O aumento na absorvância a 340 nm foi medido no primeiro minuto de reação em espectrofotômetro UV/visível (Varian, modelo Cary 100) à temperatura de 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em nmol min⁻¹ g⁻¹ massa fresca.

3.10. Delineamento experimental

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e 5 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 1999).

4. RESULTADOS

4.1. Teor de As absorvido e fator de translocação (FT)

O teor de As nas folhas flutuantes aumentou com o incremento do poluente, atingindo 104 µg g⁻¹ MS no tratamento com 20 µM de As^{III}. Nas folhas submersas, os

teores de As foram significativamente maiores do que aqueles observados nas folhas flutuantes. Entretanto, o maior teor de As foi determinado na concentração de 10 μM de As^{III} , decrescendo na concentração seguinte (Figura 1).

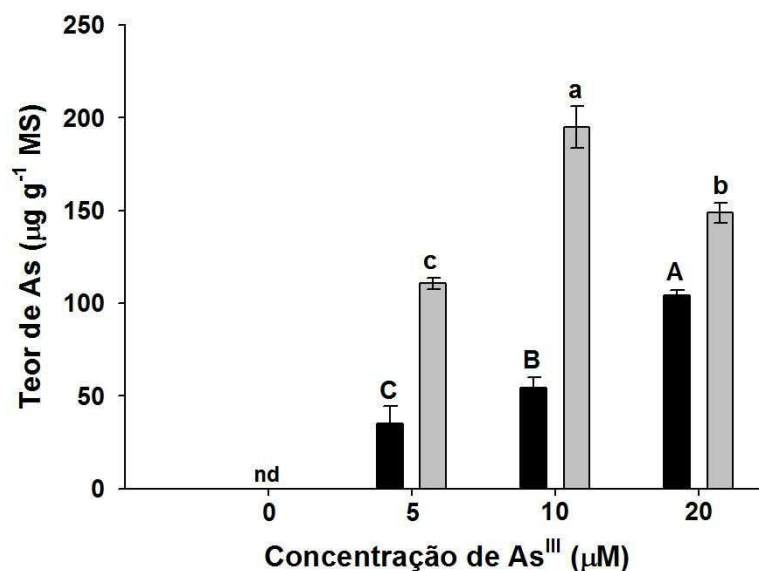


Figura 1. Teor de As em folhas flutuantes (■) e folhas submersas (▒) de *S. molesta* após quatro dias de exposição ao As^{III} . Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para folhas flutuantes e pela mesma letra minúscula para folhas submersas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.*nd= não detectado.

O fator de translocação (FT) do As em *S. molesta* variou de 0,27 a 0,69, indicando um baixo FT nessa espécie, principalmente nos tratamentos com as menores concentrações de As^{III} (Tabela 1).

Tabela 1. Fator de translocação em *S. molesta*, após quatro dias de exposição às diferentes concentrações de As^{III} .

Tratamentos (μM de As^{III})	Fator de translocação (FT)
Controle	-
5	0,32± 0,0629 b
10	0,27± 0,0159 b
20	0,69± 0,0180 a

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

4.2. Taxa de Crescimento Relativo (TCR)

A exposição de *S. molesta* ao As^{III} por 4 dias afetou negativamente o crescimento das plantas. A TCR nas folhas flutuantes não variou na concentração de $5\mu\text{M}$, porém, foi 34% e 60% menor do que o controle, na presença de 10 e $20\mu\text{M}$ de As^{III} , respectivamente. O crescimento das folhas submersas foi afetado em todos os tratamentos com As^{III} , resultando em valores negativos nas duas maiores concentrações do poluente (Figura 2).

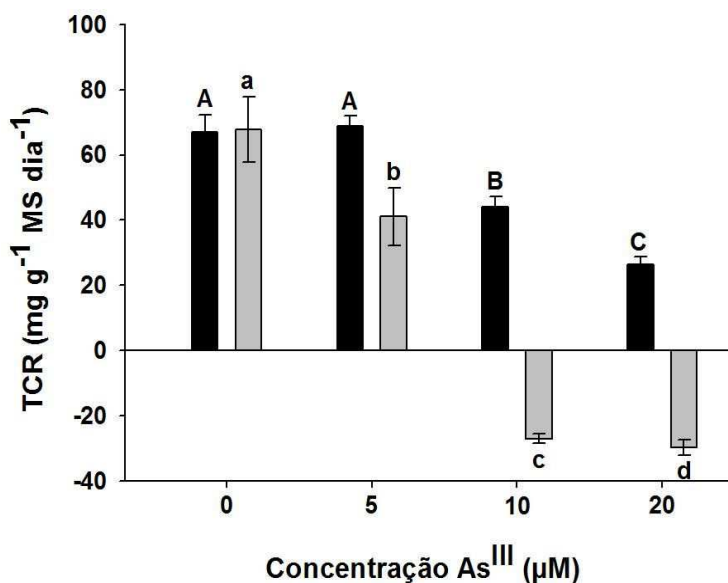


Figura 2. Taxa de crescimento relativo (TCR) em folhas flutuantes (■) e folhas submersas (■) de *S. molesta* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após quatro dias. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para folhas flutuantes e pela mesma letra minúscula para folhas submersas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3. Sintomatologia visual

A toxidez do As^{III} causou danos às plantas que variaram de acordo com a concentração e com o tempo de exposição aos tratamentos. Assim, os danos mais intensos foram observados após quatro dias de tratamento na presença de 10 e $20\mu\text{M}$ de As^{III} . Nessas condições, as folhas flutuantes apresentaram cloroses, enquanto as folhas submersas atrofiaram e adquiriram um aspecto necrótico (Figura 3).

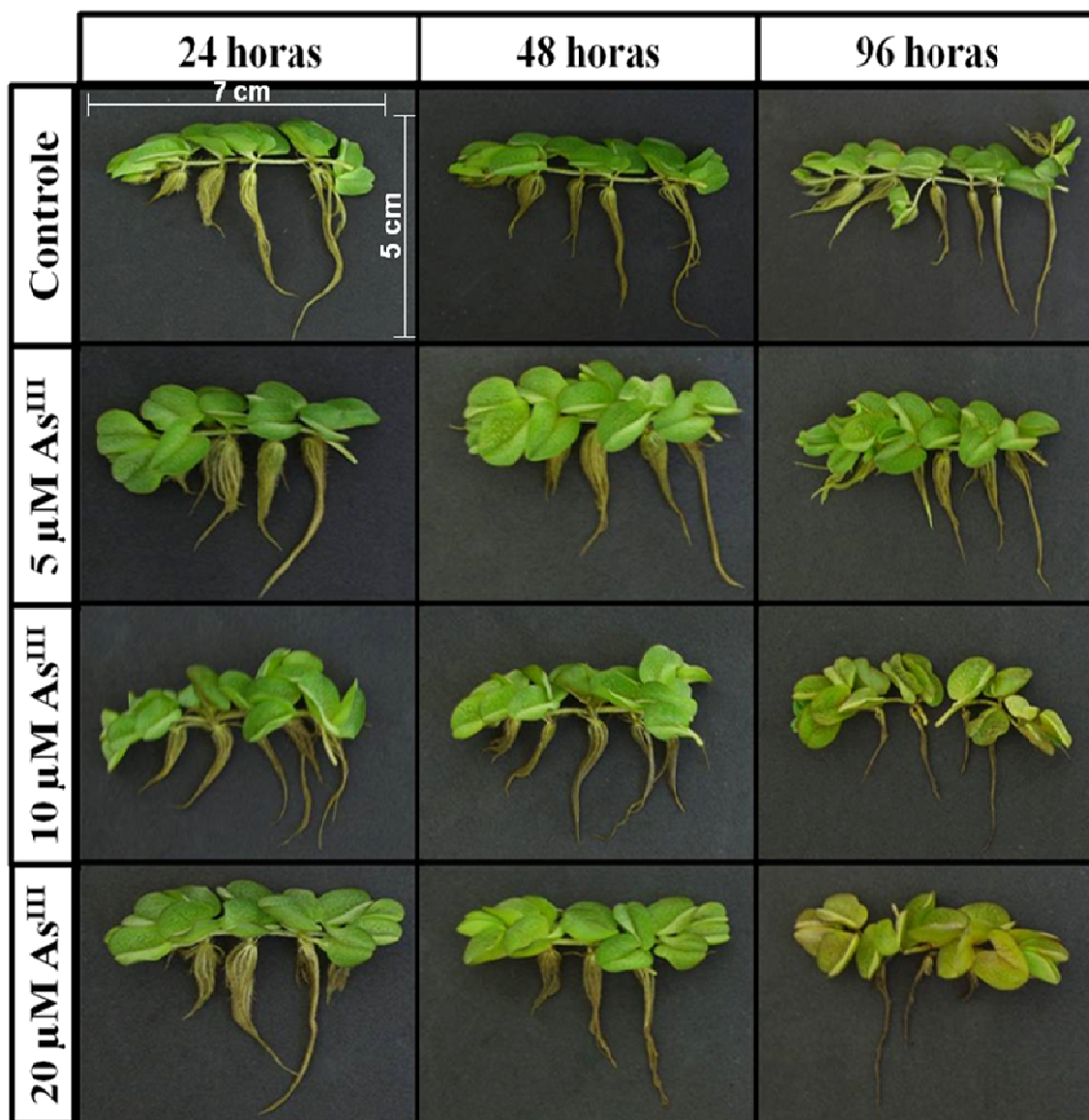


Figura 3. Sintomatologia visual de folhas e raízes de *S. molesta* expostas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24, 48 e 96 horas.

4.4. Teor de espécies reativas de oxigênio

O teor de ânion superóxido (O_2^-) aumentou significativamente nas folhas flutuantes de *S. molesta* expostas ao As^{III} , no entanto, não variou entre as diferentes concentrações do poluente. Nas folhas submersas, observou-se aumento no teor de O_2^- , conforme incremento na concentração de As^{III} (Figura 4A).

O teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas flutuantes aumentou após exposição das plantas à maior concentração de As^{III} . Por outro lado, nesta mesma concentração nas folhas submersas, houve redução no teor de H_2O_2 (Figura 4B).

O teor de ROS foi maior nas folhas flutuantes do que nas submersas, em todos os tratamentos avaliados.

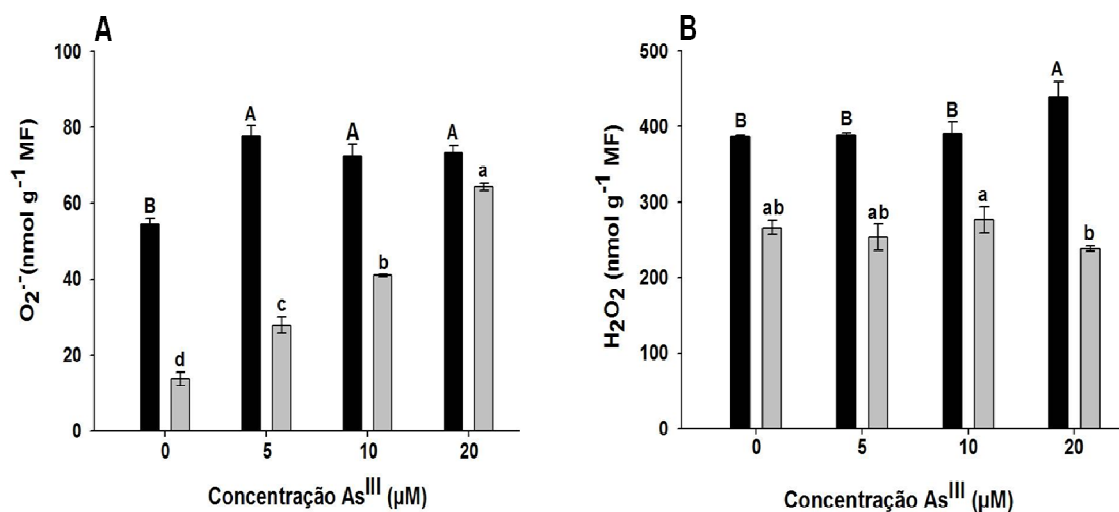


Figura 4. Teor de ânion superóxido (A) e de peróxido de hidrogênio (B) em folhas flutuantes (■) e folhas submersas (■) de *S. molesta* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para folhas flutuantes e pela mesma letra minúscula para folhas submersas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.5. Concentração de pigmentos cloroplastídicos

As concentrações de clorofila *b* e carotenoides não apresentaram alterações significativas após exposição aos tratamentos com As^{III} . Entretanto, a concentração de clorofila *a* aumentou nas plantas expostas a 5 μM do poluente, enquanto nas demais concentrações de As^{III} , não diferiu do controle (Figura 5).

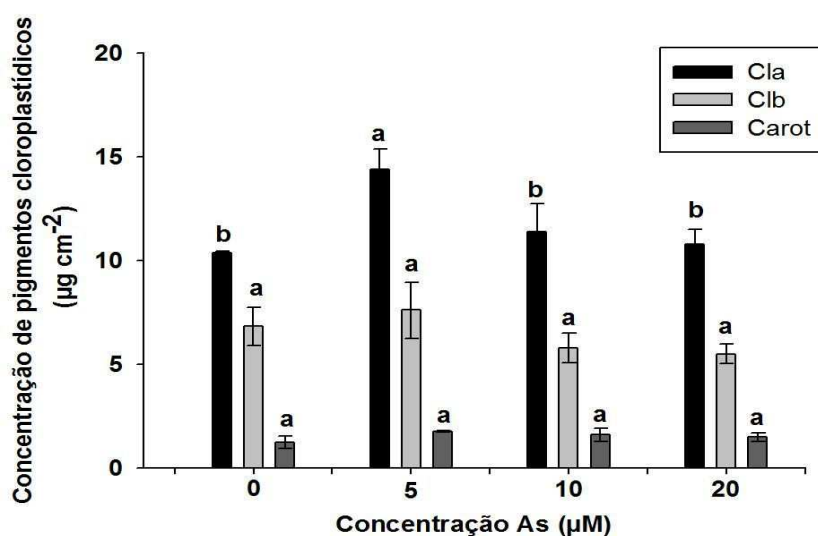


Figura 5. Concentração de pigmentos cloroplastídicos em folhas flutuantes de *S. molesta* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.6. Integridade de membranas celulares

A concentração de malonaldeído (MDA) nas folhas flutuantes de *S. molesta* aumentou apenas nas plantas expostas a 10 μM de As^{III} . Nas folhas submersas, houve aumento na concentração de MDA, conforme incremento nos tratamentos como metaloide (Figura 6A). Independente do tratamento, a concentração de MDA foi sempre maior nas folhas flutuantes.

Outra forma de avaliar os danos em membranas celulares é por meio da quantificação do extravasamento de eletrólitos. Os resultados dessa análise não demonstraram alterações significativas na permeabilidade de membranas nas folhas flutuantes de *S. molesta*. Já nas folhas submersas, houve aumento de 142% e de 198% no extravasamento de eletrólitos em plantas expostas a 10 e 20 μM de As^{III} , respectivamente (Figura 6B).

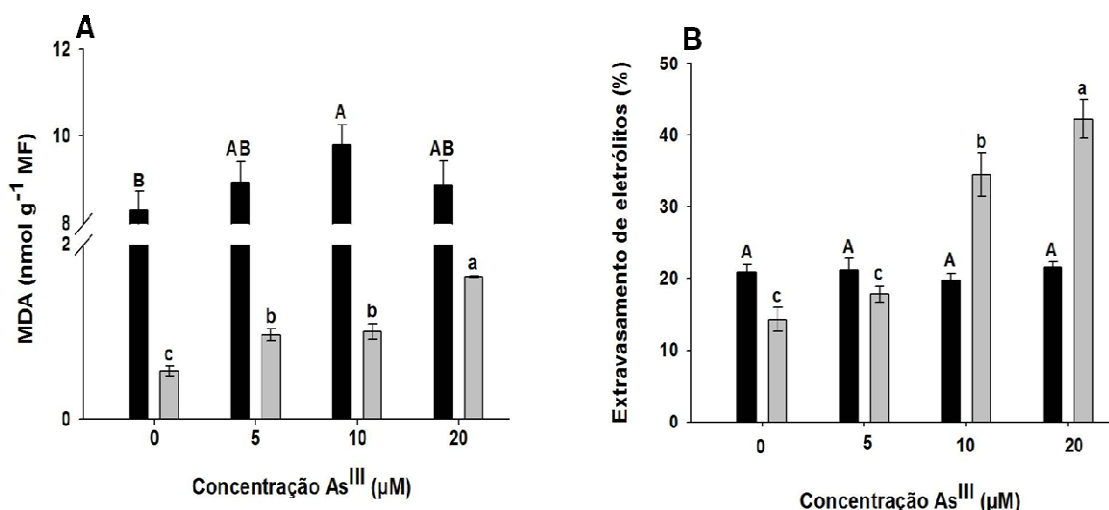


Figura 6. Concentração de malonaldeído (A) e Extravasamento de eletrólitos (B) em folhas flutuantes (■) e folhas submersas (▒) de *S. molesta* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para folhas flutuantes e pela mesma letra minúscula para folhas submersas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.7. Atividade das enzimas antioxidativas: dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase total (POX) e peroxidase do ascorbato (APX)

A exposição ao As^{III} resultou em aumento na atividade da SOD nas folhas flutuantes de *S. molesta* em todos os tratamentos com o poluente. Nas folhas submersas, somente no tratamento com 10 μM a atividade dessa enzima foi maior do que no controle. Na presença de 20 μM de As^{III} , observou-se, para ambos os órgãos, menor atividade da SOD em relação aos demais tratamentos com este metaloide, sendo esse

resultado mais evidente nas folhas submersas, onde ficou abaixo do controle (Figura 7A).

A maior atividade da CAT nas folhas flutuantes e submersas foi observada após exposição das plantas a 5 μM de As^{III} . Os demais tratamentos não demonstraram efeitos significativos na atividade dessa enzima nas folhas flutuantes, enquanto nas folhas submersas a atividade da CAT permaneceu superior ao controle no tratamento com 10 μM , porém não diferiu em 20 μM de As^{III} (Figura 7B).

Verificou-se aumento na atividade da POX nas folhas flutuantes de *S. molesta*, apenas na maior concentração de As^{III} , não variando entre os demais tratamentos. Nas folhas submersas, aumentos na atividade da POX de 20% e 61% foram observados nas plantas expostas a 10 e 20 μM de As^{III} , respectivamente (Figura 7C).

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) nas folhas flutuantes de *S. molesta* aumentou nas concentrações de 5 μM e 10 μM de As^{III} , porém, não diferiu do controle em 20 μM . Já nas folhas submersas, observou-se aumento significativo na atividade da APX em todos os tratamentos com o metaloide (Figura 7D).

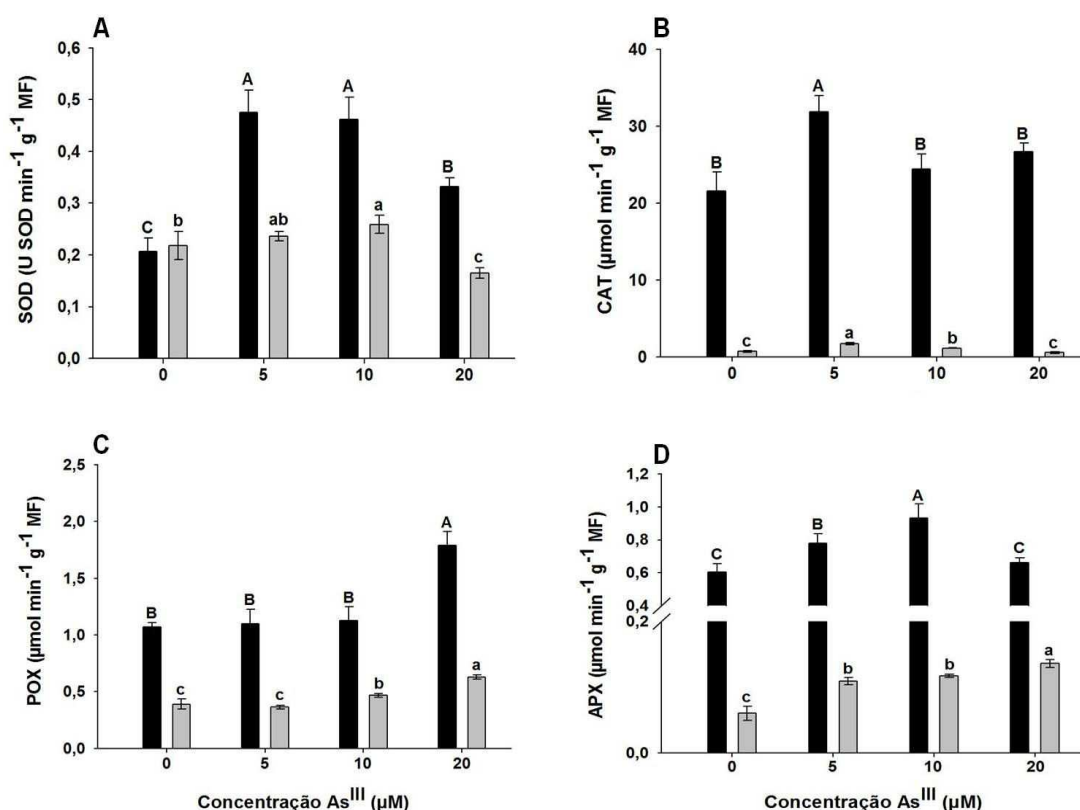


Figura 7. Atividade da dismutase do superóxido (A), catalase (B), peroxidase total (C) e peroxidase do ascorbato (D) em folhas flutuantes (■) e folhas submersas (■) de *S. molesta* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para folhas flutuantes e pela mesma letra minúscula para folhas submersas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.8. Metabolismo da glutatona

4.8.1 Teor de glutatona total

O teor de glutatona total (GSH+GSSG) nas folhas flutuantes e submersas de *S. molesta* aumentou conforme o incremento na concentração do poluente em solução. No tratamento com 20 μM de As^{III} , o teor desse metabólito nas folhas foi aproximadamente, duas vezes maior do que no controle, enquanto nas raízes, esse aumento foi superior a três vezes (Figura 8). Independente do tratamento, o teor de glutatona total foi sempre maior nas folhas flutuantes.

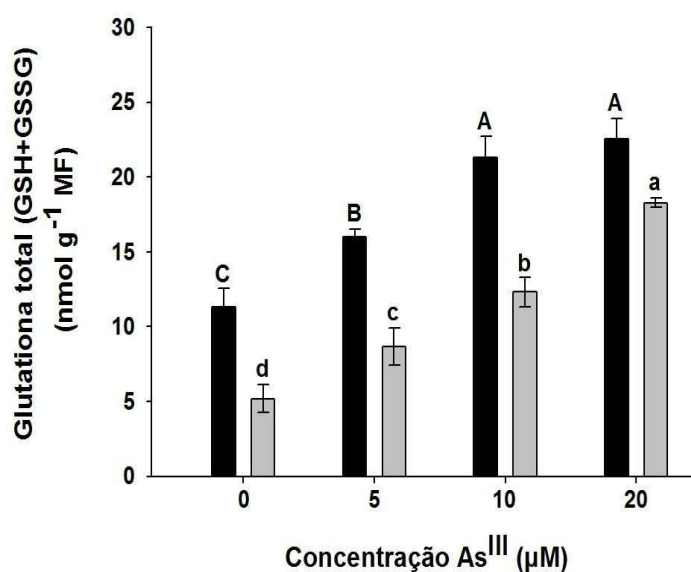


Figura 8. Teor de glutatona total em folhas flutuantes (■) e folhas submersas (■) de *S. molesta* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para folhas flutuantes e pela mesma letra minúscula para folhas submersas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.8.2. Enzimas do metabolismo da glutatona: sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS), redutase da glutatona (GR), peroxidase da glutatona (GPX) e sulfotransferase da glutatona (GST)

A atividade da γ -GCS nas folhas flutuantes de *S. molesta*, somente aumentou em plantas expostas à maior concentração de As^{III} . Nas folhas submersas, incrementos foram registrados em todos os tratamentos com o poluente, sendo a maior atividade dessa enzima observada em 20 μM , enquanto não diferiu entre os tratamentos com 5 e 10 μM de As^{III} (Figura 9A).

As diferentes concentrações de As^{III} não afetaram a atividade da enzima GR nas folhas flutuantes. Por outro lado, a atividade enzimática nas folhas submersas aumentou em todos os tratamentos com o metaloide (Figura 9B).

A atividade da GPX em folhas flutuantes de *S. molesta*, apresentou incrementos nas concentrações de 10 e 20 μM As^{III} . De modo oposto, essas mesmas concentrações do metaloide resultaram nos respectivos decréscimos de 24% e 40% na atividade da GPX nas folhas submersas (Figura 9C).

Todos os tratamentos com As^{III} induziram aumento na atividade da GST nas folhas flutuantes e nas submersas de *S. molesta*, em relação ao controle. No entanto, a atividade enzimática nas folhas flutuantes não foi modificada de maneira significativa, entre os tratamentos com 5, 10 e 20 μM do metaloide. Em folhas submersas, a atividade da GST somente diferiu entre os tratamentos com 5 e 20 μM de As^{III} (Figura 9D).

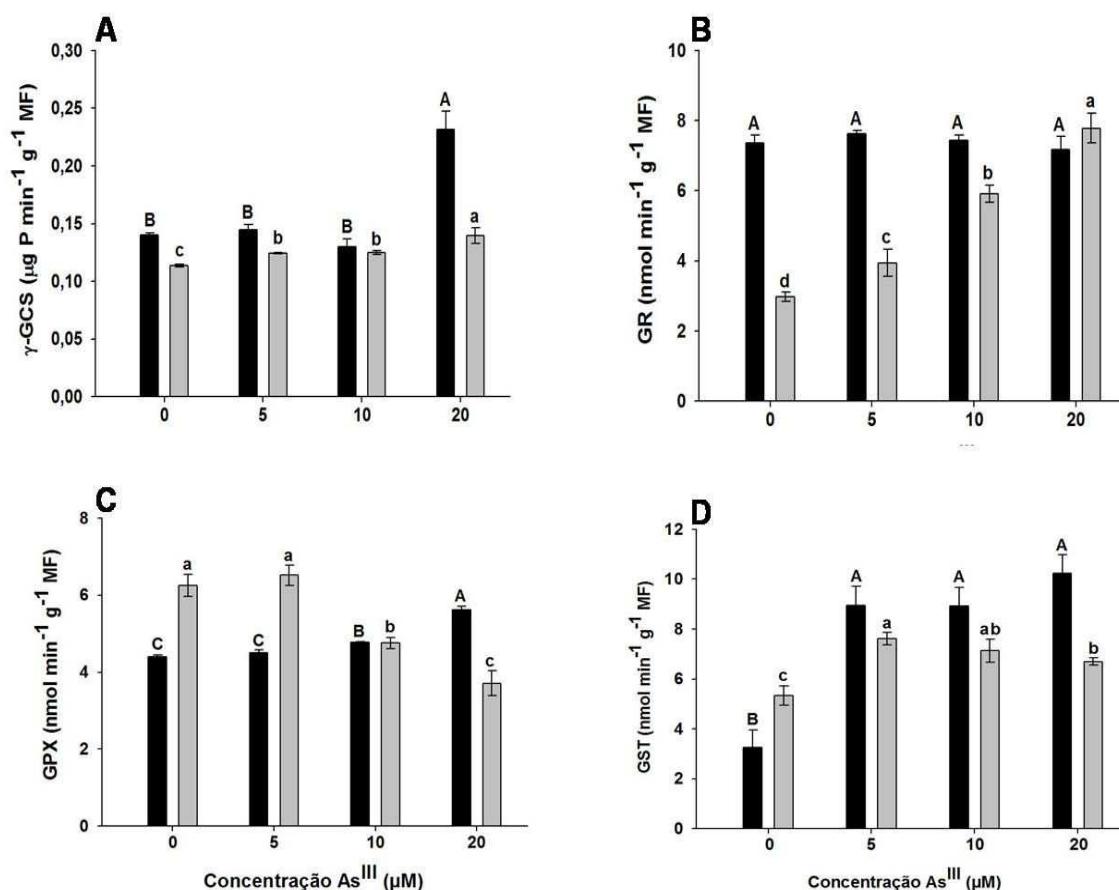


Figura 9. Atividade das enzimas: sintetase da γ -glutamilcisteína (A), redutase da glutatona (B), peroxidase da glutatona (C) e sulfotransferase da glutatona (D) em folhas flutuantes (■) e folhas submersas (■) de *S. molesta* submetidas às diferentes concentrações de As^{III} , após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para folhas flutuantes e pela mesma letra minúscula para folhas submersas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5. Discussão

As plantas de *S. molesta* acumularam mais As nas folhas submersas do que nas folhas flutuantes e apresentaram um baixo fator de translocação (FT). Exceto em espécies hiperacumuladoras, a translocação do As é restrita na maioria das plantas, favorecendo seu acúmulo nas raízes em detrimento da parte aérea, inclusive em macrófitas (Zhao et al., 2009; Rahman e Hasegawa, 2011). Isso se deve à formação de complexos entre o As^{III} e fitoquelatinas (PCs) nas células das raízes que, posteriormente, são sequestrados nos vacúolos, diminuindo sua reatividade e funcionando como um mecanismo de defesa (Liu et al., 2010; LeBlanc et al., 2013).

Apesar de *S. molesta* não ter apresentado características consideradas determinantes na capacidade de fitorremediação de As, como um acúmulo do elemento superior a $1000 \mu g g^{-1}$ MS e um $FT > 1$ (Xie et al., 2009; Lorestani et al., 2011), sua utilização para esse fim não deve ser descartada. Essas características foram definidas para plantas terrestres e hiperacumuladoras de As, não devendo as mesmas serem utilizadas para definir o potencial de fitorremediação de uma planta aquática. Nessas espécies, diferenças anatômicas e fisiológicas modificam as relações entre a planta, o ambiente e o poluente, onde além da absorção, outros processos, como a adsorção também são importantes na função fitorremediadora da planta (Rai e Tripathi, 2011; Olguín e Sánchez-Galván, 2012).

De modo geral, incrementos na concentração de As em solução, resulta em maior acúmulo desse metaloide pelas plantas. Entretanto, essa tendência não foi observada nas folhas submersas de *S. molesta*. Esse resultado pode ser explicado pelo transporte de As^{III} para o meio externo, num mecanismo conhecido como efluxo. Proteínas aquaporinas do tipo NIPs, capazes de transportar o As^{III} em algumas espécies de plantas, realizam transporte bidirecional e poderiam contribuir para o efluxo de As^{III} do simplasto (Bienert et al., 2008; Isayenkov e Maathuis, 2008; Zhao et al., 2010b).

Além da possibilidade de efluxo, outro fator que pode ter contribuído de maneira mais significativa para esse resultado, teve origem na própria ação tóxica do As^{III} . De fato, a capacidade que esse poluente possui de se ligar a grupos sulfidrila de proteínas e gerar ROS, pode inativar aquaporinas e outros transportadores nas raízes, interferindo na sua própria absorção e de nutrientes (Hoffman e Schenk, 2011). Os danos visuais observados nas folhas submersas das plantas expostas à maior concentração de As^{III} , reforçam essa hipótese.

As cloroses e necroses observadas nas folhas flutuantes e submersas de *S. molesta* após 4 dias de exposição ao As, são sintomas visuais da toxidez desse metaloide, também já relatados para outras espécies de plantas, aquáticas e terrestres (Shaibur et al., 2006; Guimaraes et al., 2012; Khang et al., 2012). Cloroses podem resultar da peroxidação de lipídios das membranas dos cloroplastos, diminuindo assim os teores dos pigmentos fotossintetizantes (Li et al., 2006; Singh et al., 2006), ou ainda, de prejuízos na absorção de alguns nutrientes (Srivastava et al., 2007). As necroses originam da degradação de estruturas celulares em condições de estresse oxidativo, induzido pelo As (Talukdar e Talukdar, 2013).

Outra condição resultante da toxicidade do As em plantas é a inibição do crescimento (Gupta et al., 2008; Duquesnoy et al., 2010; Talukdar, 2011). Em *S. molesta*, esse efeito foi mais intenso nas folhas submersas, onde houve produção negativa de biomassa, provavelmente pelo maior acúmulo de As e pelo aumento no teor de ROS. Em conformidade com esse resultado, outras espécies de plantas também já apresentaram valores negativos na taxa de crescimento relativo, como consequência da exposição ao As^{III}. Nesses casos, essa condição decorreu do estresse oxidativo causado pelo poluente, onde houve a destruição de paredes e membranas celulares, causando necroses e perda de biomassa pelas plantas. (Srivastava et al., 2009; Ozturk et al., 2009; Khang et al., 2012). A capacidade que o As possui de inibir enzimas do Ciclo de Calvin contendo grupos tióis, causa redução na taxa fotossintética e também afeta diretamente o crescimento das plantas (Sharma, 2013).

Em *S. molesta*, o aumento nos níveis de O_2^- e H_2O_2 causado pelo As^{III}, estão de acordo com o registrado para outras espécies de plantas, como o arroz (Mishra et al., 2011) e a mostarda (Srivastava et al., 2013). Já é bem conhecido o fato de que a presença do As no meio celular pode gerar produtos intermediários, como as ROS (Sytar et al., 2013). Essas substâncias tóxicas e altamente reativas são normalmente produzidas pelas células, mas tendem a aumentar em situações que perturbem a homeostase celular, culminando em estresse oxidativo (Sharma et al., 2012a).

Nesse sentido, o aumento no teor de O_2^- em folhas submersas de *S. molesta*, acompanhado pelos incrementos na concentração de MDA e na porcentagem de extravasamento de eletrólitos nesses órgãos, indicam a ocorrência de estresse oxidativo induzido pelo As^{III}. Danos em membranas celulares também foram verificados nas plantas aquáticas *Nasturtium officinale* e *Ceratophyllum demersum*, decorrentes da exposição ao As (Mishra et al., 2008; Oztuk et al., 2010).

As membranas biológicas são consideradas o alvo primário das ROS durante situações de estresses, sendo a peroxidação de lipídios um marcador bioquímico do estresse oxidativo em plantas (Sytar et al., 2013). Esse processo de peroxidação resulta em aumento no extravasamento de eletrólitos e na quantidade de algumas substâncias intermediárias, como o malonaldeído (MDA) (Sharma, 2012a).

Conforme mencionado anteriormente, a ocorrência de danos em membranas de cloroplastos é um dos fatores responsáveis pela diminuição na concentração de pigmentos cloroplásticos em plantas sob estresse por As (Li et al., 2006). Em folhas flutuantes de *S. molesta*, os resultados da concentração de MDA e do extravasamento de eletrólitos, evidenciaram que houve manutenção na integridade de membranas nesses órgãos após 24 h de exposição ao As^{III}. Assim, tais resultados podem explicar a ausência de alterações negativas na concentração desses pigmentos nas plantas expostas aos tratamentos com o poluente por esse mesmo período de tempo. Resposta semelhante ao As^{III}, também foi observada em folhas de alface e de mostarda japonesa (Shaibur e Kawai 2009; Gusman et al., 2013).

Em alguns casos, a concentração de clorofilas pode até aumentar em plantas expostas a baixas concentrações de As, conforme verificado para clorofila *a* em *S. molesta*. De fato, essa mesma condição foi registrada em outras macrófitas, como *Spirodela polyrrhiza* (Seth et al., 2007) e *Lemna minor* (Duman et al., 2010). Esses autores consideraram o aumento dos pigmentos uma resposta adaptativa das plantas ao xenobiótico, ou ainda, resultante do chamado efeito hormese, quando baixas concentrações de substâncias tóxicas promovem efeitos estimulantes (Poschenrieder et al., 2013).

A manutenção das ROS em níveis celulares adequados é necessária para que estas não causem danos oxidativos, mas possam, inclusive, atuar como moléculas sinalizadoras de estresses (Neill et al., 2002; Sytar et al., 2013). Esse controle em células vegetais é realizado, primordialmente, pelas enzimas antioxidativas (Sharma, 2012b).

Para eliminar o O₂⁻ formado em consequência da exposição ao As, indução na atividade da SOD já foi relatada em milho (Requejo e Tena, 2005), fava (Lin et al., 2008), arroz (Singh et al 2009; Mishra et al., 2011) e *Arabidopsis thaliana* (Gupta et al., 2013). Essa mesma resposta foi observada em folhas flutuantes de *S. molesta*, porém, a atividade da SOD diminuiu nas folhas submersas das plantas expostas à maior concentração de As^{III}. Essa condição pode ter contribuído para o acúmulo de O₂⁻

verificado nas folhas submersas e conseqüentemente, nos danos em membranas nesses órgãos.

Embora o aumento na atividade da SOD seja a resposta mais comum ao As, alguns autores também já relataram redução na atividade desta enzima (Gupta et al., 2009; Duquesnoy et al., 2010). Segundo Gupta et al. (2009), essas discrepâncias podem estar relacionadas com os diferentes tempos de exposição, concentração de As e a espécie vegetal. A atividade da SOD produz o H_2O_2 , porém, apesar do aumento verificado na atividade da SOD em folhas flutuantes e submersas de *S. molesta*, para todos ou alguns dos tratamentos com o As^{III} , os teores dessa ROS foram pouco alterados em relação ao controle. Esses resultados indicam o funcionamento de mecanismos antioxidativos nessa planta, capazes de manter o H_2O_2 em níveis celulares adequados.

Atuando nesse sentido, a enzima CAT demonstrou aumento em sua atividade nas folhas flutuantes e submersas de *S. molesta*, nas concentrações mais baixas de As^{III} . Esse aumento pode ter contribuído para a manutenção dos níveis de H_2O_2 iguais ao do controle nesses tratamentos. Entretanto, a posterior diminuição na atividade da CAT para os níveis do controle, sugere que altas concentrações de As^{III} afetaram negativamente a atividade dessa enzima.

Respostas positivas na atividade da CAT em plantas sob estresse por As são comuns na literatura (Duquesnoy et al., 2010; Mishra et al., 2011; Gusman et al., 2013). Inclusive, a própria geração de ROS em plantas na presença de xenobióticos pode sinalizar para um aumento na expressão dos genes que codificam enzimas antioxidativas e dessa forma, atuar como uma resposta ao estresse (Romero-Puertas et al., 2007). Porém, a presença dessas ROS nas células também pode inibir essas enzimas. Segundo Dat et al. (2003), a CAT é sensível ao O_2^- e, dessa forma, aumento dos teores dessa molécula causados pelo As^{III} , pode ser o fator responsável pela diminuição na atividade dessa enzima em *S. molesta*.

De modo geral, a atividade das enzimas POX e APX, também envolvidas na eliminação do H_2O_2 , apresentaram incrementos em *S. molesta*, principalmente nas folhas submersas expostas às duas maiores concentrações de As^{III} . Isso sugere que essas enzimas são componentes importantes da tolerância ao estresse oxidativo nessas plantas. De fato, aumento na atividade da POX, em resposta ao estresse oxidativo causado por metais tóxicos já foi verificado em diferentes condições e espécies de plantas (Wang et al., 2004; Lamhamdi et al., 2011; Huang et al., 2012). Indução similar na atividade da APX em resposta ao As, também já foi registrada em *P. vitatta*

(Srivastava et al., 2005), em plantas de milho e alface (Duquesnoy et al., 2010; Gusman et al., 2013).

Segundo Mallick et al. (2011), enzimas de natureza mais global dentro da célula, distribuídas em praticamente todos os compartimentos celulares, como é o caso das peroxidases, mantêm elevados níveis dentro das células, sendo menos susceptíveis ao declínio em condições de estresse do que enzimas confinadas, como é o caso da CAT, encontrada apenas nos peroxissomos e mitocôndrias.

Considerados em conjunto, os resultados obtidos nas análises da atividade da SOD, CAT, POX e APX, indicam a atuação conjunta dessas enzimas no combate ao estresse oxidativo induzido pelo As^{III} em *S. molesta*. Esse fato ficou mais evidente nas folhas flutuantes, onde os danos em membranas celulares foram menores do que aqueles em folhas submersas. O menor acúmulo de As nas folhas flutuantes, associado ao fato da atividade enzimática absoluta ter sido sempre mais elevada nesses órgãos, podem ter sido a causa desses resultados.

Além disso, a compartimentalização do As pode ocorrer de forma diferente entre as partes da plantas e dessa forma, as respostas variam entre folhas e raízes (Shaibur e Kawai, 2009). Gomes et al. (2012) observaram essa variação em *Anadenanthera peregrina* expostas ao As^V , onde, semelhante ao registrado em *S. molesta*, as folhas demonstraram maior tolerância do que as raízes. Nesse caso, os autores sugeriram que esse seria um mecanismo de defesa das plantas, no sentido de evitar danos oxidativos ao seu aparato fotossintético.

Além das defesas antioxidativas enzimáticas, estudos indicam que vários tióis protéicos e não protéicos também contribuem para a tolerância de plantas a estresses abióticos (Colville e Kranner, 2010). Nesse contexto, a glutatona (GSH) é um tiol não protéico com propriedades antioxidativas (Estrella-Gómez et al., 2012; Noctor et al., 2012), cujo papel de proteção em plantas sob estresse por metais tóxicos (Estrella-Gómez et al., 2012; Gill et al., 2012), salinidade (Zagorchev et al., 2013), seca (Pyngrope et al., 2013) e calor (Kumar et al., 2012), já ficou comprovado.

Tanto o As^V , como o As^{III} possuem uma elevada afinidade para com tióis tais como, a GSH. Assim, a síntese dessas moléculas tende a aumentar em plantas sob estresse por esse metaloide, como um mecanismo de defesa (Raab et al., 2004; Zagorchev et al., 2013). De fato, essa resposta foi verificada em folhas flutuantes e submersas de *S. molesta* após exposição ao As^{III} .

Incrementos nos teores de GSH também foram relacionados com a tolerância ao As em arroz (Mishra et al., 2011; Tripathi et al., 2012), na hiperacumuladora *Pteris*

Vittata (Sakai et al., 2010) e nas macrófitas: *Wolffia globosa* (Zhang et al., 2012), *Ceratophyllum demersum* (Mishra et al., 2008) e *Hydrilla verticillata* (Srivastava et al., 2007).

Devido à importância da GSH como composto antioxidativo é interessante que as células mantenham suas concentrações suficientemente altas para protegê-las de condições estressantes (May et al., 1998). Nesse sentido, existe uma forte correlação entre a tolerância das plantas aos metais tóxicos e a capacidade de manter elevados níveis intracelulares de GSH (Metwally et al., 2005).

A GSH é sintetizada nos cloroplastos, citosol e mitocôndrias, essencialmente em dois passos, sendo o primeiro realizado pela ação da enzima sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS), que produz a γ -glutamilcisteína, precursor imediato da molécula de glutatona. (Zechmann e Muller, 2010; Noctor et al., 2012). O aumento observado na atividade da γ -GCS em *S. molesta*, indica que esse foi o fator responsável pelo acréscimo nas concentrações de GSH nessas plantas. Dave et al. (2013) obteve resultados semelhantes em folhas e raízes de arroz, também tratadas com As^{III} .

Sob condições de estresse, ocorre maior consumo de GSH, tanto para a formação de PCs, quanto para a sua utilização no ciclo ascorbato-glutatona (Tripathi et al., 2012). Nesses casos, uma maior atividade da enzima γ -GCS manteria os níveis de GSH adequados com a necessidade desse metabólito pela planta.

Outra enzima envolvida no metabolismo da glutatona, cuja atividade é induzida durante o estresse oxidativo induzido pelo As é a redutase da glutatona. A GR desempenha papel fundamental no sistema de defesa contra as ROS por sustentar a glutatona em seu estado reduzido (GSH) (Sytar et al., 2013).

O incremento na atividade da GR em folhas submersas de *S. molesta*, indicam que o maior acúmulo de As pode ter estimulado a atividade dessa enzima, mantendo assim os níveis celulares suficientes de GSH para o desempenho de suas funções antioxidativas. Resposta semelhante ao As , também já foi verificada em outras espécies vegetais (Srivastava et al., 2005; Singh et al., 2007; Shri et al., 2009). A ausência de alterações significativas na atividade dessa enzima nas folhas flutuantes de *S. molesta*, indica que houve pouca utilização da GSH, provavelmente pela ação das enzimas eliminadoras de ROS terem atuado de maneira eficiente no combate ao estresse oxidativo nesses órgãos.

A atuação da GR fornece substrato para a peroxidase da glutatona (GPX), enzima essa que atua na eliminação de ROS (Meyer e Hell et al., 2005), sendo considerada um biomarcador da toxicidade subletal de metais em plantas (Radotic et al.,

2000). Incrementos na atividade da GPX em folhas flutuantes de *S. molesta* expostas às maiores concentrações de As^{III} , indicam o papel dessa enzima na defesa contra o estresse oxidativo induzido por esse metaloide.

Maior atividade da GPX é considerado um mecanismo intrínseco de defesa contra o estresse oxidativo e já foi verificado em plântulas de arroz tratadas com As^{III} (Srivastava et al., 2005; Mishra et al., 2011). Já o comportamento oposto observado para a atividade da GPX nas folhas submersas pode ter resultado da toxicidade do As^{III} , conforme foi verificado para essa enzima em plantas de *Brassica juncea*, na presença de cádmio (Markovska et al., 2009).

Outra enzima, cuja atividade é induzida em condições de estresse e que depende da GSH é a sulfotransferase da glutationa (GSTs) (Chi et al., 2011). Entre suas várias funções nas plantas, a GST catalisa a desintoxicação de ROS e radicais orgânicos, utilizando a GSH como substrato (Ghelfi et al., 2011). Embora a atividade da GST tenha aumentado em folhas flutuantes e submersas de *S. molesta* em resposta ao As^{III} , os valores absolutos foram maiores nas folhas. Associado a outros fatores anteriormente descritos, isso pode ter contribuído para os menores danos observados nesses órgãos, corroborando com os resultados de Mylona et al. (1998) e Mokgalaka-Matlala et al. (2009).

As plantas possuem uma série de mecanismos para combater o estresse causado pelo As, no entanto, segundo Mishra et al. (2008), a principal via de desintoxicação desse metaloide ocorre através de sua quelação com ligantes contendo enxofre, tais como a GSH e as PCs. Assim, as funções desempenhadas pela GSH nessas condições, podem ser cruciais para as respostas adaptativas e sobrevivência das plantas.

6. Conclusões

O crescimento de *S. molesta* foi afetado negativamente pelo As^{III} , sendo os efeitos mais drásticos observados nas folhas submersas.

As ROS $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 , causaram danos às membranas celulares que variaram com as concentrações de As^{III} , sendo esses efeitos mais intensos nas folhas submersas do que nas folhas flutuantes.

S. molesta demonstrou uma reação coordenada do metabolismo antioxidativo enzimático e não enzimático na tolerância ao As^{III} , principalmente nas folhas flutuantes e na menor concentração do poluente em solução.

De modo geral, as folhas flutuantes demonstraram maior tolerância ao As do que as folhas submersas. Podem ter contribuído para esse resultado, o menor acúmulo de As pelas folhas flutuantes, associado com a atividade enzimática absoluta mais alta do que em folhas submersas. No entanto, essa resposta diferenciada entre os órgãos necessita de outros estudos para ser esclarecida.

O tempo de exposição e a concentração de As^{III} influenciaram nas respostas das plantas e também sugerem estudos adicionais, no sentido de caracterizar os efeitos desses fatores no metabolismo antioxidativo de *S. molesta* e na definição do seu potencial como espécie fitorremediadora de As.

7. Referências bibliográficas

- Alvarado S, Guédez M, Lué-Merú MP, Nelson G, Alvaro A, Jesús AC, Gyula Z** (2008) Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and lesser duckweed (*Lemna minor*). *Bioresour Technol* **99**: 8436–8440
- Aono M, Kubo A, Saji H, Tanaka K, Kondo N** (1993) Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant Cell Physiol***34**: 129–135
- Anderson JV, Davis DG** (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiol Plantarum***120**: 421–433
- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR** (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiol* **109**:1247-1257
- Aposhian HV, Aposhian MM** (2006) Arsenic toxicology: five questions. *Chem Res Toxicol***19**: 1-15
- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem***44**: 276-287
- Bhargava A, Carmona FF, Bhargava M, Srivastava S** (2012) Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *J Environ Manage***105**: 103-120
- Bienert GP, Thorsen M, Schussler MD, Nilsson HR, Wagner A, Tamas MJ, Jahn TP** (2008) A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes. *BMC Biol* **6**:26
- Boo YC, Jung J** (1999) Water deficit - Induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. *J PlantPhysiol***155**: 255–261
- Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L** (2002) Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods Enzymol* **349**: 280-287
- Cao X, Ma LQ, Tu C** (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L). *Environ Pollut* **128**: 317-325
- Carlberg I, Mannervik B** (1985) Glutathione reductase. *Method Enzymol* **113**: 484-495
- Chakrabarty D, Trivedi PK, Misra P, Tiwari M, Shri M, Shukla D, Kumar S, Rai A, Pandey A, Nigam D, Tripathi RD, Tuli R** (2009) Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere* **74**: 688–702

- Chance B, Maehley AC** (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol* **2**:755-764
- Chi Y, Cheng Y, Vanitha J, Kumar N, Ramamoorthy R, Ramachandran S, Jiang SY** (2011) Expansion mechanisms and functional divergence of the glutathione S-transferase family in *Sorghum* and other higher plants. *DNA Res***18**: 1–16
- Clark RB** (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J Agric Food Chem* **23**: 458-460
- Colville L, Kranner I** (2010) Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regul***62**: 241–255
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjärvi J, Inzé D, Van Breusegem F** (2003) Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* **33**: 621–632
- Dave R, Singh PK, Tripathi P, Shri M, Dixit G, Dwivedi S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Sharma YK, Dhankher OP, Corpas FJ, Barroso JB, Tripathi RD** (2013) Arsenite tolerance is related to proportional thiolic metabolite synthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Arch Environ Contam Toxicol***64**: 235-242
- DhoS, Camusso W, Mucciarelli M, Fusconi A** (2010) Arsenate toxicity on the apices of *Pisum sativum* L. seedling roots: Effects on mitotic activity, chromatin integrity and microtubules. *Environ Exp Bot* **69**: 117-123
- Dixon DP, Laphorn A, Madesis P, Mudd EA, Day A, Edwards R** (2008) Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **283**: 20268-20276
- Duman F, Ozturk F, Aydin Z** (2010) Biological responses of duckweed (*Lemna minor* L.) exposed to the inorganic arsenic species As (III) and As (V): effects of concentration and duration of exposure. *Ecotoxicology* **19**: 983-993
- Duquesnoy I, Champeau GM, Evray G, Ledoigt G, Piquet-Pissaloux A** (2010) Enzymatic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Zea mays* and genotoxic effect of arsenic in root tips of *Vicia faba* and *Zea mays*. *C R Biol* **333**: 814-824
- Eltayeb AE, Yamamoto S, Habora MEE, Matsukubo Y, Aono M, Tsujimoto H, Tanaka K** (2010) Greater protection against oxidative damages imposed by various environmental stresses in transgenic potato with higher level of reduced glutathione. *Breed Sci* **60**:101–109
- Estrella-Gómez NE, Sauri-Duch E, Zapata-Pérez O, Santamaría JM** (2012) Glutathione plays a role in protecting leaves of *Salvinia minima* from Pb²⁺ damage associated with changes in the expression of SmGS genes and increased activity of GS. *Environ Exp Bot***75**: 188–194
- Farias JS, Milani MR, Niencheski LFH, Paiva ML** (2012) Especificação química de As inorgânico no estuário da Laguna dos patos (RS, Brasil). *Quím Nova* **35**:1401-1406

- 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 Soil Pollut* **224**:1660
- Ferreira DF** (1999) SISVAR - Sistema de análises estatísticas. Lavras-UFLA.
- Flora, SJS** (2011) Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biol Med* **51**: 257-281
- Foyer CH, Halliwell B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**:1866-1875
- Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ, Pruvost C, Jouanin L** (1995) Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol* **109**: 1047–1057
- Fridovich I** (1995) Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem* **64**: 97–112
- Gay C, Gebicki JM** (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Anal Biochem* **284**:217-220
- Ghelfi A, Gaziola SA, Cia MC, Chabregas SM, Falco MC, Kuser-Falcão PR, Azevedo RA** (2011) Cloning, expression, molecular modelling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. *Ann Appl Biol* **59**: 267–280
- Giannopolitis CN, Ries SK** (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* **59**: 309–314
- Gill SS, Khan NA, Tuteja N** (2012) Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Sci* **182**: 112–120
- Gomes MP, Carvalho M, Marques TCLLSM, Duarte DM, Nogueira COG, Soares AM, Garcia QS** (2012) Arsenic-sensitivity in *Anadenanthera Peregrina* due to arsenic-induced lipid peroxidation. *Int J Appl Sci Technol* **2**: 55-63
- Guan Z, Chai T, Zhang Y, Xu J, Wei W** (2009) Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere* **76**: 623-630
- Guimaraes FP, Aguiar R, Oliveira JA, Silva JAA, Karam D** (2012) Potential of macrophyte for removing arsenic from aqueous solution. *Planta Daninha* **30**: 683-696

- Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD** (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA***90**: 1629–1633
- Gupta DK, Inouhe M, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Sandalio LM** (2013) Oxidative stress and arsenic toxicity: Role of NADPH oxidases. *Chemosphere* **90**:1987-1996
- Gupta DK, Srivastava S, Huang H, Romero-Puertas MC, Sandalio LM** (2011) Arsenic tolerance and detoxification mechanisms in plants. In: Sherameti I, Varma A (Eds), *Detoxification of Heavy Metals* (Book Series: Soil Biology). Springer, Heidelberg, pp 169–180
- Gupta DK, Tripathi RD, Mishra S, Srivastava S, Dwivedi S, Rai UN, Yang XE, Huanj H, Inouhe M** (2008) Arsenic accumulation in root and shoot vis-a-vis its effects on growth and level of phytochelatins in seedlings of *Cicer arietinum* L. *J Environ Biol* **29**: 281-286
- Gupta M, Sharma P, Sarin NB, Sinha AK** (2009) Differential response of arsenic stress in two varieties of *Brassica juncea* L. *Chemosphere* **74**: 1201-1208
- Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS, Cambraia J** (2013) Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. *Acta Physiol Plant* **35**: 1201-1209
- Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB** (1974) Glutathione-S-transferase. The first step in mercapturic and formation. *J Biol Chem* **249**: 7130-7139
- Han C, Liu Q, Yang Y** (2009) Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regul***58**: 153-162
- Hariyadi, Yanuwadi B, Polii B, Soemarno** (2013) Phytoremediation of arsenic from geothermal power plant waste water using *Monochoria vaginalis*, *Salvinia molesta* and *Colocasia esculenta*. *IJB3*:104-111
- Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Bookum WT, Schat H, Meharg AA** (2001) Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol***126**: 299-306
- Havir EA, Mchale NA** (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* **84**: 450-455
- Heath RL, Packer L** (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **125**:189–198
- Hefny M, Abdel-Kader DZ** (2009) Antioxidant-enzyme system as selection criteria for salt tolerance in forage sorghum genotypes (*Sorghum bicolor* L. Moench). In: Ashraf M, Ozturk M, Athar HR (Eds), *Salinity and Water Stress*. Springer, The Netherlands, pp. 25–36

- Hoffman H, Schenk M** (2011) Arsenite toxicity and uptake rate of rice (*Oryza sativa* L.) in vivo. *Environ Pollut* **159**: 2398-2404
- Hoffmann T, Kutter C, Santamaria J** (2004) Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Eng Life Sci* **4**: 61–65
- 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 H, Gupta DK, Tian S, Yang X, Li T** (2012) Lead tolerance and physiological adaptation mechanism in roots of accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *Environ Sci Pollut Res* **19**: 1640-1651
- Hunt, R** (1978) Plant growth analysis. Studies in Biology Series No. 96. Edward Arnold Ltd., London, U.K. 57p
- Isayenkov SV, Maathuis FJM** (2008) The Arabidopsis thaliana aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. *FEBS Lett* **582**: 1625-1628
- Kar M, Nishra D** (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* **57**: 315-319
- Khang VH, Hatayama M, Inoue C** (2012) Arsenic accumulation by aquatic macrophyte coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) exposed to arsenite, and the effect of iron on the uptake of arsenite and arsenate. *Environ Exp Bot* **83**: 47– 52
- Koshiba T** (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiol* **34**: 713-721
- Kumar S, Asif MH, Chakrabarty D, Tripathi RD, Dubey RS, Trivedi PK** (2012) Differential expression of rice lambda class GST gene family members during plant growth, development, and in response to stress conditions. *Plant Mol Biol Rep* **31**: 569-580
- Kuo MC, Kao CH** (2003) Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biol Plant* **46**:149-152
- Lamhamdi M, Bakrim A, Aarab A, Lafont R, Sayah F** (2011) Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *C R Biol* **334**:118-126
- LeBlanc MS, McKinney EC, Meagher RB, Smith AP** (2013) Hijacking membrane transporters for arsenic phytoextraction. *J Biotechnol* **2013** **163**: 1-9
- Li WX, Chen TB, Huang ZC, Lei M, Liao XY** (2006) Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Chemosphere* **62**: 803–809
- Lin A, Zhang X, Zhu YG, Zhao FJ** (2008) Arsenate-induced toxicity: effects on antioxidative enzymes and DNA damage in *Vicia faba*. *Environ Toxicol Chem* **27**: 413-419

- Lindeman W** (1958) Observations on the behavior of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light, Proc, 2nd Int. Conference on the Peaceful Uses Atomic Energy **24**:8-15
- Liu WJ, Wood BA, Raab A, McGrath SP, Zhao FJ, Feldmann J** (2010) Complexation of arsenite with phytochelatins reduces arsenite efflux and translocation from roots to shoots in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol **152**: 2211-2221
- Lorestani B, Cheraghi M, Yousefi N** (2011). Phytoremediation potential of native plants growing on a heavy metals contaminated soil of copper mine in Iran. World Acad Sci Eng Technol **77**: 377-382
- Maheshwari R, Dubey RS** (2009) Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. Plant Growth Regul **59**: 37–49
- Mallick S, Sinam G, Sinha S** (2011) Study on arsenate tolerant and sensitive cultivars of *Zea mays* L.: Differential detoxification mechanism and effect on nutrients status. Ecotox Environ Safe **74**: 1316 - 1324
- Marin AR, Pezeshki SR, Masscheleyn PH, Choi HS** (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. J Plant Nut **16**: 865-880
- Markovska YK, Gorinova NI, Nedkovska MP, Miteva KM** (2009) Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants. Biol Plant **53**: 151-154
- Mascher R, Lippman B, Holiinger S, Bergmann H.** (2002) Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. Plant Science **163**: 961-969
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inze D** (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. J Expt Bot **49**: 649–667
- Meharg AA, Hartley-Whitaker J** (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. New Phytol **154**: 29–43
- Meriga B, Reddy BK, Rao KR, Reddy LA, Kishor PB** (2004) Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). J Plant Physiol **161**: 63-68.
- Metwally A, Safronova VI, Belimov AA, Dietz KJ** (2005) Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. J Exp Bot **56**:167–178
- Meyer AJ, Hell R** (2005) Glutathione homeostasis and redox regulation by sulfhydryl groups. Photosynth Res **86**: 435–457
- Mishra S, Jha AB, Dubey RS** (2011) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. Protoplasma **248**: 565-577

- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Trivedi PK** (2008) Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. *Aquat Toxicol* **86**: 205-215
- Misra HP, Fridovich I** (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J Biol Chem* **246**: 6886-6890
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Mohammadi M, Karr AL** (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *J Plant Physiol* **158**: 1023-1029
- Mokgalaka-Matlala NS, Flores-Tavizón E, Castillo-Michel H, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL** (2009) Arsenic tolerance in mesquite (*Prosopis* sp.): low molecular weight thiols synthesis and glutathione activity in response to arsenic. *Plant Physiol Biochem* **47**: 822-826
- Moussa R, Abdel-Aziz SM** (2008) Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Aust J Crop Sci* **1**: 31-36
- Mudhoo A, Garg VK, Wang S** (2012) Removal of heavy metals by biosorption. *Environ Chem Lett* **10**: 109-117
- Mylona PV, Polidoros NA, Scandalios JG** (1998) Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. *Free Radic Biol Med* **25**: 576-585
- Nagalakshmi N, Prasad MNV** (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci* **160**: 291-299
- Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**: 867-880
- Neill S, Desikan R, Hancock J** (2002) Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 388-395
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol* **49**: 249-279
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez Garcia B, Queval G, Foyer CH** (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* **35**: 454-484
- Olguín, EJ, Sánchez-Galván G** (2012) Heavy metal removal in phytoremediation and phytoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnol* **30**: 3-8
- Ozturk F, Duman F, Leblebici Z, Temizgul R** (2010) Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environ Exper Bot* **69**: 167-174

- Pallanca JE, Smirnoff N** (2000) The control of ascorbic acid synthesis and turnover pea seedlings. *J Exp Bot* **51**: 669-674
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim PR, Moreira MA** (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev Bras Fisiol Veg* **11**:137-143.
- Pimentel C, Sarr B, Diouf O, Abboud ACS, Macauley HR**(2002) Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo. *Rev Univ Rural* **22**: 07 -14
- Poschenrieder C, Cabot C, Martos S, Gallego B, Barceló J** (2013) Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Sci* **212**:15-25
- Pyngrope S, Bhoomika K, Dubey RS** (2013) Reactive oxygen species, ascorbate–glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. *Protoplasma* **250**: 585–600
- Raab A, Feldmann J, MehargAA** (2004) The nature of arsenic phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiol* **134**: 1113-1122
- Rai, PK, Triphati BD** (2011) Heavy metal adsorption of a free floating aquatic macrophyte *Spirodela polyrhiza*. *J Environ Res Dev* **5**: 656-660
- Radotic K, Ducic T, Mutavdzic D** (2000) Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environ Exp Bot* **44**: 105-113
- Rahman F, Naidu E** (2009) The influence of arsenic speciation (As^{III} & As^V) and concentration on the growth, uptake and translocation of arsenic in vegetable crops (silverbeet and amaranth): greenhouse study. *Environ Geochem Health* **31**:115–124
- Rahman MA, Hasegawa H** (2011) Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophytes. *Chemosphere* **83**: 633-646
- Rahman MA, Hasegawa H, Kitahara K, Maki T, Ueda K, Rahman MM** (2008a) The effects of phosphorous on the accumulation of arsenic in water fern (*Azolla pinnata* L.). *J Ecotechnol Res* **14**: 21–24
- Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Okumura C, Rahman MM** (2007) Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.): a good option for phytoremediation. *Chemosphere* **69**: 493–499
- Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Rahman MM** (2008b) Influence of phosphate and iron ions in selective uptake of arsenic species by water fern (*Salvinia natans* L.). *Chem Eng J* **145**: 179–184
- Rahman MA, Hasegawa H, Lim RP** (2012) Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environ Res* **116**: 118-135

- Requejo R, Tena M** (2005) Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry* **66**: 1519-1528
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodriguez-Serrano M, Gomez LA, del Rio LA, Sandalio LM** (2007) Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J Plant Physiol* **164**: 1346-1357
- Rüegsegger A, Brunold CH** (1992) Effect of cadmium and/or removal of kernels or shoots on the levels of cysteine, γ -glutamyl-cysteine, glutathione, and TCA-soluble thiols in maize seedlings. *Phyton* **32**:109-112
- 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*. *Environ Pollut* **158**: 3663-3669
- Scandalios JG** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* **101**: 7-12
- Seth CS, Chaturvedi PK, Misra V** (2007) Toxic effect of arsenate and cadmium alone and in combination on giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in response to its accumulation. *Environ Toxicol* **22**: 539–549
- Shaibur MR, Kawai S** (2009) Effect of arsenic on visible symptom and arsenic concentration in hydroponic Japanese mustard spinach. *Environ Exp Bot* **67**: 65-70
- Shaibur MR, Kitajima N, Sugawara R, Kondo T, Imamul-Huq SM, Kawai S** (2006) Physiological and mineralogical properties of arsenic-induced chlorosis in rice seedlings grown hydroponically. *Soil Sci Plant Nutr* **52**: 691-700
- Sharma AK, Tjell JC, Sloth JJ, Holm PE** (2014) Review of arsenic contamination, exposure through water and food and low cost mitigation options for rural areas. *Appl Geochem* **41**: 11–33
- Sharma I** (2012a) Arsenic induced oxidative stress in plants. *Biologia* **67**: 447-453
- Sharma I** (2013) Arsenic-induced Oxidative Stress and Antioxidant Defense System of *Pisum sativum* and *Pennisetum typhoides*: A Comparative Study. *Res J Biotech* **8**: 48-56
- Sharma P, Dubey RS** (2004) Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Sci* **167**: 541–550
- Sharma P, Dubey RS** (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul* **46**: 209–221
- Sharma P, Dubey RS** (2007) Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminium. *Plant Cell Rep* **26**: 2027–2038

- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessaraki M** (2012b) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot*, 26 pages, doi:10.1155/2012/217037
- Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Tuli R** (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotox Environ Safe* **72**:1102-1110
- Singh HP, Batish DR, Kohali RK, Arora K** (2007) Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regul* **53**: 65-73
- Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP, Sharma N, Kohli RK** (2009) Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* **20**:289-297
- Singh N, Ma LQ, Shrivastava M, Rathinasapathi B** (2006) Metabolic adaptation to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci* **170**: 274-282
- Sood A, Uniyal PL, Prasanna R, Ahluwalia AS** (2012) Phytoremediation potential of aquatic macrophyte, *Azolla*. *Ambio* **41**: 122-137
- Srivastava M, Ma LQ, Rathinasabapathi B, Srivastava P** (2009) Effects of selenium on arsenic uptake in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresour Technol* **100**: 1115-1121
- Srivastava M, Ma LQ, Singh N** (2005) Antioxidant responses of hyper- accumulator and sensitive fern species to arsenic. *J Exp Bot* **56**: 335–1342
- Srivastava S, Dubey RS** (2011) Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regul* **64**: 1-16
- Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD., Dwivedi S, Trivedi PK, Tandon PK** (2007) Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Environmental Science and Technology* **4**: 2930–2936
- Srivastava S, Srivastava AK, Suprasanna P, D'Souza SF** (2013) Quantitative real-time expression profiling of aquaporins-isoforms and growth response of *Brassica juncea* under arsenite stress. *Mol Biol Rep* **40**: 2879-2886
- Sytar O, Kumar A, Latowski D, Kuczynska P, Strzalka K, Prasad MNV** (2013) Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiol Plant* **35**: 985-999
- Talukdar D** (2011) Effect of arsenic-induced toxicity on morphological traits of *Trigonella foenum-graecum* L. and *Lathyrus sativus* L. during germination and early seedling growth. *Curr Res J Biol Sci* **3**: 116-123

- Talukdar D, Talukdar T** (2013) Superoxide-Dismutase Deficient Mutants in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Genetic Control, Differential Expressions of Isozymes, and Sensitivity to Arsenic. *BioMed Res Int* 2013.doi: 10.1155/2013/782450
- Tanaka K, Mitsuhashi H, Kondo N, Sugahara K** (1982) Further evidence for inactivation of fructose 1,6-bisphosphate at the beginning of SO₂ fumigation: increase in fructose-1,6-bisphosphate and decrease in fructose-6-phosphate in SO₂ fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol* **23**: 1467-1470
- Tripathi P, Mishra A, Dwivedi S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Singh RP, Tripathi RD** (2012) Differential response of oxidative stress and thiol metabolism in contrasting rice genotypes for arsenic tolerance. *Ecotox Environ Safe* **79**:189-198
- Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJ** (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol***25**: 158-165
- Vasquez-Tello A, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Silva JBV** (1990) Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *J Exp Bot* **41**: 827–832
- Verma S, Dubey RS** (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* **164**: 645-655
- Vithanage M, Dabrowska BB, Mukherjee AB, Sandhi A, Bhattacharya P** (2012) Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environ Chem Lett* **10**:217-224
- Wellburn AR** (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* **144**: 307-313
- Wang J, Zhang H, Allen RD** (1999) Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *PlantCell Physiol***40**: 725–732
- Wang SH, Yang ZM, Yang H, Lu B, Li SQ, Lu YP** (2004) Copper induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. *Bot Bull Acad Sin* **45**: 203-212
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Langebartels C, Van Montagu M, D Inzé D, Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO J* **16**: 4806-4816
- (WHO) World Health Organization** (2011) Guidelines for Drinking-water Quality, 4th ed. pp. 315
- Xie QE, Yan XL, Liao XY, Li X** (2009) The arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. *Environ Sci Technol* **43**: 8488-8495

- Yadav SK** (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S Afr J Bot* **76**: 167–179
- Zaefyzadeh M, Quliyev RA, Babayeva SM, Abbasov MA** (2009) The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. *Turkish J Biol* **33**: 1–7
- Zagorchev L, Seal EC, Kranner I, Mariela Odjakova M** (2013) A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *Int J Mol Sci* **14**: 7405-7432
- Zechmann B, Müller M** (2010) Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma* **246**: 15–24
- Zhang G, Khorshed A, Chen JP** (2013) Simultaneous removal of arsenate and arsenite by a nanostructured zirconium–manganese binary hydrous oxide: Behavior and mechanism. *J Colloid Interf Sci* **397**: 137–143
- Zhang X, Uroic MK, Xie WY, Zhu YG, mChe BD, McGrath SP, Feldmann J, Zhao FJ** (2012) Phytochelatins play a key role in arsenic accumulation and tolerance in the aquatic macrophyte *Wolffia globosa*. *Environ Pollut* **165**: 18-24
- Zhang X, Lin AJ, Zhao FJ, Xu GZ, Duan GL, Zhu YG** (2008) Arsenic accumulation by the aquatic fern *Azolla*: comparison of arsenate uptake, speciation and efflux by *A. caroliniana* and *A. filiculoides*. *Environ Pollut* **156**: 1149-1155
- Zhao FJ, Ago Y, Mitani N, Li RY, Su YH, Yamaji N, McGrath SP, Ma JF** (2010b) The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots. *New Phytol* **186**: 392-399
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP** (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol* **181**: 777-794
- Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA** (2010a) Arsenic as a food chain contaminant: mechanism of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 535–559