

GABRIELA ALVES DOS SANTOS

**CRESCIMENTO E RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DE
MACRÓFITAS AQUÁTICAS SUBMETIDAS AO ARSÊNIO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

GABRIELA ALVES DOS SANTOS

**CRESCIMENTO E RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DE
MACRÓFITAS AQUÁTICAS SUBMETIDAS AO ARSÊNIO**

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

APROVADA: 29 de setembro de 2006

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva
(Co-orientador)

Prof. José Cambraia
(Co-orientador)

Prof^ª. Rosane Maria de Aguiar Euclides

Dr^ª. Sylvia Therese Meyer

Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Izabel, e aos meus irmãos, Isabela e Jonnes, pelo afeto e encorajamento.

Ao Tiago pela paciência, pela tolerância, pela cumplicidade, pela grande ajuda e, acima de tudo, pelo amor, que tornaram possíveis a conclusão desta etapa.

A todos os amigos pelo agradável convívio e pela amizade, em especial à Rafaela por toda ajuda e carinho durante esse um ano de convivência que vai deixar saudades.

A todos aqueles que ajudaram-me na execução deste trabalho, em especial à Tainá que mesmo com tantas atrapalhões foi de grande valia para o andamento deste trabalho.

Ao Juraci pelas boas risadas, amizade ... E pela orientação também!

Ao Prof Cambraia pela co-orientação e grande ajuda na realização deste trabalho.

Ao Marco Aurélio por toda minha formação em fisiologia vegetal e imensuráveis colaborações prestadas ao longo de todo o meu percurso em Viçosa.

À Rosane Aguiar e à Sylvia Therese pela disponibilidade em analisar esse material.

Aos professores Júlio César Lima Neves e Cosme Damião Cruz e, em especial, aos estudantes do curso de Genética e Melhoramento, Edmar Soares de Vasconcelos e Juliano Lino, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao meu cunhadinho, Érico, à Andressa França e ao Marcos De Lucca pelo *help* final.

Aos funcionários e professores que me auxiliaram em algum momento.

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, pelo curso oferecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A Deus.

BIOGRAFIA

Gabriela Alves dos Santos, filha de Izabel Alves dos Santos e Jonas Nascimento dos Santos, nasceu em 22 de abril de 1980, em Itabuna, BA.

Em janeiro de 2005, graduou-se em Ciências Biológicas, bacharelado e licenciatura, pela Universidade Federal de Viçosa.

Iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, em março de 2005 e, em setembro de 2006, submeteu-se à defesa de tese.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Obtenção e aclimatação das plantas.....	9
3.2. Efeito do As sobre o crescimento relativo e determinação da concentração deste elemento nas plantas.....	9
3.3. Efeito do As sobre atividades enzimáticas, concentração de tióis e teor de antocianinas.....	10
3.3.1. Extração e determinação de atividades enzimáticas.....	10
3.3.1.1. Extração e determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1).....	10
3.3.1.2. Extração e determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	11
3.3.1.3. Extração e determinação da atividade de peroxidases (POX, EC 1.11.1.7).....	11
3.3.1.4. Extração e determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11).....	12
3.3.1.5. Extração e determinação da atividade da redutase da glutathione (GR, EC 1.8.1.7).....	12
3.3.2. Efeito do arsênio sobre os teores de compostos tiolados.....	13
3.3.2.1. Extração de tióis.....	13
3.3.2.2. Determinação do teor de tióis totais.....	13
3.3.2.3. Determinação do teor de tióis não-protéicos.....	13
3.3.2.4. Determinação do teor de tióis protéicos.....	14
3.3.3. Extração e determinação dos teores de antocianinas.....	14
3.4. Delineamento experimental.....	14

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1. Efeito do As em solução sobre a concentração deste elemento nas plantas.....	15
4.2. Efeito do As sobre a taxa de crescimento relativo.....	17
4.3. Efeito do As sobre as atividades enzimáticas.....	19
4.3.1. Efeito do As sobre a atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1).....	19
4.3.2. Efeito do As sobre a atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	21
4.3.3. Efeito do As sobre a atividade de peroxidases (POX, EC 1.11.1.7).....	24
4.3.4. Efeito do As sobre a atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11).....	25
4.3.5. Efeito do As sobre a atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7)...	27
4.4. Efeito do As sobre a concentração de tióis solúveis totais, tióis não-protéicos e tióis protéicos.....	30
4.5. Efeito do As sobre a concentração de antocianinas.....	34
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

SANTOS, Gabriela Alves dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2006. **Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao Arsênio**. Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Co-orientadores: José Cambraia e Marco Aurélio Pedron e Silva.

A influência do As sobre alguns aspectos do crescimento e do sistema antioxidante foi estudada em três espécies aquáticas: *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima*, expostas cinco concentrações de As (0,0, 0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) em solução nutritiva. Foram determinados o teor de As nas plantas, a taxa de crescimento relativo (TCR), as atividades enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), da catalase (CAT), de peroxidases (POX), da peroxidase do ascorbato (APX) e da redutase da glutatona (GR), o teor de tióis totais, de tióis não protéicos e de tióis protéicos e, ainda, o teor de antocianinas. *Lemna gibba* foi a macrófita que apresentou maior tolerância ao As, requerendo 967,6 µg g⁻¹MS para reduzir em 50 % a TCR. *Azolla caroliniana* demandou 429,2 µg g⁻¹MS para a ocorrência dessa redução e, por último, demonstrando ser a mais sensível, *S. minima* requereu 255,08 µg g⁻¹MS. Em relação aos mecanismos antioxidantes, as três espécies responderam de forma diferente ao aumento da concentração de As no meio. *Azolla caroliniana* sofreu aumentos nas atividades da CAT e da GR, manteve inalteradas as atividades da SOD e da POX, sofrendo diminuição na atividade da APX, embora tenha sido a espécie que apresentou maior atividade desta enzima. *Salvinia minima* exibiu aumentos nas atividades de SOD, CAT, APX e GR, mantendo inalterada a atividade de POX, com o aumento da concentração de As no meio de cultivo. A maior tolerância de *L. gibba* aos efeitos do As parece estar relacionada tanto aos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Esta espécie, além de apresentar maiores atividades de SOD, CAT, POX e GR, também apresentou maiores teores de tióis e antocianinas que as outras duas espécies analisadas. Embora *A. caroliniana* e *S. minima* também tenham apresentado incrementos nas atividades de várias enzimas, a maior tolerância de *L. gibba* parece ser devida não somente ao aumento nestes processos antioxidantes, mas à superior atividade basal dessas enzimas e ao maior conteúdo basal de tióis e antocianinas. Além do aumento nas

atividades enzimáticas, *L. gibba* exibiu aumentos nos teores de tióis totais e tióis não protéicos, diminuindo os teores de tióis protéicos. *A. caroliniana* e *S. minima* praticamente não sofreram alterações no conteúdo de tióis. Assim como *L. gibba*, *A. caroliniana* e *S. minima* revelaram acréscimos nos teores de antocianinas após exposição às concentrações crescentes de As na solução. Neste contexto, dentre as três macrófitas estudadas, *L. gibba* foi a que apresentou maior potencial para ser empregada em programas de fitorremediação.

ABSTRACT

SANTOS, Gabriela Alves dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September 2006. Growth and antioxidative responses of aquatic macrophytes to arsenic. Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-Advisers: José Cambraia and Marco Aurélio Pedron e Silva.

The influence of different concentrations of As over some aspects of growth and antioxidant system were studied in three water species: *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* and *Salvinia minima*, in nutrient solution. After the three species being exposed to five concentrations of As (0.0, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.5 mg.L⁻¹) in nutrient solution, the As content into the plants, relative growth rate (TCR), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) enzymatic activity, total thiol, non protein thiol and protein thiol content and anthocyanin content were determined. *L. gibba* showed the highest tolerance to As, requiring 967,6 µg g⁻¹MD to reduce growth in 50%. *A. caroliniana* required 429,2 µg g⁻¹MD to show this level of growth reduction and *S. minima* required 255,08 µg g⁻¹MD for the same response. Antioxidant mechanisms to the increase in As concentration in the medium characterized each species. *A. caroliniana* went through increases in CAT and GR activities, keeping unaltered SOD and POX activities, and showing reduction in APX activity, although it presented the highest activity of this enzyme. *S. minima* exhibited increase in SOD, CAT, APX and GR activities, keeping POX activity unaltered, with the increase of As concentration in the growth medium. *L. gibba* higher tolerance to As effects seem to be related to the enzymatic antioxidant mechanisms and also to the non-enzymatic ones. This species, besides presenting higher SOD, CAT, POX and GR activities, also showed higher thiol and anthocyanin content than the other two species studied. Although *A. caroliniana* and *S. minima* also presented increase in the activity of several enzymes, *L. gibba*'s higher tolerance seems to be due not only to the increase in these antioxidant processes, but also to superior basal activity of these enzymes, and to higher thiol and anthocyanin basal content. Besides the increase in enzymatic activities, *L. gibba* exhibited total-thiol and non-protein thiol content increase, diminishing protein thiol content. *A. caroliniana* and *S. minima*

practically did not suffer alterations in thiol content. As *L. gibba*, *A. caroliniana* and *S. minima* revealed an increment in anthocyanin content after exposure to increasing concentrations of As in the solution. In this context, *L. gibba* showed the highest potential to be employed in phytoremediation.

1. INTRODUÇÃO

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

A contaminação do ambiente por arsênio tem despertado a atenção de pesquisadores e de órgãos governamentais em muitos países. A elevação das concentrações de As no ambiente aquático resulta do despejo direto de resíduos nos cursos d'água ou das atividades antropogênicas que liberam o As presente no solo, possibilitando, assim, que esse elemento seja drenado e atinja os rios, lagos e as águas subterrâneas. A ingestão de água contaminada com As é a forma mais comum de exposição do homem à toxicidade desse elemento, que pode causar vários distúrbios fisiológicos e, em alguns casos, levar até à morte (Mandal e Suzuki, 2002; Lee *et al.*, 2006).

O aumento das concentrações de As nos diversos cursos d'água, associado à elevada toxicidade deste poluente, torna evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos ou tecnologias capazes de remover o As do meio aquático. Essa remoção é muito difícil, mas existe a possibilidade de utilização de plantas aquáticas na remediação desses ambientes. Um dos requisitos das espécies a serem utilizadas com essa finalidade é a tolerância a esse elemento tóxico, comprovada em algumas espécies, como *Lemna gibba* (Mkandawire e Dudel, 2005).

Apesar da existência de muitos estudos sobre a tolerância de plantas a metais pesados, e alguns sobre a tolerância ao As, ainda não existem informações

suficientes para se entender os mecanismos de tolerância de algumas espécies de plantas aquáticas a esse elemento. Sabe-se que, dentre os vários processos bioquímicos e fisiológicos, a participação de processos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, reveste-se de grande importância no entendimento da tolerância das plantas ao As (Valko *et al.*, 2006).

O As, assim como diversos agentes estressores, parece estimular a produção de intermediários reativos de oxigênio que tendem a potencializar os efeitos tóxicos dos poluentes (Mascher *et al.*, 2002). Por outro lado, a participação de enzimas antioxidantes pode colaborar, de modo significativo, no processo de tolerância das plantas à ação tóxica dos poluentes (Cao *et al.*, 2004).

Mecanismos antioxidantes enzimáticos em plantas incluem a participação das dismutases do superóxido (SOD), das catalases (CAT), das peroxidases (POX), das peroxidases do ascorbato (APX) e das redutases da glutathione (GR). As dismutases do superóxido agem como primeira linha de defesa contra os intermediários reativos de oxigênio, dismutando o superóxido e produzindo o peróxido de hidrogênio que é menos reativo. Catalases, peroxidases e peroxidases do ascorbato catalisam a conversão do peróxido de hidrogênio em compostos não tóxicos. As peroxidases do ascorbato, juntamente com as redutases da glutathione, participam do ciclo ascorbato-glutathione que, adicionalmente, promovem a decomposição do peróxido de hidrogênio (Mittler, 2002).

Evidências da participação das enzimas antioxidantes no processo de tolerância das plantas ao As têm sido demonstradas em diversas pesquisas, conforme observações relatadas por Mylona *et al.* (1998), Mascher *et al.* (2002), Xinde *et al.* (2004).

Vários outros trabalhos têm relacionado, também, a tolerância de plantas ao As à capacidade delas sintetizarem peptídios de baixo peso molecular, denominados fitoquelatinas (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2004). As fitoquelatinas são peptídios ricos em grupos SH, derivados da glutathione, e têm a estrutura geral $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-gly}$ ($n = 2-11$), sendo capazes de formar complexos com o As, reduzindo seus efeitos tóxicos. A síntese de fitoquelatinas é induzida por vários metais pesados e, também, por As (Schmöger *et al.*, 2000; Hartley-Whitaker *et al.*, 2001). Além de precursora das fitoquelatinas, a glutathione participa do ciclo ascorbato-glutathione,

desempenhando papel fundamental no mecanismo antioxidante (Noctor e Foyer, 1998).

Poucos estudos têm sido realizados sobre os mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, comumente envolvidos na defesa ao estresse oxidativo, com as espécies aquáticas *Lemna gibba*, *Salvinia minima* e *Azolla caroliniana* expostas ao As. A possibilidade de utilização dessas espécies em trabalhos de fitorremediação de ambientes contaminados com As torna esses estudos ainda mais relevantes.

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do As, em níveis tóxicos, sobre alguns aspectos do crescimento e do sistema antioxidante nas espécies aquáticas: *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima*, em solução nutritiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O arsênio encontra-se amplamente distribuído em todos os ambientes terrestres, alcançando concentrações de 10 mg kg^{-1} , na forma não-disponível, em solos não contaminados. A presença em elevadas concentrações deve-se às ações antropogênicas que incluem mineração, produção de herbicidas e fungicidas, produção de preservadores de madeira e corantes, fabricação de vidros, produção de fármacos, dentre outros (Matschullat, 2000; Tapio e Grosche, *in press*). Adicionalmente, podem ocorrer acréscimos decorrentes de processos naturais oriundos de fontes geoquímicas que incluem a substituição do As por Fe, Si ou Al e as atividades vulcânicas (Nriagu, 1990).

Águas e solos contaminados com elevadas concentrações de As têm sido encontradas em diversos países, incluindo, Bangladesh (Hossain, 2006), China (Liu *et al.*, 2005), Eslováquia (Keegan *et al.*, 2005), Índia (Rhochowdury *et al.*, 2005), EUA (Graney e Eriksen, 2004) e Brasil (Magalhães e Pfeiffer, 1995; Moreira, 1996; Matschullat *et al.*, 2000; Mirlean *et al.*, 2003; Mirlean e Roisenberg, 2006).

A ingestão de água contaminada com As é a forma mais comum de contaminação do homem. Devido ao seu efeito mutagênico, carcinogênico, teratogênico, inibitório enzimático e inibitório da resposta imune, o As pode causar sérios danos à saúde humana, resultando em dermatites, problemas respiratórios, renais, neurológicos, hepáticos, gastrointestinais e cardiovasculares (Mandal e Suzuki, 2002; Hossain, 2006; Lee *et al.*, 2006; Tapio e Grosche, *in press*).

A toxicidade do As depende, dentre outros fatores, da sua forma química e concentração (Patra *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2006). As formas químicas incluem espécies inorgânicas como o arsenato (As^{+5}) e o arsenito (As^{+3}), e orgânicas como a arsenobetaina e a arsenocolina. As formas mais tóxicas são as inorgânicas (Barra *et al.*, 2000).

A elevada toxicidade do As, associada ao acúmulo crescente deste metalóide em diversos ambientes tem resultado em pesquisas de métodos para a remediação *in situ* e *ex situ* de solos e águas contaminados com este elemento.

Métodos físico-químicos, tais como osmose reversa e precipitação química, embora sejam eficientes em locais contaminados com altas concentrações de poluentes,

apresentam desvantagens como alto custo, formação de resíduos e baixa recuperação da água (Leist *et al.*, 2000; Alkorta *et al.*, 2004).

A fitorremediação tem sido proposta como uma metodologia alternativa na remoção de As de ambientes contaminados. Para isso as espécies vegetais utilizadas devem ser eficientes na retirada de grande quantidade de As do solo ou da água.

Muitas espécies vegetais apresentam potencialidade para serem utilizadas em programas de fitorremediação como, por exemplo, *Pteris vittata*, *Trifolium pratense*, *Pityrogramma calomelanos*, *Mimosa pudica*, *Melastoma malabrarhricum* e outras.

Plantas aquáticas crescidas em locais contaminados com As têm apresentado altas concentrações desse elemento (Mkandawire e Dudel, 2005), podendo resultar na utilização como espécies fitorremediadoras. Dentre as espécies aquáticas importantes na fitorremediação de águas contaminadas destacam-se *Lemna gibba*, *Salvinia minima* e *Azolla caroliniana*. Os critérios geralmente utilizados na seleção de plantas para remediação de áreas contaminadas são alta tolerância ao metalóide, capacidade de acumular As, ciclo de vida curto, ser de fácil e rápida propagação, apresentar ampla distribuição e alto ganho de biomassa (Francesconi *et al.*, 2002; Vissottiviseth *et al.*, 2002; Xia e Ma, 2006).

Várias espécies pertencentes à família Lemnaceae têm sido utilizadas em estudos de fitorremediação (Boniardi *et al.*, 1999; Mkandawire *et al.*, 2006) devido à ampla distribuição, ao rápido crescimento que varia de 0,1 a 0,5 g g⁻¹ dia⁻¹ e ao curto ciclo de vida (Ornon *et al.*, 1984). A espécie *Lemna gibba*, uma angiosperma monocotiledônea flutuante, tem sido encontrada, naturalmente, em locais contaminados com As, sendo que a concentração desse elemento na planta aumenta com o aumento da concentração de As no meio (Mkandawire e Dudel, 2005), sugerindo que esta espécie possa ser utilizada como fitorremediadora de águas contaminadas com As.

Salvinia é um gênero de pteridófitas aquáticas flutuantes pertencentes à família Salviniaceae e encontra-se distribuída globalmente (Oliver, 1993). O rápido crescimento de espécies desse gênero, associado à capacidade de remoção de metais pesados da água (Nichols *et al.*, 2000; Maine *et al.*, 2001; Maine *et al.*, 2004) tornam a *Salvinia minima* uma espécie potencial para ser utilizada em trabalhos de fitorremediação.

Azolla, gênero de pteridófitas aquáticas de pequeno porte, possui ampla distribuição geográfica e elevada capacidade de crescimento, chegando a dobrar sua

biomassa em três dias (Arora e Saxena, 2005). Elas apresentam, também, capacidade de acumular diversos metais pesados (Bennicelli *et al.*, 2004).

A utilização de espécies de plantas aquáticas em trabalhos de fitorremediação de ambientes contaminados com As requer o entendimento dos diversos processos bioquímicos e fisiológicos de absorção e de tolerância a esse metalóide. Os mecanismos de tolerância ao As desenvolvidos por diferentes espécies são variados e incluem, por exemplo, a exclusão do elemento tóxico do protoplasto, a sua complexação e/ou conversão em espécies de menor toxicidade e, ainda, a participação de processos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Sob condições normais de crescimento, a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) nas células é baixa, mas diversas alterações nas condições normais podem retirar as células de sua homeostase, aumentando a produção de ROIs (Polle, 2001). Os ROIs podem ser formados a partir da doação de energia ou de um, dois ou três elétrons para o oxigênio molecular formando, respectivamente, o oxigênio singlete (O_2^S), o íon superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\cdot}) (Valko *et al.*, 2006). Em contraste com o oxigênio molecular, os ROIs podem causar danos a macromoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), levando à destruição oxidativa da célula (Karenlampi *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2006; Barreiros *et al.*, 2006).

O As, assim como os metais pesados, parece estimular a formação de ROIs (Mylona *et al.*, 1998; Teisseire e Vernet, 2001; Xinde *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006). Embora os mecanismos de formação desses ROIs ainda não sejam bem entendidos, sabe-se que o arsenato, por ser quimicamente semelhante ao fosfato, atua reduzindo a fosforilação oxidativa deslocando o fosfato na síntese de ATP (Terweele *et al.*, 1967 citado por Mascher *et al.*, 2002), podendo levar à formação de intermediários reativos de oxigênio. Adicionalmente, a oxidação espontânea de arsenito em arsenato pode acarretar a formação de ROIs (Valko *et al.*, 2006)

As defesas antioxidantes em plantas incluem a participação de antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, POX, APX, GR) e antioxidantes não enzimáticos (glutathiona, antocianinas), com a finalidade de diminuir os efeitos tóxicos dos ROIs.

Dismutases do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) são metaloenzimas que agem como primeira linha de defesa contra os ROIs (Valko *et al.*, 2006). Quando prótons

estão disponíveis, as SOD catalisam o protonamento de duas moléculas de superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Existem várias isoformas da SOD que diferem no tipo de metal presente no centro ativo, na constituição da cadeia aminoacídica, no número de subunidades e em outras características (Valko *et al.*, 2006). As diferentes isoformas estão localizadas nos cloroplastos, no citosol, nas mitocôndrias, nos peroxissomos e no apoplasto (Mittler, 2002).

Catalases (CAT, EC 1.11.1.6) são enzimas que participam do controle dos níveis tóxicos de peróxido de hidrogênio, promovendo sua conversão em água e oxigênio molecular. Possuem um grupo heme em sua estrutura (Valko *et al.*, 2006) e atuam em peroxissomos (Mittler, 2002).

Peroxidasas (POX, EC 1.11.1.7) são enzimas que degradam o peróxido de hidrogênio em água e em um composto oxidado que depende do tipo de peroxidase atuante. São encontradas no citosol, nos vacúolos, nos cloroplastos, na parede celular e no espaço extracelular (Mittler, 2002). A peroxidase predominante é a peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) que catalisa a oxidação do ascorbato por peróxido de hidrogênio gerando o desidroascorbato (Hideg, 1996). As APXs estão presentes no citosol, nas mitocôndrias, nos peroxissomos, no apoplasto e, principalmente, nos cloroplastos (Mittler, 2002). As APXs participam com as redutases da glutathiona do ciclo ascorbato-glutathiona, que é induzido por estresse oxidativo (Smith *et al.*, 1989; Schraudner *et al.*, 1997; Noctor e Foyer, 1998). As redutases da glutathiona (GR, EC 1.8.1.7) reduzem a glutathiona oxidada, utilizando NAD(P)H, sendo a forma reduzida utilizada para regenerar o ascorbato, substrato da APX (Apel e Hirt, 2004), resultando em consumo de H₂O₂.

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, os tióis revestem-se de grande importância. A glutathiona, um tripeptídeo (γ -glu-cys-gly) hidrofílico, além de participar do ciclo ascorbato-glutathiona é capaz de consumir, quando reduzida, alguns RÓIS (Hideg, 1996). Outra função bastante importante da glutathiona é sua participação na síntese de fitoquelatinas (PC). As PCs são peptídeos não protéicos com a estrutura geral (γ -glu-cys)_n-gly, em que n varia de 2-11, que podem ser rapidamente sintetizadas em resposta a níveis tóxicos de metais pesados (Schmöger *et al.*, 2000). As PCs são enzimaticamente sintetizadas a partir da glutathiona pela sintase da fitoquelatina (PCS,

EC 2.3.2.15) e complexa o cádmio, o cobre, a prata e o arsênio (Schmöger *et al.*, 2000), conferindo tolerância a esses elementos tóxicos (Clemens, 2006).

Outros antioxidantes não enzimáticos de grande importância são os compostos fenólicos. Os flavonóides agindo como antioxidantes podem consumir ROIs e, ainda, quelatar íons metálicos que seriam capazes de participar da reação de Fenton (Valko *et al.*, 2006). Plantas submetidas ao As têm apresentado aumento na concentração de antocianinas (Guimarães, 2006).

Apesar de muitos estudos sobre a tolerância de plantas a metais pesados, e alguns sobre a tolerância ao As (Mylona *et al.*, 1998; Schmöger *et al.*, 2000; Hartley-Whitaker *et al.*, 2001; Mascher *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2004; Pawlik-Skowronska *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2004), ainda não existem informações suficientes para se entender a tolerância de plantas aquáticas a este elemento. Poucos estudos têm sido feitos com as espécies aquáticas *Lemna gibba*, *Salvinia minima* e *Azolla caroliniana*, potencialmente interessantes para fitorremediação de ambientes contaminados com As. Além disso, há enorme carência de trabalhos que demonstram os efeitos do As sobre os mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos comumente envolvidos em mecanismos de defesa ao estresse oxidativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e aclimação das plantas

Plantas aquáticas das espécies *Lemna gibba* L., *Salvinia minima* Baker e *Azolla caroliniana* Willd., obtidas no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa, foram aclimatadas por seis dias, em recipientes de polietileno (0,35 x 0,30 x 0,17 m), contendo 3 L de solução nutritiva de Clark (1975), pH 6,5, em sala de crescimento de plantas, com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2 °C, $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sob fotoperíodo de 16 horas, sendo a solução nutritiva trocada a cada três dias.

3.2. Efeito do As sobre o crescimento relativo e determinação da concentração deste elemento nas plantas

Após o período de aclimação, uma quantidade de plantas com aproximadamente 1 g de massa de matéria fresca foi transferida para vasos de vidro contendo 0,5 L da solução nutritiva de Clark, pH 6,5, contendo ou não As, na forma de Na_2HAsO_4 , nas concentrações de 0,0, 0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 mg L^{-1} . A massa da matéria seca inicial foi estimada a partir de amostras de plantas do mesmo lote daquelas utilizadas no experimento. No quinto dia a partir do início dos tratamentos, o experimento foi encerrado, e as plantas removidas e lavadas por 30 s em água corrente e desionizada. Em seguida, foram colocadas para secar em estufa convencional a 80 °C até a obtenção de massa seca constante.

As plantas secas em estufa 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). Amostras mineralizadas foram diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, analisadas por espectrofotometria de absorção atômica, para determinação dos teores de As.

As taxas de crescimento relativo das plantas foram calculadas utilizando-se a equação proposta por Hunt (1978):

$$R_w = (\ln w_1 - \ln w_0) \times 1000 / (t_1 - t_0), \text{ em que:}$$

- R_w = taxa de crescimento relativo, em termos de massa seca, no período experimental ($\text{mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$);
- $\ln w_1$ e $\ln w_0$ = logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente;
- $t_1 - t_0$ = duração do experimento (em dias).

3.3. Efeito do As sobre atividades enzimáticas, concentração de tióis e teor de antocianinas

Após o período de aclimação, amostras com aproximadamente 1 g de plantas foram transferidas para vasos de vidro com 0,5 L da solução nutritiva de Clark, pH 6,5, contendo ou não As, na forma de Na_2HAsO_4 , nas concentrações de 0,0, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 mg L^{-1} .

No terceiro dia a partir do início dos tratamentos, as plantas foram retiradas da solução nutritiva e lavadas por 30 s em água corrente e desionizada. A matéria fresca foi, posteriormente, utilizada na determinação das atividades enzimáticas, determinação da concentração de tióis e determinação do teor de antocianinas.

3.3.1. Extração e determinação das atividades enzimáticas

3.3.1.1. Extração e determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de plantas foram maceradas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L^{-1} , pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mmol L^{-1} , fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mmol L^{-1} e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 $\times g$ por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato bruto na determinação da atividade das dismutases do superóxido.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 5 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 7,8, contendo metionina 13 mmol L^{-1} , azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$, EDTA 0,1 mmol L^{-1} e riboflavina 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no

interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual tempo, serviu de branco e foi subtraída da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

3.3.1.2. Extração e determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de plantas foram maceradas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,8, EDTA 0,1 mmol L⁻¹, PMSF 1 mmol L⁻¹ e PVPP 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato bruto na determinação da atividade das catalases.

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

3.3.1.3. Extração e determinação da atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de plantas foram maceradas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,8, EDTA 0,1 mmol L⁻¹, PMSF 1 mmol L⁻¹ e PVPP 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato bruto na determinação da atividade das peroxidases.

A atividade das peroxidases foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mmol L⁻¹, pH 6,8, pirogalol 20 mmol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio 20 mmol L⁻¹ (Kar e Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mmol⁻¹ L cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em μmoles de H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹MF.

3.3.1.4. Extração e determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

Amostras de 0,3 g de plantas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 7,0, EDTA 1 mmol L⁻¹, ácido ascórbico 1 mmol L⁻¹, PMSF 1 mmol L⁻¹, ditioneitol (DTT) 2 mmol L⁻¹ e PVPP 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 *xg* por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade das APXs foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mmol L⁻¹ e H₂O₂ 1 mmol L⁻¹ (Nakano e Asada, 1981, modificado por Koshiba, 1993). O decréscimo na absorvância a 290 nm foi medido no primeiro minuto de reação, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mmol⁻¹ L cm⁻¹ (Nakano e Asada, 1981) e foi expresso em μmoles de ácido ascórbico min⁻¹ g⁻¹ MF.

3.3.1.5. Extração e determinação da atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de plantas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, EDTA 1 mmol L⁻¹, triton 0,02 % (p/v), DTT 2 mmol L⁻¹, PMSF 1 mmol L⁻¹ e PVPP 1 % (p/v) (Carlberg e Mannervik, 1985). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 *xg* por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante utilizado para análise da atividade enzimática.

A atividade das GRs foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5, GSSG 20 mmol L⁻¹, NADPH 2 mmol L⁻¹ (Carlberg e Mannervik, 1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm foi medido no primeiro minuto de reação, a 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mmol⁻¹ L cm⁻¹ e expressa em µmoles de glutathiona oxidada min⁻¹ g⁻¹ MF.

3.3.2. Efeito do arsênio sobre os teores de compostos tiolados

3.3.2.1. Extração de tióis

Amostras de 0,5 g de plantas foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionadas de 6 mL de meio de extração constituído de Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 8,0, EDTA 1 mmol L⁻¹ e ácido ascórbico 1 % (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 xg por 10 min, a 4 °C (Meuwly e Rauser, 1992) e o sobrenadante utilizado para a determinação do teor de tióis solúveis totais, tióis não-protéicos e tióis protéicos.

3.3.2.2. Determinação do teor de tióis totais

Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante, obtido conforme item 3.3.2.1., foram adicionadas a 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 mol L⁻¹, pH 8,2, 0,1 mL do reagente de Ellman [ácido 5,5' – ditio-bis (2-nitrobenzóico)] 0,01 mol L⁻¹ e 7,9 mL de metanol. Após 15 min de reação, a 37 °C, foi determinada a absorvância no comprimento de onda de 412 nm e, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 13100 mol⁻¹ L cm⁻¹, foi calculado o teor de tióis totais, expressando-se os resultados em nmoles de SH g⁻¹ MF (Sedlak e Lindsay, 1968).

3.3.2.3. Determinação do teor de tióis não-protéicos

Alíquotas de 5,0 mL do sobrenadante, obtido conforme item 3.3.2.1., foram adicionadas a 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50 % (p/v), e 4,0 mL de H₂O. Após 1 hora de repouso em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg durante 15 min. Às alíquotas de 2,0 mL do sobrenadante foram adicionados 4,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,4 mol L⁻¹, pH 8,9 e 0,1 mL de reagente de Ellman 0,01 mol

L⁻¹. Após 5 min, em temperatura ambiente, as absorvâncias foram lidas no comprimento de onda de 412 nm e, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 13100 mol⁻¹ L cm⁻¹, foi calculado o teor de tióis não protéicos, expressando-se os resultados em nmoles de SH g⁻¹ MF (Sedlak e Lindsay, 1968).

3.3.2.4. Determinação do teor de tióis protéicos

O teor de tióis protéicos foi calculado pela diferença entre o teor de tióis solúveis totais e o teor de tióis não-protéicos e os resultados foram, também, expressos em nmoles de SH g⁻¹ MF.

3.3.3. Extração e determinação dos teores de antocianinas

Amostras de 1 g de massa fresca de plantas foram maceradas com 15 mL de metanol acidificado com HCl (Kamperidou e Vasilakakis, 2006). As amostras foram deixadas em geladeira por 14 horas, filtradas e a absorvância dos extratos foi medida em 512 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica mL⁻¹ g⁻¹ MF.

3.4. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em esquema fatorial: 3 x 5 (espécies vegetais x concentrações de As) com 3 repetições, no delineamento inteiramente casualizado para as variáveis concentração de As nas plantas, TCR, e atividades de SOD, CAT, POX, APX e GR. Na determinação dos teores de tióis totais, não protéicos, protéicos e antocianinas, o experimento também foi conduzido no mesmo esquema fatorial, mas, com três blocos, no delineamento em blocos casualizados. Os resultados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, para doses equivalentes nas três espécies. Visando descrever um modelo de resposta às diferentes doses de As, por cada uma das espécies, foi realizada uma análise de regressão. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GENES (Cruz, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do As em solução sobre a concentração deste elemento nas plantas

As espécies de plantas aquáticas *L. gibba* e *S. minima*, expostas a diferentes concentrações de As em solução, diferiram significativamente entre si quanto ao teor de As apenas na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de As. A espécie *A. caroliniana*, de modo geral, diferiu das demais apresentando os menores teores de As (Quadro 1).

Diferentes espécies vegetais têm apresentado divergentes padrões de acúmulo de As quando expostas a este metalóide mas, em geral, ocorre aumento na absorção de As com a elevação da concentração desse elemento em solução (Kertulis *et al.*, 2005; Baldwin *et al.*, *in press*).

Quadro 1 – Teores de As em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Teor de As (µg g ⁻¹ MS)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	75,4 a	36,2 a	2,1 a
0,25	209,0 a	4201,5 a	258,0 a
0,5	271,2 b	710,2 a	345,6 b
1,0	323,5 b	1035,1 a	1291,1a
1,5	386,1 b	1291,1 a	1273,0 a

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os teores de As aumentaram com o incremento da concentração deste elemento em solução nas três espécies, ocorrendo de forma mais intensa em *L. gibba* e em *S. minima* (Figura 1). O padrão de elevação dos teores de As apresentado por estas espécies revela que, possivelmente, as concentrações utilizadas não foram suficientemente grandes para promover a saturação dos mecanismos de absorção e acúmulo desse elemento.

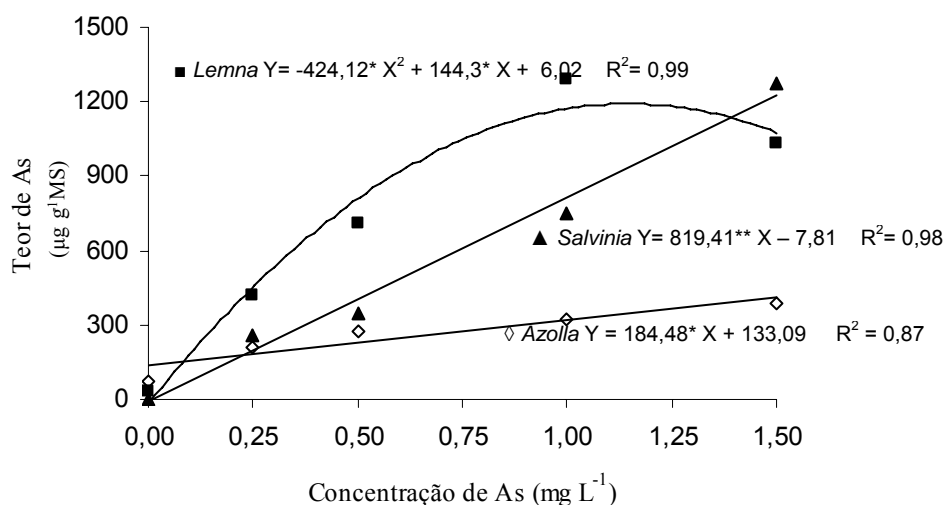


Figura 1 – Teor de As em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* em função de diferentes concentrações de As.

A espécie *A. caroliniana* apresentou os menores incrementos nos teores de As em relação às concentrações externas, o que pode ser parte de um mecanismo de sobrevivência, protegendo-a, assim, dos efeitos tóxicos do As.

Várias observações têm sido feitas em relação a plantas que crescem em locais contaminados com vários elementos químicos tóxicos, as quais necessitam desenvolver mecanismos de escape ou de tolerância à toxicidade dos elementos para a manutenção da sobrevivência. Neste sentido, Sharples *et al.* (2000) não demonstraram efeitos tóxicos do As em *Holcus lanatus*, *Agrostis capillaris* e *Deschampsia cespitosa* crescendo em locais contaminados com este metalóide, sugerindo que estas plantas possuem algum mecanismo de exclusão do As. Estratégias de sobrevivência à presença de elementos tóxicos que se baseiam na exclusão não são interessantes em programas de fitorremediação, uma vez que a bioacumulação é o principal critério na escolha de plantas para despoluição ambiental (Xia e Ma, 2006).

Trabalhos desenvolvidos com *Oryza sativa* (Geng *et al.*, 2005) e com *L. gibba*, *A. caroliniana* e *S. minima* (Guimarães, 2006), expostas a concentrações crescentes de As, mostraram elevação dos teores de As nas plantas. Os teores de As observados no presente trabalho, entretanto, foram superiores àqueles apresentados por Guimarães (2006), mesmo tendo sido utilizadas concentrações maiores do metalóide em solução. Tal fato pode ser explicado pela menor concentração de fosfato utilizada na solução

nutritiva de cultivo das plantas neste experimento. Devido às semelhantes estruturas químicas, o arsenato e o fosfato são absorvidos nas plantas por um mesmo transportador, sendo que, quanto menor a concentração de fosfato em solução, maior a absorção de As pelas macrófitas (Guimarães, 2006).

4.2. Efeito do arsênio sobre a taxa de crescimento relativo

O cultivo das três espécies de plantas aquáticas em solução nutritiva, sem adição de As, revelou que elas diferem entre si quanto ao crescimento relativo. Os maiores valores de taxa de crescimento foram observados em *L. gibba*, seguidos de *A. caroliniana* e de *S. minima* (Quadro 2). Quando expostas ao As, *L. gibba* passou a ter TCR significativamente superior à de *S. minima* em todas as concentrações utilizadas, mas não diferiu de *A. caroliniana* a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹, em que se observou drástica redução na taxa de crescimento relativo em *S. minima* (Quadro 2).

A. caroliniana, por sua vez, apresentou valores de TCR superiores àquelas obtidas por *S. minima* em quase todas as concentrações de As estudadas, exceto em 0,25 mg L⁻¹ (Quadro 2).

Modificações na TCR têm sido utilizadas para diferenciação da tolerância de espécies vegetais quanto aos efeitos de elementos químicos tóxicos. Assim, alta TCR, associada ao bioacúmulo do poluente, é uma das características requeridas para utilização de espécies vegetais em programas de fitorremediação (Vissottiviseth *et al.*, 2002). Neste aspecto, observa-se que a espécie *L. gibba* apresenta ampla predominância sobre as demais espécies, principalmente em menores concentrações de As em solução.

A exposição das três espécies de plantas ao As resultou em significativo decréscimo da taxa de crescimento relativo, sendo de forma mais intensa em *S. minima*, na qual ocorreu morte das plantas nas doses acima de 0,81 mg L⁻¹ (Figura 2). Observa-se que a espécie *A. caroliniana* apresentou os menores decréscimos na TCR, o que pode estar associado, em parte, aos menores teores de As (Quadro 1), prevenindo, assim, a ação tóxica do elemento sobre os diversos processos fisiológicos.

Quadro 2 – Taxa de crescimento relativo de *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Taxa de crescimento relativo (mg g ⁻¹ MS dia ⁻¹)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	109,97 b	181,61 a	70,66 c
0,25	76,98 b	174,19 a	45,62 b
0,5	72,03 b	151,36 a	10,4 c
1,0	62,69 a	50,93 a	-0,44 b
1,5	56,94 a	27,26 a	-14,8369 b

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

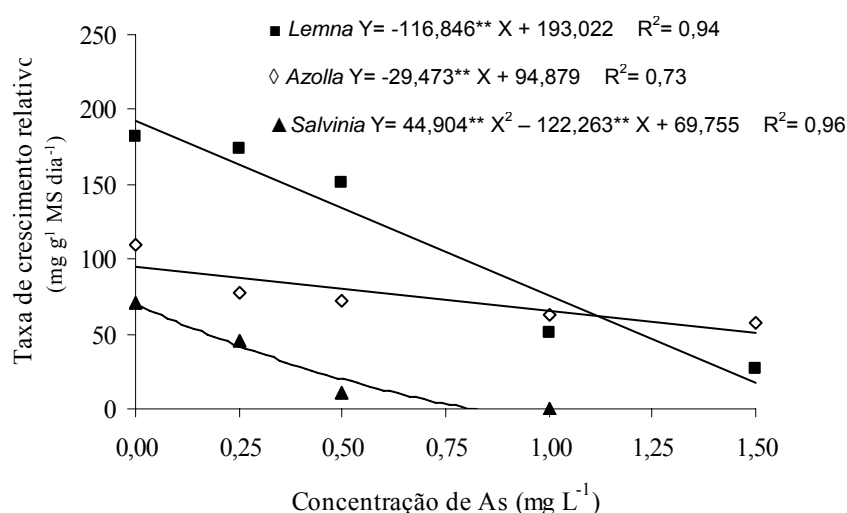


Figura 2 – Taxa de crescimento relativo de *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* em função de diferentes concentrações de As.

As concentrações de As em solução capazes de promover redução de 50% na TCR variaram consideravelmente entre as espécies, sendo de 1,61 mg L⁻¹ em *A. caroliniana*, seguidas de 0,83 mg L⁻¹ para *L. gibba* e de 0,32 mg L⁻¹ para *S. minima*.

Entretanto, quando se relaciona a redução de 50% na TCR com os teores de As nas plantas, verifica-se que a espécie *L. gibba* apresenta a maior tolerância, requerendo 967,6 µg g⁻¹MS, seguida de *A. caroliniana*, com 429,2 g g⁻¹MS e, demonstrando ser a mais sensível, *S. minima*, com 255,08 g g⁻¹MS.

Mkandawire *et al.* (2006), em experimentos realizados também com *L. gibba*, obtiveram diminuição do crescimento após exposição dessa macrófita ao As. De forma similar, outras espécies, quando expostas ao As, têm apresentado redução na TCR (Pawlik-Skowronska *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, *in press*; Li *et al.*, *in press*). Essa diminuição no crescimento relativo pode estar relacionada à redução no conteúdo de clorofilas (Päivöke e Simola, 2001) e conseqüente redução na fotossíntese e, ainda, na diminuição do processo respiratório (Päivöke e Simola, 2001; Mascher *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos realizados com *A. caroliniana*, *L. gibba* e *S. minima* têm relatado que, além do As, outros elementos químicos tóxicos diminuem a TCR dessas espécies (Vermaat e Hanif, 1998; Nichols *et al.*, 2000; Bennicelli *et al.*, 2004; Guimarães, 2006). Diferentemente, Cao *et al.* (2004) observaram incremento na biomassa de *Pteris vittata* cultivadas em solo com adição de pequenas doses de As. Isso, possivelmente, pode ser devido à semelhança entre o arsenato e o fosfato, que causaria a dessorção do fosfato do solo, disponibilizando maior concentração de fósforo para a planta. Maiores concentrações de As no solo, no entanto, levaram ao decréscimo da biomassa em *P. vittata*.

A utilização de macrófitas para o tratamento de efluentes, sejam industriais ou sanitários, é uma alternativa que já tem sido utilizada, representando, portanto, um recurso de elevado potencial econômico e ecológico. Em concordância com os critérios de seleção de espécies para fitorremediação, como ganho de biomassa e bioacumulação de As (Vissottiviseth *et al.*, 2002), a espécie *L. gibba* foi a que exibiu melhor desempenho para ser empregada em projetos de despoluição ambiental. Embora *S. minima* também tenha apresentado uma elevada bioacumulação de As, sua TCR foi muito baixa, quando comparada à de *L. gibba*.

4.3. Efeito do As sobre as atividades enzimáticas

4.3.1. Efeito do As sobre a atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

As três espécies de plantas utilizadas não apresentaram diferenças na atividade da SOD quando expostas às concentrações de As em solução de 0,0, 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ (Quadro 3). Nas demais concentrações, no entanto, a atividade da SOD foi significativamente maior em *L. gibba* (Quadro 3).

Quadro 3 – Atividade da dismutase do superóxido em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Atividade de SOD (Unidades de SOD g ⁻¹ MF)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	1,42 a	7,44 a	2,78 a
0,25	2,62 a	8,10 a	3,50 a
0,5	5,40 a	9,53 a	5,38 a
1,0	6,77 b	23,88 a	7,79 b
1,5	4,68 b	12,33 a	2,17 b

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A exposição das plantas ao As revelou aumento significativo na atividade da SOD nas espécies *S. minima* e *L. gibba*, tendo os maiores valores sendo observados em torno da concentração externa de As de 0,8 e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente, seguida de decréscimo nas concentrações mais elevadas (Figura 3). Conforme se verifica, tanto o incremento como a atividade absoluta da SOD em *L. gibba*, quando exposta ao As, foram significativamente superiores àquelas apresentadas pelas demais espécies, sugerindo ser esta espécie capaz de eliminar mais ROIS e, portanto, sofrer menos danos oxidativos.

O radical superóxido e os seus derivados, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, são os principais causadores de danos oxidativos aos componentes celulares (Mittler, 2002). Os radicais superóxido transformam-se espontaneamente em H₂O₂, porém a reação é mais efetiva se for catalisada pelas SODs. Entretanto, a participação conjunta de outras enzimas capazes de degradar o H₂O₂ é de fundamental importância, a fim de manter normal a quantidade de ROIs nas células (Valko *et al.*, 2006). Dessa forma, a ação das dismutases do superóxido constitui-se na primeira defesa das plantas contra o estresse oxidativo, o que reforça a idéia de que a maior atividade dessas enzimas é importante característica de tolerância (Apel e Hirt, 2004).

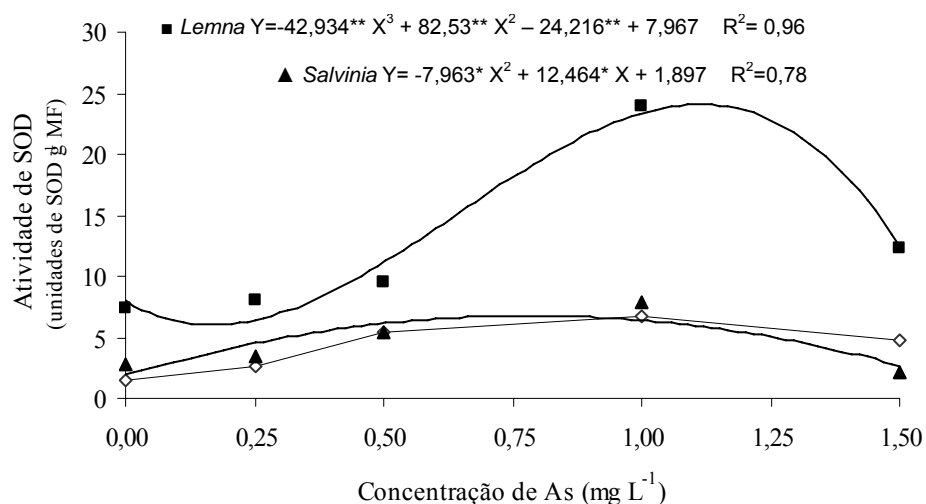


Figura 3 – Atividade da dismutase do superóxido em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* em função de diferentes concentrações de As.

Aumento na atividade de SOD com a elevação da concentração de As no meio foi observado em *Pteris vittata* (Cao *et al.*, 2004), em *Holcus lanatus* (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001), em *Lycopersicon esculentum* e em *Zea mays* (Miteva e Psycheva, 1999). Assim como nestas espécies, no presente trabalho, observa-se aumento na atividade de SOD em *L. gibba*, após exposição ao As. Na maior concentração de As, entretanto, o efeito tóxico do As superou a atuação desta enzima, resultando, possivelmente, em estresse oxidativo.

Plantas submetidas a outros agentes tóxicos têm apresentado atividades de SOD análogas às de *Lemna*. *Hordeum vulgare* teve aumentos na atividade de SOD com a elevação da concentração de cádmio no meio (Tiryakioglu *et al.*, *in press*), já *Ceratophyllum demersum* exibiu aumento de atividade, quando exposta a elevadas concentrações de chumbo (Mishra *et al.*, *in press*), ambas sofrendo diminuições em concentrações ainda maiores.

4.3.2. Efeito do As sobre a atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

O cultivo das três espécies de plantas aquáticas em solução nutritiva, sem adição de As, revelou que *L. gibba* foi a espécie que apresentou maiores valores de atividade da catalase, não ocorrendo diferenças na atividade de CAT entre as outras duas espécies

(Quadro 4). Resposta semelhante foi também observada quando as plantas foram expostas à concentração de 0,5 mg L⁻¹ de As em solução (Quadro 4).

Na concentração de As em solução de 0,25 mg L⁻¹ a atividade de CAT na espécie *S. minima* foi significativamente menor que as demais espécies, mas nas concentrações de 1,0 e 1,5 mg L⁻¹ de As, as três espécies não diferiram entre si (Quadro 4).

Quadro 4 – Atividade da catalase em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Atividade de CAT (µmol de H ₂ O ₂ min ⁻¹ g ⁻¹ MF)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	20,56 b	32,67 a	11,69 b
0,25	37,72 a	41,31 a	16,80 b
0,5	25,22 b	37,26 a	16,64 b
1,0	24,19 a	23,27 a	20,43 a
1,5	17,12 a	20,15 a	11,15 a

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A atividade da catalase em *A. caroliniana* e em *S. minima* mostrou discreto acréscimo até a concentração de, aproximadamente, 0,4 e 0,7 mg L⁻¹ de As em solução, respectivamente, com redução de atividade em concentrações mais elevadas de As. Em *L. gibba*, a maior atividade foi observada nas plantas-controle, havendo significativo decréscimo nas maiores concentrações de As (Figura 4). Esta observação sugere que, possivelmente, os efeitos tóxicos do As superaram a atuação deste mecanismo antioxidante, o que pode estar relacionado à oxidação da catalase por ROIs em maiores concentrações de As. A oxidação da catalase têm sido detectada por outros autores e essa modificação parece ocorrer no grupo heme da enzima (Ronsein *et al.*, 2006).

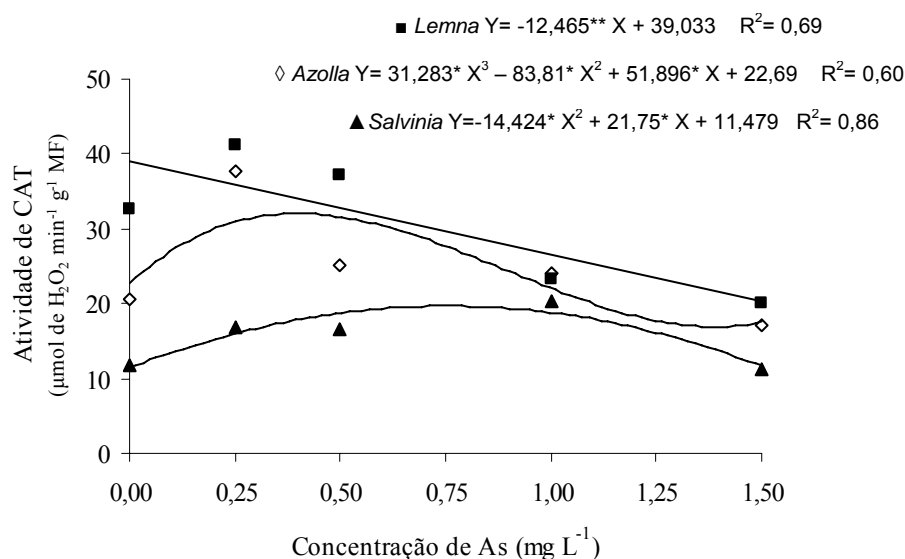


Figura 4 – Atividade da catalase em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* em função de diferentes concentrações de As.

A catalase é uma enzima antioxidante que é produzida por plantas sob condições de estresse oxidativo na presença de metais pesados (Sairam *et al.*, 1998). Cao *et al.* (2004) trabalhando com *Pteris vittata* submetida a cinco diferentes concentrações de As obtiveram resultados semelhantes aos observados em *A. caroliniana* neste trabalho. A atividade da CAT sofreu aumentos apenas em baixas concentrações, tendo sua atividade diminuída em maiores concentrações do metalóide, analogamente aos resultados obtidos em milho submetido ao As (Mylona *et al.*, 1998).

Vários fatores podem afetar a atividade desta enzima, como o agente tóxico estressante, sua concentração, o tempo de exposição e a espécie vegetal, o que, de certa forma, pode fazer com que a atividade dessa enzima sofra grandes variações (Patra *et al.*, 2004). Tais observações ficam evidentes em diversos trabalhos, como no de Mishra *et al.* (*in press*), em que houve aumento na atividade da catalase quando *Ceratophyllum demersum* foi exposta ao Pb, mas, contrariamente, Tiryakioglu *et al.* (*in press*) não observaram variações na atividade de CAT ao expor *Hordeum vulgare* a diferentes concentrações de cádmio.

4.3.3. Efeito do As sobre a atividade de peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases foi significativamente maior em *L. gibba*, quando comparada com as demais espécies, em quaisquer das concentrações de As utilizadas

(Quadro 5). Em *L. gibba* a atividade das POXs foi até seis vezes maior que aquela observada em *A. caroliniana* e *S. minima*, sugerindo que a maior tolerância de *L. gibba* aos efeitos tóxicos do As possa ser devida, também, à maior atividade desta enzima. *A. caroliniana* e *S. minima* não diferiram entre si quanto à atividade de peroxidases quando expostas às diversas concentrações de As (Quadro 5). Peroxidases parecem possuir importante papel no metabolismo de xenobióticos em diversas espécies vegetais, inclusive em macrófitas aquáticas, sendo uma das principais enzimas na resposta ao estresse provocado por substâncias tóxicas (Roy *et al.*, 1992), inclusive pelo As (Cao *et al.*, 2004).

Quadro 5 – Atividade de peroxidases em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Atividade de POX (μmol de purpurogalina min ⁻¹ g ⁻¹ MF)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	0,73 b	4,29 a	0,27 b
0,25	0,85 b	6,17 a	0,37 b
0,5	0,82 b	6,63 a	0,48 b
1,0	1,02 b	2,83 a	0,51 b
1,5	0,75 b	2,70 a	0,32 b

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Embora muitos autores tenham observado o aumento na atividade de peroxidases após tratamento de plantas com As (Mascher *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2004), a presença desse metalóide no presente estudo não acarretou em alterações nas atividades dessa enzima em *A. caroliniana* e em *S. minima* (Figura 5). *Lemna gibba*, embora já apresentasse atividade de POX elevada em condições normais, sofreu, apenas, pequenos aumentos de atividade, com expressiva redução a partir de 0,5 mg L⁻¹, o que pode indicar a perda da participação dessa enzima em reverter ou proteger a ação tóxica do As nestas maiores concentrações, semelhantemente ao que ocorreu com as dismutases do superóxido e com as catalases neste trabalho (Figura 5).

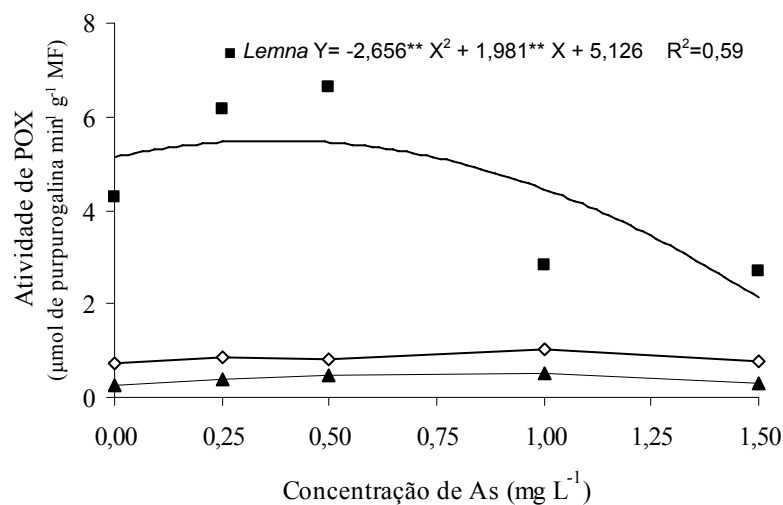


Figura 5 – Atividade da peroxidase em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* em função de diferentes concentrações de As.

Assim como o observado em *L. gibba*, ligeiros aumentos nas atividades de POX têm sido exibidas por diferentes espécies quando a concentração de As no meio é baixa (Mascher *et al.*, 2002; Miteva *et al.*, 2005). Além da susceptibilidade desta enzima aos efeitos tóxicos do As em maiores concentrações, as atividades superiores de POX em altas concentrações estão em concordância com Mittler (2002). Segundo este autor, as peroxidases, assim como catalases, degradam o peróxido de hidrogênio, mas as afinidades dessas enzimas pelo H₂O₂ são de ordens diferentes. Como as peroxidases apresentam maior afinidade pelo H₂O₂, sugere-se que elas sejam responsáveis pela modulação fina, e portanto, envolvidas na sinalização, enquanto a CAT atua na remoção do excesso de ROS durante o estresse.

4.3.4. Efeito do As sobre a atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

As espécies *A. caroliniana* e *L. gibba* apresentaram atividades de APX significativamente superiores à de *S. minima* em qualquer concentração de As. Nas concentrações de 0,25 e 1,0 mg L⁻¹ de As a espécie *A. caroliniana* apresentou as maiores atividades de APX, não diferindo daquelas obtidas em *L. gibba* nas demais concentrações (Quadro 6).

Quadro 6 – Atividade da peroxidase do ascorbato em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Atividade de APX (μmol de ácido ascórbico min ⁻¹ g ⁻¹ MF)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	10,17 a	10,56 a	2,55 b
0,25	16,17 a	9,03 b	2,91 c
0,5	8,31 a	8,73 a	3,54 b
1,0	7,14 a	4,42 b	1,51 c
1,5	4,98 a	3,62 a	1,80 b

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

De modo geral, foi observado que a exposição das plantas ao As resultou em decréscimo nas atividades de APX, embora tenham existido diferenças no padrão de resposta apresentado pelas três espécies. *Salvinia minima* exibiu discreto incremento na atividade de APX, seguido por diminuições. *Azolla caroliniana* e *L. gibba* apresentaram decréscimos sucessivos da atividade à medida que se aumentava a concentração de As em solução (Figura 6).

As peroxidases do ascorbato agem contra os intermediários reativos de oxigênio degradando o H₂O₂, mas, diferentemente de outras enzimas, a APX requer ascorbato e depende de um sistema de regeneração de glutathiona reduzida, o ciclo ascorbato-glutathiona (Noctor e Foyer, 1998). Os ROIs formados durante o estresse oxidativo causado por metais pesados parecem inibir diretamente a síntese de enzimas antioxidantes e também da rota da glutathiona (Mazhoudi *et al.*, 1997), sendo possível, portanto, justificar os decréscimos encontrados na atividade da APX quando plantas são submetidas ao As, uma vez que este metalóide parece induzir o aumento de ROIs nas células (Singh *et al.*, 2005).

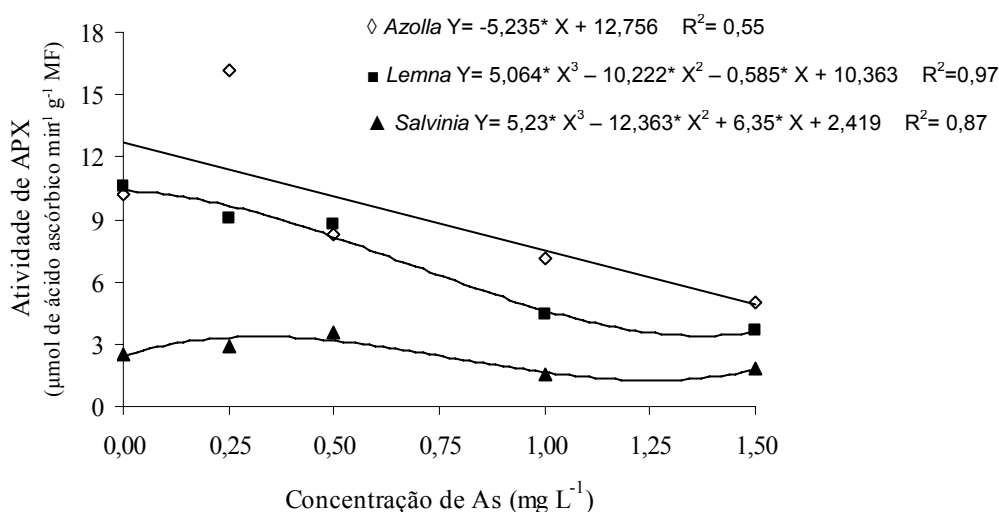


Figura 6 – Atividade da peroxidase do ascorbato em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* em função de diferentes concentrações de As.

Dada a importância dessa enzima na defesa antioxidante das plantas, o aumento de sua atividade tem sido apresentado por várias espécies quando expostas a diferentes agentes tóxicos (Monnet *et al.*, *in press*; Mishra *et al.*, *in press*). Como observado em *S. minima* neste trabalho, *Pteris vittata* submetida a diferentes concentrações de As (Cao *et al.*, 2004) apresentou incremento na atividade de APX, mas em concentrações maiores a atividade dessa enzima foi diminuída, sugerindo que também nestas espécies os efeitos tóxicos do As superaram a atuação deste mecanismo antioxidante.

4.3.5. Efeito do As sobre a atividade da redutase da glutatona (GR, EC 1.8.1.7)

As plantas controle das três espécies não diferiram entre si em relação à atividade das redutases da glutatona (Quadro 7). Sob exposição ao As, no entanto, na concentração de 0,25 mg L⁻¹, *L. gibba* apresentou atividade maior que *A. caroliniana*, mas esta espécie não diferiu dos valores observados em *S. minima*. As diferenças entre as três espécies foram marcantes apenas na concentração de 1,0 mg L⁻¹, em que *L. gibba* apresentou maior atividade de GR que *A. caroliniana* e esta maior que a de *S. minima*. Nos demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas de atividades entre as espécies (Quadro 7).

Quadro 7 – Atividade da redutase da glutaciona em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Atividade de GR (μmol de glutaciona oxidada min ⁻¹ g ⁻¹ MF)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	0,09 a	0,32 a	0,25 a
0,25	0,16 b	0,44 a	0,30 ab
0,5	0,35 a	0,52 a	0,53 a
1,0	0,66 b	1,35 a	0,35 c
1,5	0,02 a	0,02 a	0,17 a

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A atividade da GR apresentou padrão de resposta em relação ao As similar nas espécies *L. gibba* e *A. caroliniana* (Figura 7). A atividade da enzima aumentou com a concentração de As atingindo os maiores valores em torno de 1,0 mg L⁻¹, passando a decrescer até a última concentração de As estudada. A atividade de GR em *L. gibba*, contudo, foi sempre superior àqueles observados em *A. caroliniana* (Figura 7).

A espécie *S. minima*, por sua vez, apresentou ligeiro incremento de atividade com o aumento da concentração de As até, aproximadamente, 0,7 mg L⁻¹. Nas concentrações mais elevadas a atividade de GR também sofreu decréscimo, embora em menor intensidade do que aquela observada nas outras espécies.

Em *Lycopersicon esculentum* (Dong e Zhang, 2006), *Sesbania drummondii* (Israr *et al.*, *in press*), *Dermatocarpon luridum* (Monnet *et al.*, *in press*) e *Ceratophyllum demersum* (Mishra *et al.*, *in press*) a atividade de GR também aumentou sob estresse oxidativo. Essa enzima participa do ciclo ascorbato-glutaciona regenerando glutaciona reduzida, utilizando o NADPH como agente redutor. Sua participação nesse ciclo é imprescindível para a manutenção da homeostase celular durante o estresse causado por ROIs (Noctor e Foyer, 1998). Assim como as outras enzimas antioxidantes, a GR teve sua atividade reduzida em altas concentrações de As, sugerindo que esta enzima também pode apresentar susceptibilidade aos efeitos tóxicos do As em maiores concentrações. Reduções na atividade de GR também foram observadas em outros

organismos quando expostos a altas concentrações de As (Bhattacharya e Bhattacharya, *in press*).

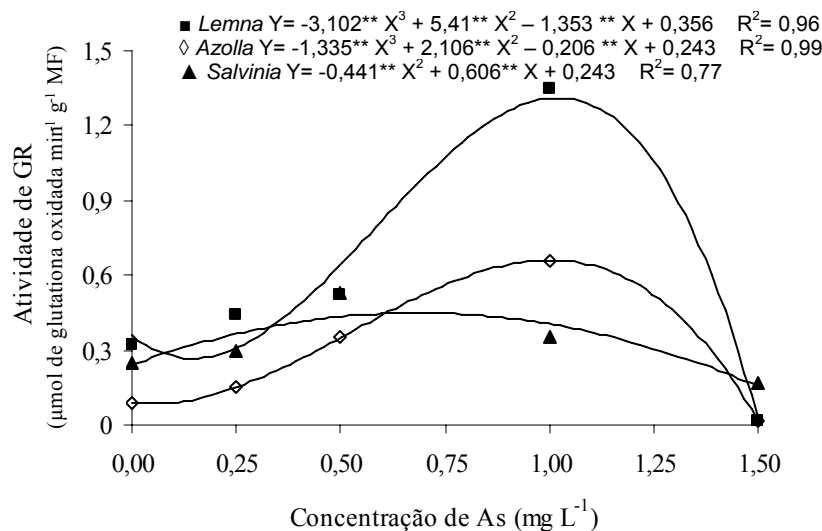


Figura 7 – Atividade da redutase da glutatona em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* em função de diferentes concentrações de As.

4.4 Efeito do As sobre os teores de tióis solúveis totais, tióis não-protéicos e tióis protéicos

Lemna gibba foi a espécie que apresentou os maiores teores de tióis solúveis totais em quaisquer das concentrações de As testadas, enquanto as espécies *A. caroliniana* e *S. minima* não diferiram significativamente entre si (Quadro 8).

Em *L. gibba*, após exposição ao As, foram observados teores mais elevados de tióis não-protéicos nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. Na maior concentração de As utilizada as três espécies não diferiram entre si (Quadro 9).

A exposição das três macrófitas ao As mostrou que, de modo geral, *L. gibba* exibiu teores de tióis protéicos semelhantes aos de *S. minima* e maiores que *A. caroliniana* (Quadro 10).

Os teores de tióis totais, não-protéicos e protéicos não tiveram alterações significativas em *A. caroliniana* exposta às diferentes concentrações de As (Figura 8). Possivelmente, nestas concentrações de As, esta espécie utiliza outras estratégias de sobrevivência que não envolvem a participação de compostos tiólicos. Uma destas estratégias poderia ser a prevenção do estresse através de menor absorção do elemento

tóxico (Sharples *et al.*, 2000). Isto parece estar de acordo com os teores de As observados nesta espécie após exposição a este metalóide (Figura 1).

Em *S. minima*, os teores de tióis totais e não-protéicos, também, não apresentaram variações significativas nas diversas concentrações de As utilizadas na solução de cultivo (Figura 8). Os teores de tióis protéicos, contudo, aumentaram até a concentração de 0,7 mg L⁻¹ de As, mas sofreram decréscimos nas concentrações mais elevadas. O aumento dos teores de tióis protéicos parece não ter participação efetiva nos mecanismos de tolerância que envolvam diretamente a participação de compostos tiólicos. Entretanto, eles podem estar relacionados com o aumento na síntese de algumas enzimas que atuam no processo antioxidante, como as catalases, dismutases do superóxido e redutases da glutatona, as quais possuem cisteína em suas estruturas (National Center for Biotechnology Information).

Quadro 8 – Teores de tióis solúveis totais em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Teores de tióis totais (nmol de SH g ⁻¹ MF)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	358,45 b	2148,68 a	196,97 b
0,25	443,18 b	4820,82 a	523,35 b
0,5	539,32 b	4678,96 a	1180,03 b
1,0	596,18 b	3486,91 a	572,17 b
1,5	779,20 b	2523,33 a	289,49 b

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quadro 9 – Teores de tióis não-protéicos em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Teores de tióis não-protéicos (nmol de SH g ⁻¹ MF)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	263,55 ab	1285,18 a	13,29 b
0,25	289,40 b	3956,31 a	112,84 b
0,5	318,72 b	4097,44 a	313,12 b
1,0	336,06 b	2686,58 a	174,51 b
1,5	391,89 a	1342,62 a	88,30 a

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quadro 10 – Teores de tióis protéicos em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Teores de tióis protéicos (nmol de SH g ⁻¹ MF)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	94,90 b	863,50 a	183,68 b
0,25	153,78 b	864,51 a	410,51 ab
0,5	220,59 b	581,52 ab	866,90 a
1,0	260,12 b	800,32 a	397,66 ab
1,5	387,31 b	1180,70 a	201,20 b

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

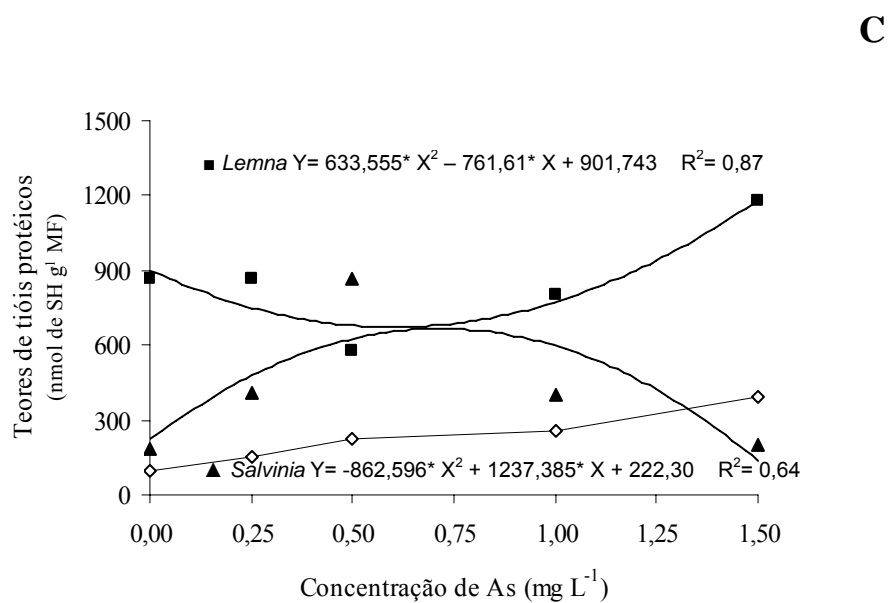
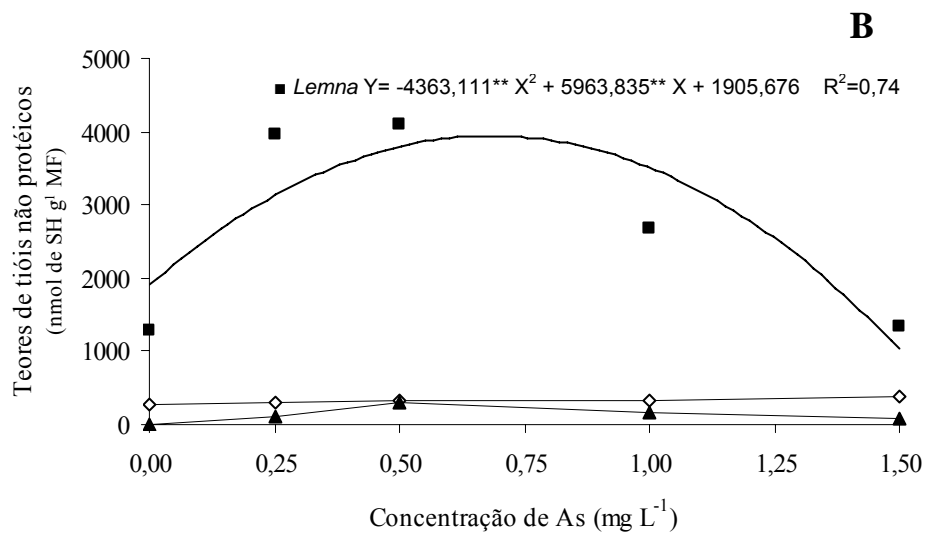
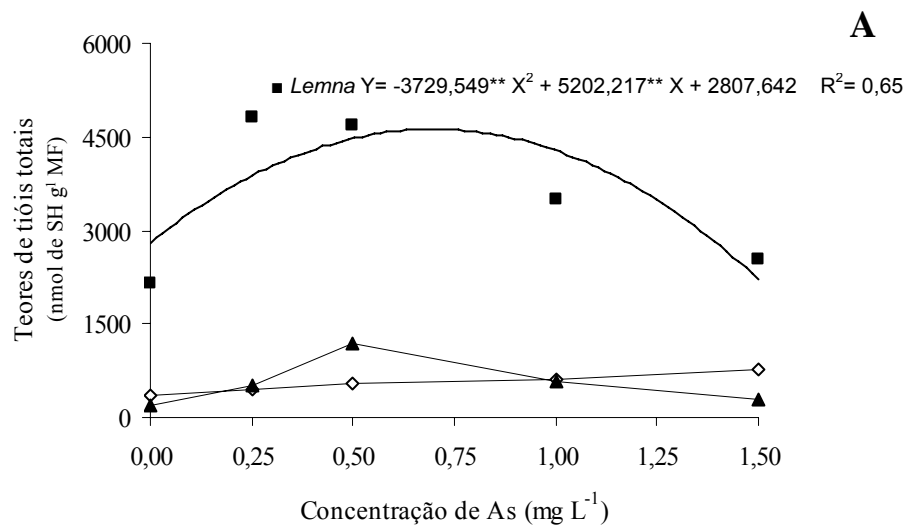


Figura 8 – Teores de tióis totais (A), tióis não-protéicos (B) e tióis protéicos (C) em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* em função de diferentes concentrações de As.

Em *L. gibba* os teores de tióis totais e não-protéicos aumentaram expressivamente até a concentração de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de As na solução de cultivo, sendo observado decréscimo nas concentrações mais elevadas de As. Os teores de tióis protéicos, por outro lado, decresceram nas concentrações de As até, aproximadamente, $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de As, sofrendo acréscimos nas concentrações mais elevadas. Assim, o padrão de alteração nos teores de tióis não-protéicos e protéicos sugere que, nas menores concentrações de As, pode ocorrer maior síntese de compostos tiólicos não-protéicos em detrimento dos protéicos, os quais seriam fundamentais no processo de tolerância das espécies vegetais expostas a concentrações tóxicas de As. Cai *et al.* (2004) sugerem que a tolerância de *Pteris vittata* ao As pode ser devida ao aumento na concentração de tióis não-protéicos apresentado por esta espécie, após exposição a várias concentrações desse metalóide.

Assim, grandes variações nos teores das frações tiólicas foram observadas em *L. gibba* (Figura 8), o que pode estar relacionado às características de tolerância desta espécie à presença do As (Pawlik-Skowronska *et al.*, 2004). Esta espécie, quando cultivada em solução nutritiva sem adição de As, apresentou, de modo geral, teores de tióis totais, não-protéicos e protéicos superiores àqueles obtidos nas demais espécies. Estes elevados teores basais dos tióis em *L. gibba* sugerem ter esta espécie potencial para tolerar estresses que necessitam da atuação de mecanismos que envolvam a participação destes componentes químicos (Cao *et al.*, 2004). Esta evidência se confirma pelo fato de que, mesmo quando as plantas são expostas ao As, os teores de tióis se mantêm superiores àqueles obtidos nas outras espécies.

Tem sido sugerido que o aumento na concentração de tióis não-protéicos em plantas expostas ao As confere maior resistência para estes vegetais (Schmöger *et al.*, 2000; Hartley-Whitaker *et al.*, 2001; Singh *et al.*, *in press*; Dong *et al.*, *in press*). A composição das várias frações de tióis pode ser indicativa da tolerância de plantas ao estresse oxidativo (Valko *et al.*, 2006) e do estresse provocado por metais pesados (Cai

et al., 2004), uma vez que compostos como glutatona reduzida e fitoquelatinas compõem a fração de tióis não-protéicos.

As fitoquelatinas são polipeptídeos capazes de quelatar o As e transportá-lo ao vacúolo, impedindo seu efeito tóxico sobre a célula. Aumento na concentração de fitoquelatinas após exposição ao As foi observado em *Holcus lanatus* (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001) e *Stichococcus bacillaris* (Pawlik-Skowronska *et al.*, 2004). A glutatona, além de participar da biossíntese de fitoquelatinas, possui papel fundamental no funcionamento do ciclo ascorbato-glutatona, consumindo diretamente algumas espécies reativas de oxigênio. Incremento nos teores de glutatona reduzida após exposição ao As foi exibido por *Pteris vittata* (Cai *et al.*, 2004; Singh *et al.*, *in press*). Em *L. gibba*, novos estudos são necessários para se conhecer os constituintes responsáveis pelo aumento dos tióis não-protéicos.

4.5. Efeito do As sobre a concentração de antocianinas

Dentre as três espécies estudadas *L. gibba* foi a que apresentou os mais elevados teores de antocianinas quando submetida às diferentes concentrações de As em solução (Quadro 11). As espécies *A. caroliniana* e *S. minima* não diferiram entre si em nenhuma das concentrações de As estudadas (Quadro 11).

A biossíntese e o acúmulo de compostos fenólicos é uma das respostas de plantas aos diferentes estresses bióticos e abióticos (Juszczuk *et al.*, 2004). Os maiores teores de antocianinas observados em *L. gibba* podem estar relacionados com sua participação como agentes antioxidantes, protegendo as células contra os radicais livres produzidos por diversas vias metabólicas, conforme sugerido por Rice-Evans *et al.* (1997).

Quadro 11 – Teores de antocianinas em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* submetidas a diferentes concentrações de As em solução nutritiva.

Concentração de As (mg L ⁻¹)	Teores de antocianinas (Unidades de absorvância mL ⁻¹ g ⁻¹ MF)		
	<i>A. caroliniana</i>	<i>L. gibba</i>	<i>S. minima</i>
0,0	0,03 b	0,09 a	0,02 b
0,25	0,04 b	0,12 a	0,02 b
0,5	0,04 b	0,14 a	0,02 b
1,0	0,04 b	0,15 a	0,03 b
1,5	0,05 b	0,18 a	0,04 b

1. As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os teores de antocianinas aumentaram com o aumento da concentração do metalóide no meio de cultivo nas três espécies vegetais (Figura 9). Em *L. gibba*, o incremento foi muito mais expressivo que nas outras espécies e o teor que já era maior nas plantas-contrôle tornou-se ainda maior nas concentrações mais elevadas.

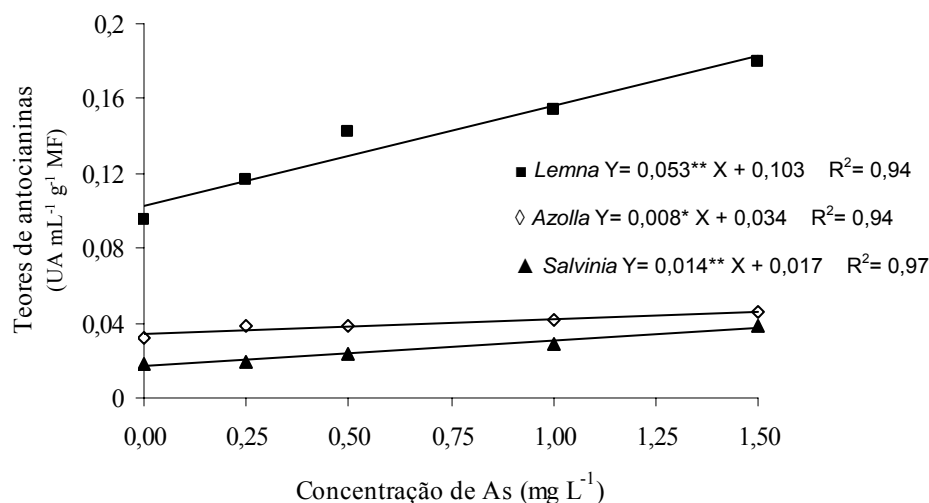


Figura 9 – Teores de antocianinas em *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia minima* em função de diferentes concentrações de As.

As antocianinas, grupo mais comum de flavonóides, são metabólitos secundários que podem ser produzidos em resposta a deficiência de fosfato (Marschner, 1995). O arsenato por ser análogo ao fosfato, compete pelos mesmos sítios de absorção (Tu *et al.*, 2004; Mkandawire *et al.*, 2005), fazendo com que plantas expostas ao As, na forma de arsenato, possam apresentar deficiência de fosfato, exibindo coloração arroxeada nas folhas, como observado em *A. caroliniana* e em *L. gibba* neste trabalho.

Aparentemente, *L. gibba* sofreu maior deficiência de fosfato que as outras espécies, induzindo maior síntese e acúmulo de antocianinas que, por sua vez, lhe conferiu maior tolerância ao As, pois, além de consumir diretamente ROIs, os flavonóides são capazes de quelatar íons metálicos que seriam capazes de participar da reação de Fenton, impedindo, finalmente, a oxidação de componentes celulares (Valko *et al.*, 2006).

5. CONCLUSÕES

Além de acumular maiores quantidades de As, *Lemna gibba* exibiu menor efeito do As absorvido sobre sua taxa de crescimento, indicando maior tolerância dessa espécie a este metalóide, o que a torna, dentre as espécies estudadas, a mais adequada para ser utilizada em programas de fitorremediação.

A maior tolerância de *Lemna gibba* aos efeitos do As pode estar relacionada tanto a mecanismos antioxidantes enzimáticos quanto a não enzimáticos. Esta espécie, além de apresentar maiores atividades de SOD, CAT, POX e GR, também apresentou maiores teores de tióis e antocianinas que as outras duas espécies analisadas. Embora, *Azolla caroliniana* e *Salvinia minima* também tenham apresentado incrementos nas atividades de várias enzimas, a maior tolerância de *Lemna gibba* parece ser devido não somente ao aumento nestes processos antioxidantes, mas a superior atividade basal dessas enzimas e ao maior conteúdo basal de tióis e antocianinas.

Em *Lemna gibba*, novos estudos são necessários para se conhecer os constituintes responsáveis pelo aumento dos tióis não protéicos, fração tiólica que deve possuir papel fundamental na tolerância dessa espécie ao As.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkorta I, Allica JH, Garbisu C, (2004) Plants against the global epidemic of arsenic poisoning. *Environment International* 30:949-951.
- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR, (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiology* 109:1247-1257.
- Apel K, Hirt H, (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Plant Biology* 55:373-399.
- Arora A, Saxena S, (2005) Cultivation of *Azolla microphylla* biomass on secondary-treated Delhi municipal effluents. *Biomass and Bioenergy* 29:60-64.
- Baldwin PR, Butcher DJ, (2006) Phytoremediation of arsenic by two hyperaccumulators in a hydroponic environment. *Microchemical Journal*. *in press*
- Barra CM, Santelli RE, Abrão JJ, Guardia M, (2000) Especificação de Arsênio. *Química Nova* 23:58-70.
- Barreiros ABS, David JM, David JP, (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29:113-123.
- Beauchamp C, Fridovich I, (1971) Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287.
- Benniceli R, Stepniewska Z, Banach A, Szajnocha K, Ostrowski J, (2004) The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr (III), Cr(VI) from municipal waste water. *Chemosphere* 55:141-146.
- Bhattacharya A, Bhattacharya S, (2006) Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: Involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. *in press*
- Boniardi N, Rota R, Nano, G, (1999) Effect of dissolved metals on the organic load removal efficiency of *Lemna gibba*. *Water Residual* 33:530-538.
- Cai Y, Su J, Ma LQ, (2004) Low molecular weight thiols in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* upon exposure to arsenic and other trace elements. *Environmental Pollution* 129:69-78.
- Cao X, Ma LQ, Tu C, (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L). *Environmental Pollution* 128:317-325.

- Carlberg C, Mannervik B, (1985) Glutathione reductase. In: Meister, A. (ed.), *Methods in Enzymology*, pp.488-495. New York, Academic Press.
- Chance B, Maehley AC, (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* New York v. 2, p. 764-775.
- Clark RB, (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal Agricultural Food Chemistry* 23:458-460.
- Clemens S, (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology* 163:319-332.
- Cruz CD, (2006) Programa GENES – versão 4.1. Editora UFV. Viçosa, MG. 642p.
- Dong J, Wu F, Zhang G, (2006) Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* 64:1659-1666.
- Dong R, Formentin E, Losseso C, Carimi F, Benedetti P, Terzi M, Lo Schiavo F, (2006) Molecular cloning and characterization of a phytochelatin synthase gene, PvPCS1, from *Pteris vittata* L. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. *in press*
- Francesconi K, Visoottiviseth P, Sridokchan W, Goessler W, (2002) Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a Potential Phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *The Science of the Total Environment* 284:27-35.
- Geng CN, Zhu YG, Liu WJ, Smith SE, (2005) Arsenate uptake and translocation in seedlings of two genotypes of rice is affected by external phosphate concentrations. *Aquatic Botany* 83:321-331.
- Giannopolitis CN, Ries SK, (1977) Superoxide Dismutases. *Plant Physiology* 59:309-314.
- Graney JR, Eriksen TM, (2004) Metals in pond sediments as archives of anthropogenic activities: a study in response to health concerns. *Applied Geochemistry* 19:1177-1188.
- Guimarães FP, (2006) Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução. Dissertação de mestrado, UFV. Viçosa, MG.
- Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Bookum WT, Schat H, Meharg AA, (2001) Phytochelatin synthase is involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiology* 126:299-306.
- Havir EA, McHale NA, (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84:450-455.
- Hideg E, (1996) Free Radical Production in Photosynthesis Under Stress Conditions. In: Pessarakli M, (ed.) *Handbook of Photosynthesis*, pp.911-930. University of Arizona.

- Hossain MF, (2006) Arsenic contamination in Bangladesh. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113:1-16.
- Hunt R, (1978) *Plant growth analysis*. London: Edward Arnold Limited 67p.
- Israr M, Sahi S, Datta R, Sarkar D, (2006) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere. in press*
- Juszczuk IM, Wiktorowska A, Malusá E, Rychter AM, (2004) Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 267: 41-49.
- Kamperidou I., Vasilakakis M, (2006) Effect of propagation material on some quality attributes of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, var. Selva). *Scientia Horticulturae* 107:137-142.
- Kar M, Nishra D, (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319.
- Karenlampi S, Schat H, Vangronsveld J, Verkleij JAC, Lelie D, Mergeay M, Tervahauta AI, (2000) Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental Pollution* 107:225-231.
- Kertulis GM, Ma LQ, MacDonald GE, Chen R, Winefordner JD, Cai Y, (2005) Arsenic speciation and in *Pteris vittata* L. and the effects on phosphorus in the xylem sap. *Environmental and Experimental Botany* 54: 239-247.
- Keegan TL, Farago ME, Thornton I, Hong B, Colvile RN, Pesch B, Jacobis B, Nieuwenhuijsen MJ, (2005) Dispersion of As and selected heavy metals around a coal-burning power station in central Slovakia. *Science of the Total Environment* 358:61-71.
- Koshiha T, (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiology* 34:713-721.
- Leal LO, Forteza R, Cerda V, (2006) Speciation analysis of inorganic arsenic by a multisyringe flow injection system with hydride generation-atomic fluorescence spectrometric detection. *Talanta* 69:500-508.
- Lee HS, Cho YH, Park SO, Kye SH, Kim BH, Hahm TS, Kim M, Lee JO, Kim CI, (2006) Dietary exposure of the Korean population to arsenic, cadmium, lead and mercury. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:31-37.
- Leist M, Casey RJ, Caridi D, (2000) The management of arsenic wastes: problems and prospects. *Journal of Hazardous Materials* 76:125-138.

- 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. in press*
- Liu H, Probst A, Lia B, (2005) Metal contamination of soils and crops affected by the Chenzho lead/ zinc mine spill (Hunan, China). *Science of the Total Environment* 339:153-166.
- Magalhães VF, Pfeiffer WC, (1995) Arsenic concentration in sediments near a metallurgical plant (Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil). *Journal of Geochemical Exploration* 52:175-181.
- Maine MA, Duarte MAV, Sune NL, (2001) Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water Research* 35:2629-2634.
- Maine MA, Sune NL, Lagger SC, (2004) Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Reserch* 38:1494-1501.
- Mandal BK, Suzuki KT, (2002) Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58:201-235.
- Marin AR, Pezeshki SR, Masscheleyn PH, Choi HS, (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. *Journal Plant Nutrition* 16:865-880.
- Marschner H, (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd. ed. London: Academic Press.
- Mascher R, Lippmann B, Holzinger S, Bergmann H, (2002) Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science* 163:961-969.
- Matschullat J, (2000) Arsenic in the geosphere. *The Science of the Total Environment* 249:297-309.
- Matschullat J, Borb RP, Deschamps E, Figueiredo BR, Gabrio T, Schwenk M, (2000) Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *Applied Geochemistry* 15:181-190.
- Meuwly P, Rauser WE, (1992) Alteration of thiol pool in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Physiology* 99:8-15.
- Mirlean N, Andrus V, Baisch P, Griep G, Casatelli MR, (2003) Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 46:1480-1484.
- Mirlean N, Roisenberg A, (2006) The effect of emissions of fertilizer production on the environment contamination by cadmium and arsenic in southern Brazil. *Environmental Pollution* 143:335-340.

- Mishra S, Svivastava S, Tripathi RD, Kumar R, Seth CS, Gupta DK, (2006) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere. in press*
- Miteva E, Hristova D, Nenova V, Maneva S, (2005) Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. *Scientia Horticultuturæ* 105:343-358.
- Miteva E, Peycheva S, (1999) Arsenic accumulation and effect on peroxidase activity in green bean and tomatoes. *Bulgarian Journal of Agriculture Science* 5:737-740.
- Mittler R, (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.
- Mkandawire M, Dudel EG, (2005) Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Science of the Total Environment* 336:81-89.
- Mkandawire M, Taubert B, Dudel EG, (2006) Limitations of growth-parameters in *Lemna gibba* bioassays for arsenic and uranium under variable phosphate availability. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65:118-128.
- Monnet F, Bordas F, Deluchat V, Baudu M, (2006) Toxicity of copper excess on the lichen *Dermatocarpon luridum*: Antioxidant enzyme activities. *Chemosphere. in press*
- Moreira JC, (1996) Threats by heavy metals: human and environmental contamination in Brazil. *The Science of the Total Environment* 188:61-71.
- Mylona PV, Polidoros AN, Scandalios JG, (1998) Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. *Free Radical Biology & Medicine* 25:576-585.
- Nakano Y, Asada K, (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22:867-880.
- National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nichols PB, Couch JD, Al-hamdani SH, (2000) Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquatic Botany* 68:313-319.
- Noctor G, Foyer CH, (1998) Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Plant Molecular Biology* 49:249-279.
- Nriagu JO, (1990) Global Metal Pollution. *Environment* 32:22-33.
- Oliver JD, (1993) A review of the biology of giant salvinia (*Salvinia molesta* Mitchell). *Journal Aquatic Plant Management* 31:227-231.

- Ornon G, Wildschut LR, Porath D, (1984) Waste water recycling by duckweed for protein production and efficient renovation. *Water Science and Technology* 17:803-817.
- Päivöke AEA, Simola LK, (2001) Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 111-121.
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A, (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 52:199-223.
- Pawlik-Skowronska B, Pirszel J, Kalinowska R, Skowronski T, (2004) Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatin in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquatic Toxicology* 70:201-212.
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim PR, Moreira MA, (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11:137-143.
- Polle A, (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* 126: 445-462.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G, (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152-159.
- Robinson B, Kim N, Marchetti M, Moni C, Schroeter L, Dijssel C, Milne G, Clothier B, (2006) Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand *Environmental and Experimental Botany*. *in press*
- Ronsein GE, Miyamoto S, Bechara E, Di Mascio P, (2006) Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova* 29:563-568.
- Roy S, Ihantola R, Hanninen O, (1992) Peroxidase activity in lake macrophytes and its relation to pollution tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 32:457-464.
- Roychowdhury T, Tokunaga H, Uchino T, Ando M, (2005) Effect of arsenic-contaminated irrigation water on agricultural land soil and plants in West Bengal, India. *Chemosphere* 58:799-810.
- Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC, (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biology Plant* 41:387-394.
- Schmöger MEV, Oven M, Grill E, (2000) Detoxification of Arsenic by Phytochelatin in Plants. *Plant Physiology*. 122:793-802.

- Schraudner M, Langebartels M, Sandermann H, (1997) Changes in the biochemical status of plant cell induced by the environmental pollutant ozone. *Plant Physiology* 100:274-280.
- Sedlak J, Lindsay RH, (1968) Estimation of total, protein bound, and non-protein sulphhydryl groups in tissue by Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 25:192-208.
- Sharma SS, Gaur JP, (1995) Potential of *Lemna polyrrhiza* for removal of heavy metals. *Ecological Engineering* 4:37-43.
- Sharples MJ, Meharg AA, Chambers SM, Cairney JWG, (2000) Mechanism of Arsenate Resistance in the Ericoid Mycorrhizal Fungus *Hymenoscyphus ericae*. *Plant Physiology* 124:1327-1334.
- Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B, (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vitata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science. in press*
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA, (1989) Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Plant Physiology* 77:449-456.
- Sun X, Li B, Li X, Wang Y, Xu Y, Jin Y, Piao F, Sun G, (2006) Effects of sodium arsenite on catalase activity, gene and protein expression in HacaT cells. *Toxicology in Vitro. in press*
- Tapio S, Grosche B, (2006) Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutation Research. in press*
- Teisseire H, Vernet G, (2001) Effects of the fungicide folpet on the activities of antioxidative enzymes in duckweed (*Lemna minor*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 69:112-117.
- Tiryakioglu M, Eker S, Ozkutlur F, Husted S, Cakmak I, (2006) Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. in press*
- Tu S, Ma LQ, MacDonald GE, Bondada B, (2004) Effects of arsenic species and phosphorus on arsenic absorption, arsenate reduction and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* L.. *Environmental and Experimental Botany* 51:121-131.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160:1-40.
- Vermaat JE, Hanif MK, (1998) Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the waterfern *Azolla filiculoides* on different types of waste water. *Water Residue* 32:2569-2576.

- Visoottiviset P, Francesconi B, Ridokchana W, (2002) The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. *Environmental Pollution* 118:453-461.
- Xia H, Ma X, (2006) Phytoremediation of ethion by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) from water. *Biosource Technology* 97:1050-1054.
- Xinde C, Lena QM, Cong T, (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environmental Pollution* 128:317-325.