

IULLA NAIFF RABELO DE SOUZA REIS

**SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDATIVO CONTRA A TOXICIDADE
INDUZIDA POR ARSÊNIO EM AGUAPÉ (*Eichhornia crassipes* (Mart.)
Solms)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

IULLA NAIFF RABELO DE SOUZA REIS

**SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDATIVO CONTRA A TOXICIDADE
INDUZIDA POR ARSÊNIO EM AGUAPÉ (*Eichhornia crassipes* (Mart.)
Solms)**

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

Prof.^a. Dr.^a. Marília Contin Ventrella
(Co-orientadora)

Prof. Dr. José Cambraia

Prof. Dr. Jaime Wilson Vargas de Mello

Dr.^a. Sylvia Therese Meyer Ribeiro

Prof. Dr. Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta conquista.

À Universidade Federal de Viçosa - UFV e ao Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade e condições para o desenvolvimento deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Ao meu orientador e grande amigo professor Juraci Alves de Oliveira pelo apoio, paciência, amizade e ensinamentos transmitidos.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pela valiosa contribuição em meu aprimoramento profissional.

À professora Marília Contin Ventrela pelas sugestões e colaborações nas etapas do trabalho.

Aos professores José Cambraia, Jaime Mello e Sylvia Ribeiro pelas contribuições.

Às “irmãs” Heloísa, Maria Angélica e Grasielle, e aos “primos” Gládis, Cleberon, Élcio e Leandro pela prazerosa convivência, e ao técnico do laboratório “Carlitos”.

Aos amigos Waléria, Michelle, Carla, Vanderson, Shirlene, Lidiane e Dani, que mesmo longe, torcem por mim.

Aos grandes amigos conquistados em Viçosa: Crislene, Virgílio, Letícia da Costa, Thalita, Carol, Alice, Letícia dos Anjos e Giselle. Em especial, à grande amiga Viviane, meu anjo, minha irmã, por todos os agradáveis momentos proporcionados e pela tão valiosa amizade.

Ao meu amado Allan, por todo incentivo, paciência e companheirismo, fundamentais para a realização dessa conquista.

Aos meus pais, Ivo Reis e Máisa Naiff, maiores incentivadores do meu sucesso; aos meus irmãos Ivo Jr, Hirlene e Iarlen e ao meu querido avô Manoel Rabelo.

E a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista, meu eterno agradecimento.

ÍNDICE

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1	10
Acúmulo de arsênio e respostas antioxidativas em <i>Eichhornia crassipes</i> expostas ao arsenato	10
1. Introdução	14
2. Material e Métodos	16
3. Resultados e Discussão	21
4. Referências Bibliográficas	41
CAPÍTULO 2	51
Tolerância ao arsênio em <i>Eichhornia crassipes</i> : metabolismo da glutatona e estrutura anatômica	51
1. Introdução	53
2. Material e Métodos	55
3. Resultados e Discussão	61
4. Referências bibliográficas	73
CONCLUSÕES GERAIS	83

RESUMO

REIS, Iulla Naiff Rabelo de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2011. **Sistemas de defesa antioxidativo contra a toxicidade induzida por arsênio em aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms)**. Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Co-orientadores: Marília Contin Ventrella e Wagner Campos Otoni.

Plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) foram submetidas a concentrações tóxicas de arsênio (As) para analisar a capacidade de absorção desse metaloide por essa macrófita e os seus efeitos tóxicos no crescimento e nas alterações estruturais em folhas e raízes, além de estudos dos mecanismos bioquímicos relacionados ao metabolismo antioxidativo e da glutathione envolvidos na tolerância ao As. No primeiro experimento, as plantas foram cultivadas em solução nutritiva, contendo 0; 3; 7; 10 e 13 μM de As, na forma de arsenato de sódio, durante três dias. Neste período, observaram-se sintomas visuais de toxidez que variaram conforme a concentração do metaloide presente na solução nutritiva. Os teores de As nas raízes aumentaram com o incremento da concentração de As na solução nutritiva até 9 μM , enquanto nas folhas os teores desse elemento aumentaram linearmente com a concentração de As. Quando submetidas a tratamentos com 3 μM de As, as plantas foram capazes de remover 97% desse elemento da solução e, embora tenha havido redução da eficiência de remoção nas concentrações mais elevadas, verifica-se que mesmo sob 13 μM de As, as plantas foram capazes de remover mais de 50% desse elemento, acumulando grandes quantidades de As. Os valores do fator de bioconcentração (FBC) foram menores que 500, enquanto os valores do fator de transferência (FT) nas plantas submetidas a concentrações maiores que 7 μM de As, foram superiores a 1,0. Isso indica que, à medida que se aumenta a absorção de As por *E. crassipes*, há maior translocação desse elemento para a parte aérea. Os menores teores de clorofilas e carotenoides encontrados em *E. crassipes*, provavelmente, comprometeram a sua capacidade fotossintética, justificando a redução na taxa de crescimento relativo das plantas expostas a concentrações mais elevadas de As. Por outro lado, houve aumento dos teores de antocianina com o acréscimo das concentrações de As. Nas plantas expostas a concentrações moderadas de As, houve redução nos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), indicando a ação eficiente das enzimas envolvidas com o combate ao estresse oxidativo. O tratamento com As aumentou a atividade da dismutase do superóxido (SOD) nas folhas, até a

concentração de 8 μM desse metaloide, o que pode representar parte do mecanismo de defesa ao estresse oxidativo causado por esse elemento. O aumento na atividade da catalase (CAT) e a redução nos teores de H_2O_2 nas raízes das plantas expostas até 6 μM de As, sugere que essa enzima atua efetivamente na remoção desse composto nesse órgão. A exposição ao As reduziu a atividade das peroxidases (POXs) nas raízes, entretanto, nas folhas, houve maior estímulo na atividade dessa enzima. Assim, verifica-se que, provavelmente, a redução nos teores de H_2O_2 , observado nas raízes, foi decorrente da ação da CAT, enquanto as POXs parecem ter sido responsáveis pela remoção eficiente do H_2O_2 nas folhas. A atividade da peroxidase do ascorbato (APX), também, foi estimulada na presença de moderadas concentrações de As nas folhas, indicando que essa enzima deve contribuir eficientemente para a remoção do H_2O_2 produzido nesse órgão. No segundo experimento, as plantas foram cultivadas em solução nutritiva, contendo ou não 7 μM de As. A exposição ao As aumentou a atividade da sulfurilase do ATP (ATPS) nas raízes, mas não alterou a atividade dessa enzima nas folhas. Por outro lado, o As reduziu a atividade da peroxidase da glutathiona (GSH-Px) e elevou a atividade da redutase da glutathiona (GR), tanto nas folhas quanto nas raízes. A sulfotransferase da glutathiona (GST) atua de forma mais efetiva nas raízes, onde houve aumento na atividade dessa enzima, indicando provável conjugação de glutathiona (GSH) ao metaloide nesses órgãos. O tratamento com As não afetou a atividade da sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -ECS) nas raízes, mas estimulou a ação dessa enzima nas folhas. Além disso, houve redução significativa nos teores de glutathiona total, e aumento nos teores de tióis totais e de tióis não-protéicos, os quais sugerem maior síntese de fitoquelatinas. As análises anatômicas evidenciaram danos significativos somente na região apical das folhas, onde se iniciam os sintomas de toxidez ao As. A partir desses estudos, verifica-se que *E. crassipes* apresenta elevada eficiência de absorção de As, e sob concentrações de até 7 μM de As, essa planta apresenta um aumento na atividade das enzimas antioxidativas, contribuindo para a remoção do excesso de espécies reativas de oxigênio decorrentes da toxidez por esse elemento. Além disso, o aumento na atividade de enzimas envolvidas com o metabolismo da glutathiona pode representar um mecanismo importante para a tolerância e o acúmulo de As em *E. crassipes*.

ABSTRACT

REIS, Iulla Naiff Rabelo de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2011. **Antioxidative defense systems against toxicity induced by arsenic in water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms)**. Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisers: Marília Contin Ventrella and Wagner Campos Otoni.

Water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) was subjected to toxic concentrations of arsenic (As) to analyze the absorption capacity of this metalloid by this macrophyte and its toxic effects on growth and structural changes in leaves and roots, as well as studies of biochemical mechanisms related to metabolism and glutathione antioxidant involved in tolerance to As. In the first experiment, plants were grown in nutrient solution containing 0; 3; 7; 10 e 13 μM As, in the form of sodium arsenate for three days. In this period, there were symptoms of toxicity that changed according to the concentration of this metalloid in the nutrient solution. The As contents in roots increased with increasing concentration of As in the nutrient solution up to 9 μM , while in leaves the levels of this element increased linearly with As concentration. When treated with 3 μM As, the plants were able removing 97% of this element from the solution and, although there was reduction in removal efficiency at higher concentrations, it appears that even under 13 μM the plants were able to remove over 50% of this element, accumulating large amounts of As. The values of bioconcentration factor (BCF) were lower than 500, while the values of transfer factor (TF) in plants exposed to levels greater than 7 μM As, were greater than 1. This indicates that, as it increases the absorption of As by *E. crassipes*, there is increased translocation of this element to the shoot. The lower levels of chlorophyll and carotenoids found in *E. crassipes* probably compromised its photosynthetic capacity, justifying the reduction in relative growth rate of plants exposed to higher concentrations of As. Moreover, there was increase of anthocyanin content with increasing concentrations of As. In plants exposed to moderate concentrations of As, there was reduction in the levels of hydrogen peroxide (H_2O_2), indicating the efficient action of the enzymes involved in combating oxidative stress. The treatment with As increased the activity of superoxide dismutase (SOD) in leaves, up to 8 μM , which may represent part of a defense mechanism to oxidative stress caused by this element. The increase in activity of catalase (CAT) and a reduction in the levels of H_2O_2 , in the roots of plants exposed to 6 μM of As, suggest

that this enzyme operates effectively in the removal of this compound in this organ. As exposure inhibited the activity of peroxidase (POXs) in roots, however, leaves showed greater stimulation of enzyme activity. Thus, probably the reduction in levels of H₂O₂, observed in roots was due to the action of CAT, while POXs seem to have been responsible for the efficient removal of H₂O₂ in leaves. The activity of ascorbate peroxidase (APX) was stimulated in the presence of moderate concentrations of As in leaves, indicating that this enzyme should efficiently contribute to the removal of H₂O₂ produced in this organ. In the second experiment, plants were grown in nutrient solution containing or not 7 μM As. As exposure increased the activity of ATP sulfurylase (ATPS) in the roots, but did not alter the enzyme activity in leaves. On the other hand, As reduced activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and increased the activity of glutathione reductase (GR) both in leaves and roots. The glutathione sulfotransferase (GST) operates more effectively in the roots, where there was an increase in activity of this enzyme, indicating GSH conjugation to metalloid in these organs. The As treatment did not affect the activity of γ-glutamylcysteine synthetase (γ-ECS) in the roots, but stimulated the action of this enzyme in leaves. Furthermore, there was a significant reduction in total glutathione contents and increase of total thiols and non-protein thiols contents, which suggests a higher phytochelatin synthesis. The anatomical analysis revealed significant damage only in the apical region of the leaves, where initiate the toxic symptoms to As. Thus, the increase in activity of enzymes involved in glutathione metabolism is an important mechanism for tolerance and accumulation of As in *E. crassipes*. It appears that *E. crassipes* has a high absorption efficiency of As, and in concentrations up to 7 μM As, this plant has an increased activity of antioxidant enzymes contributing to the removal of excess reactive oxygen species arising from the toxicity of this element. Furthermore, the increased activity of enzymes involved in glutathione metabolism may represent an important mechanism for tolerance and accumulation of As in *E. crassipes*.

INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da exploração de recursos naturais pelo homem, decorrente dos avanços científicos e tecnológicos, provocou a introdução e acúmulo de compostos orgânicos e inorgânicos tóxicos em águas superficiais e profundas, limitando a disponibilidade de água de qualidade para utilização em atividades agrícolas e para o consumo humano (Susarla *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2008).

A água contaminada contribui para o aumento da incidência de diversas doenças, tanto em países em desenvolvimento, como em países desenvolvidos (World Health Organization – WHO, 2009), sendo que a contaminação por metais tóxicos vem se tornando um problema cada vez maior, uma vez que não são biodegradáveis e são passíveis de acumulação no ambiente.

O arsênio (As) é um metaloide traço naturalmente encontrado no ambiente, constituindo-se no vigésimo elemento mais abundante da crosta terrestre. Pode ser mobilizado pela combinação de processos naturais, tais como intemperismo, atividades biológicas e emissões vulcânicas, bem como por uma série de atividades antrópicas, como mineração, aplicação de pesticidas e fertilizantes, queima de combustíveis fósseis e resíduos industriais (Mandal e Suzuki, 2002; Smedley e Kinniburgh, 2002; Ng *et al.*, 2003; Rezanka e Sigler, 2008). Adicionalmente, podem ocorrer acréscimos decorrentes de processos naturais oriundos de fontes geoquímicas, que incluem a substituição do As por Fe, Si ou Al (Roy, 2008).

A contaminação por As ocorre em escala global e vem sendo relatada em vários países, tais como Argentina (Bhattacharya *et al.*, 2006), Bangladesh (Ravenscroft *et al.*, 2005; Karim *et al.*, 2008), Canadá (Wang e Mulligan, 2006), Chile (Ferrecio e Sancha, 2006), China (Luo *et al.*, 2008), Índia (Chakraborti *et al.*, 2008), Estados Unidos (Lamm *et al.*, 2004), Nepal (Maharjan *et al.*, 2007), Taiwan (Nath *et al.*, 2008) e Tailândia (Wattanasen *et al.*, 2006). No Brasil, as fontes naturais de As estão distribuídas nos Estados de Goiás, Bahia, Minas Gerais e São Paulo (Borba, 2002). Por outro lado, as fontes antrópicas de contaminação por As se devem à intensa atividade mineradora de depósitos auríferos situados, principalmente, no quadrilátero ferrífero-MG (Matschullat *et al.*, 2000; Borba, 2002; Deschamps *et al.*, 2002; Borba *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2007).

A ingestão de água contaminada com As é a forma mais comum de contaminação do homem (Biswas *et al.*, 2008). 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 (Bronkowska *et al.*, 2008; Roy, 2008).

A concentração máxima de As admitida em água de consumo pela Organização das Nações Unidas é de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 1993). Esse valor também se estende para o Brasil (CONAM,/MMA, 2009) e Minas Gerais (COPAM/CERH-MG, 2010). No entanto, para corpos de água, onde haja pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo, a concentração máxima desse elemento passa a ser de $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ (COPAM/CERH-MG, 2008). Em locais com atividades antrópicas, como no Quadrilátero Ferrífero-MG, já foram encontradas concentrações de As, em águas superficiais, de até $350 \mu\text{g L}^{-1}$ (Matschullat *et al.*, 2000). Dessa forma, a elevada toxicidade do As associada ao acúmulo crescente deste metaloide 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 (Haque *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2008a).

A fitorremediação é uma tecnologia emergente, que utiliza plantas para remover, transformar ou imobilizar contaminantes do meio ambiente, tais como metais pesados, compostos orgânicos e compostos radioativos localizados no solo, sedimentos, água e atmosfera (Susarla *et al.*, 2002). Esta definição inclui todos os processos biológicos, químicos e físicos influenciados tanto pelas plantas quanto pelos organismos de vida livre que constituem a rizosfera das plantas. Esse método tem como vantagem a capacidade de absorção seletiva do sistema radicular, associado à capacidade de translocação e bioacumulação da planta (Garbisu e Alkorta, 2001).

A fitoextração, uma técnica de fitorremediação que consiste na extração de contaminantes do ambiente, tem como princípio básico promover o máximo acúmulo do poluente na planta utilizando o sistema de absorção de nutrientes. Após determinado período de crescimento, o material vegetal é colhido e pode ser incinerado para concentrar o contaminante e, então, reciclado ou depositado em local apropriado (Krämer e Chardonnens, 2001).

As macrófitas aquáticas apresentam potencial para serem utilizadas em programas de fitorremediação de ambientes contaminados por As, tais como *Spirodela polyrhiza* (Rahman *et al.*, 2007), *Typha domingensis* e *Scirpus maritimus*

(Taggart *et al.*, 2005), *Hydrilla verticillata* (Srivastava *et al.*, 2007), *Ceratophyllum demersum* (Mishra *et al.*, 2008a), *Azolla caroliniana* (Zhang *et al.*, 2008), *Salvinia natans* (Rahman *et al.*, 2008b) e *Lemna gibba* (Mkandawire e Dudel, 2005).

Os critérios, geralmente, utilizados na seleção de plantas para remediação de áreas contaminadas são alta tolerância ao poluente, grande capacidade de acúmulo, ciclo de vida curto, propagação fácil e rápida, ampla distribuição, desenvolvimento de um sistema radicular extenso e alto ganho de biomassa (Krämer e Chardonnens, 2001; Francesconi *et al.*, 2002; Vissottiviseth *et al.*, 2002; Xia e Ma, 2006). Observa-se que as plantas da espécie *Eichhornia crassipes*, vulgarmente conhecida como aguapé, apresentam tais características. Aliado a isso, são plantas flutuantes livres e, que devido à sua mobilidade, possibilita o contato direto com o poluente, além de apresentarem, também, reprodução vegetativa, o que facilita sua dispersão. É uma espécie nativa do Brasil, que se encontra distribuída em muitos países. Pertence à família Pontederiaceae, com caule curto e raízes adventícias fibrosas (Mahmood *et al.*, 2005).

Muitos estudos demonstram que *E. crassipes* é eficiente na remoção de vários metais (Maine *et al.*, 2001; Cordes *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2008b), sendo uma espécie útil em programas de fitorremediação de ambientes contaminados. Entretanto, maiores informações se fazem necessárias sobre a capacidade de absorção de As por essa macrófita e os efeitos tóxicos decorrentes da presença desse metaloide na planta.

Neste trabalho, foram realizados dois experimentos, conduzidos separadamente. No primeiro experimento, plantas de *E. crassipes* foram submetidas a concentrações crescentes de As, nas quais foram analisados a capacidade de absorção desse elemento e o seu efeito no crescimento e no sistema antioxidativo. No segundo experimento, as plantas foram submetidas a uma concentração intermediária de As, escolhida a partir dos resultados obtidos no primeiro experimento. Neste, foram analisadas algumas enzimas envolvidas com o metabolismo da glutatona, bem como lesões estruturais ocorridas nas folhas e raízes decorrentes da presença de As.

Assim, o objetivo geral do presente estudo foi possibilitar o melhor entendimento dos mecanismos de defesa envolvidos com a tolerância e com o acúmulo de As em plantas de *E. crassipes*, fornecendo subsídios para a indicação dessa espécie em programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por esse metaloide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Biswas BK, Inoue J, Inoue K, Ghimire KN, Harada H, Ohto K, Kawakita H, 2008. Adsorptive removal of As (V) and As (III) from water by a Zr (IV) – loaded orange waste gel. **Journal of Hazardous Materials**, 154:1066-1074.

Bhattacharya P, Claesson M, Bundschuh J, Sracek O, Fagerberg J, Jacks G, Martin RA, Storniolo AR, Thir JM, 2006. Distribution and mobility of arsenic in the Río Dulce alluvial aquifers in Santiago del Estero Province, Argentina. **Science of The Total Environment**, 358:97-120.

Borba RP, 2002. Arsênio em ambiente superficial: processos geoquímicos naturais e antropogênicos em uma área de mineração aurífera. Dissertação (Doutorado em Geociências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Borba RP, Figueiredo EBR, Matschullat EJ, 2003. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. **Environmental Geology**, 44:39–52.

Bronkowska M, Figurska-Ciura D, Orzel D, Stynczynska M, Wyca J, Lozna K, Zechalko-Czajkowska A, Biernat J, 2008. Evaluation of plant products from the Legnicko-Glogowski region for their contamination with arsenic. **Food Chemistry**, 109:4-7.

Chakraborti D, Singh EJ, Das B, Shah BA, Hossain MA, Nayak B, Ahamed S, Singh R, 2008. Groundwater arsenic contamination in Manipur, one of the seven North-Eastern Hill states of India: a future danger. **Environmental Geology**, 56:381-390.

CONAM/MMA. Resolução N° 420, de 28 de dezembro de 2009. Disponível em: http://www.fundagres.org.br/biossolido/images/downloads/resolucao_420_2009.pdf.

COPAM/CERH-MG. Deliberação Normativa Conjunta N.º 1, de 05 de Maio de 2008. Disponível em: <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=8151>.

COPAM/CERH-MG. Deliberação Normativa Conjunta Nº 2, de 8 de setembro de 2010. Disponível em: <http://ws.mp.mg.gov.br/biblio/informa/170913897.htm>.

Cordes, KB, Mehra, A, Farago, ME, Banerjee, DK, 2000. Uptake of Cd, Cu, Ni and Zn by the water hyacinth, *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms from pulverized fuel ash (PFA) leachates and slurries. **Environmental Geochemistry and Health**, 22:297–316.

Deschamps E, Ciminelli VST, Lange FT, Matschullat J, Raue B, Schmidt, 2002. Soil and Sediment Geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil. **Journal of Soils and Sediments**, 2: 216 – 222.

Ferreccio C, Sancha AM, 2006. Arsenic Exposure and Its Impact on Health in Chile. **The Journal of Health, Population and Nutrition**, 24:164-175.

Francesconi K, Visoottiviset 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.

Garbisu C, Alkorta I, 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource Technology**, 77:229-236.

Gonçalves JAC, Lena JC, Paiva JF, Nalini Jr HA, Pereira JC, 2007. Arsenic in the groundwater of Ouro Preto (Brazil): its temporal behavior as influenced by the hydric regime and hydrogeology. **Environmental Geology**, 53:785–793.

Haque N, Peralta-Videa J, Jones GL, Gill TE, Gardea-Torresdey JL, 2008. Screening the phytoremediation potential of desert broom (*Baccharis sarothroides* Gray) growing on mine tailings in Arizona, USA. **Environmental Pollution**, 153:362-368.

Karim RA, Hossain SM, Miah MMH, Nehar K, Mubin MSH, 2008. Arsenic and heavy metal concentrations in surface soils and vegetables of Feni district in Bangladesh. **Environmental Monitoring and Assessment**, 145:417-425.

Lamm SH, Engel A, Kruse MB, Feinleib M, Byrd D, Lai S, Wilson R, 2004. Arsenic in Drinking Water and Bladder Cancer Mortality in the United States: An Analysis Based on 133 U.S. Counties and 30 Years of Observation. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, 46:298-306.

Luo W, Lu Y, Wang G, Shi Y, Wang T, Giesy JP, 2008. Distribution and availability of arsenic in soils from the industrialized urban area of Beijing, China. **Chemosphere**, 72:797-802.

Maharjan M, Watanabe C, Ahmad AS, Umezaki M, Ohtsuka R, 2007. Mutual interaction between nutritional status and chronic arsenic toxicity due to groundwater contamination in an area of Terai, lowland Nepal. **Journal of Epidemiology and Community Health**, 61:389-394.

Mahmood Q, Zheng P, Siddiqui MR, Islam E, Azim MR, Hayat Y, 2005. Anatomical studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) under the influence of textile wastewater. **Journal of Zhejiang University Science**, 6B:991-998.

Maine MA, Duarte MV, Sune LS, 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. **Water Resource**, 35:2629–2634.

Mandal BK, Suzuki KT, 2002. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, 58:201–235.

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.

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.

Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Trivedi PK, 2008a. Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. **Aquatic Toxicology**, 86: 205–215.

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

Mukherjee A, Bhattacharya P, Savage K, Foster A, Bunschuh J, 2008. Distribution of geogenic arsenic in hydrologic systems: Controls and challenges. **Journal of Contaminant Hydrology**, 99:1-7.

Nath B, Jean JS, Lee MK, Yang HJ, Liu CC, 2008. Geochemistry of high arsenic groundwater in Chia-Nan plain, Southwestern Taiwan: Possible sources and reactive transport of arsenic. **Journal of Contaminant Hydrology**, 99:85-96.

Ng JC, Wang J, Shraim A, 2003. A global health problem caused by arsenic from natural sources. **Chemosphere**, 52:1353–1359.

Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Okumura C, Rahman CM, 2007. Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.): A good option for phytoremediation. **Chemosphere**, 69:493–499.

Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Rahman MM, 2008a. Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrhiza* L.: Interactions with phosphate and iron. **Journal of Hazardous Materials**, 160:356–361.

Rhaman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Rahman MM, 2008b. Influence of phosphate and iron ions in selective uptake of arsenic species by water fern (*Salvinia natans* L.). **Chemical Engineering Journal**, 145:179–184.

Ravenscroft P, Burgess WG, Ahmed KM, Burren M, Perrin J, 2005. Arsenic in groundwater of the Bengal Basin, Bangladesh: Distribution, field relations, and hydrogeological setting. **Hydrogeology Journal**, 13:727-751.

Rezanka TR, Sigler K, 2008. Biologically active compounds of semi-metals. **Phytochemistry**, 69:585–606.

Roy J, 2008. Economic benefits of arsenic removal from ground water – A case study from West Bengal, India. **Science of the total environment**, 397:1-12.

Smedley PL, Kinniburgh DG, 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. **Applied Geochemistry**, 17:517–568.

Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD, Dwivedi S, Trivedi PK, Tandon PK, 2007. Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Environmental Science Technology**, 41: 2930-2936.

Susarla S, Medina VF, Mccutcheon SC, 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, 18:647–658.

Taggart MA, Carlisle M, Pain DJ, Green D, Osborn D, Meharg AA, 2005. Arsenic levels in the soils and macrophytes of the ‘Entremuros’ after the Aznalcóllar mine spill. **Environmental Pollution**, 133:129–138.

Visoottiviseth 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.

Wang Q, Cui Y, Dong Y, 2002. Phytoremediation of polluted waters potentials and prospects of wetland plants. **Acta Biotechnologica**, 22:199–208.

Wang S, Mulligan CN, 2006. Occurrence of arsenic contamination in Canada: sources, behavior and distribution. **Science of the Total Environment**, 366:701–721.

Wattanasen K, Elming AS, Lohawijarn W, Bhongsuwan T, 2006. An integrated geophysical study of arsenic contaminated area in the peninsular Thailand. **Environmental Geology**, 51:595-608.

World Health Organization, 1993. Guidelines for drinking-water quality, v.1:Recommendations, 2nd ed. WHO, Geneva.

World Health Organization, 2009.
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/.

Zhang X, Lin, AJ, Z, FJGL, Zhu YG, 2008. Arsenic accumulation by the aquatic fern Azolla: Comparison of arsenate uptake, speciation and efflux by *A. caroliniana* and *A. filiculoides*. **Environmental Pollution**, 156:1149–1155.

CAPÍTULO 1

Acúmulo de arsênio e respostas antioxidativas em *Eichhornia crassipes* expostas ao arsenato

Resumo

Os efeitos de concentrações tóxicas de arsênio (As) sobre o crescimento e sobre o sistema de defesa antioxidativo foram analisados em plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). As plantas foram cultivadas em solução nutritiva, contendo 0; 3; 7; 10 e 13 μM de As, na forma de arsenato de sódio, durante três dias. Neste período, observaram-se sintomas visuais de toxidez que variaram conforme a concentração do metaloide presente na solução nutritiva. Os teores de As nas raízes aumentaram com o incremento da concentração de As na solução nutritiva até 9 μM , enquanto nas folhas os teores desse elemento aumentaram linearmente com a concentração de As. Quando submetidas a tratamentos com 3 μM de As, as plantas foram capazes de remover 97% desse elemento da solução e, embora tenha havido redução da eficiência de remoção nas concentrações mais elevadas, verifica-se que mesmo sob 13 μM de As, as plantas foram capazes de remover mais de 50% desse elemento, acumulando grandes quantidades de As. Os valores do fator de bioconcentração (FBC) foram menores que 500, enquanto os valores do fator de transferência (FT) nas plantas submetidas a concentrações maiores que 7 μM de As, foram superiores a 1,0. Isso indica que, à medida que se aumenta a absorção de As por *E. crassipes*, há maior translocação desse elemento para a parte aérea. Os menores teores de clorofilas e carotenoides encontrados em *E. crassipes*, provavelmente, comprometeram a sua capacidade fotossintética, justificando a redução na taxa de crescimento relativo das plantas expostas a concentrações mais elevadas de As. Os teores de antocianina aumentaram com o acréscimo das concentrações de As. Houve redução nos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em *E. crassipes*, expostas a concentrações moderadas de As, indicando a ação eficiente das enzimas envolvidas com o combate ao estresse oxidativo. O tratamento com As aumentou a atividade da dismutase do superóxido (SOD) nas folhas, até a concentração de 8 μM desse metaloide, o que pode representar parte do mecanismo de defesa ao estresse oxidativo causado por esse elemento. O aumento na atividade

da catalase (CAT) e a redução nos teores de H₂O₂, nas raízes das plantas expostas até 6 µM de As, sugere que essa enzima atua efetivamente na remoção desse composto nesse órgão. A exposição ao As reduziu a atividade das peroxidases (POXs) nas raízes, entretanto, nas folhas, houve maior estímulo na atividade dessa enzima. Assim, verifica-se que, provavelmente, a redução nos teores de H₂O₂, observado nas raízes, foi decorrente da ação da CAT, enquanto as POXs parecem ter sido responsáveis pela remoção eficiente do H₂O₂ nas folhas. A atividade da peroxidase do ascorbato (APX), também, foi estimulada na presença de moderadas concentrações de As nas folhas, indicando que essa enzima deve contribuir eficientemente para a remoção do H₂O₂ produzido nesse órgão. Com isso, verifica-se que ação conjunta da SOD, CAT, POX e APX contribuíram para a remoção do excesso de espécies reativas de oxigênio das plantas expostas a concentrações moderadas de As, e sob concentrações inferiores a 7 µM desse metaloide, *E. crassipes* mantém seus mecanismos de defesa em níveis adequados, capazes de tolerar esse elemento, bem como removê-lo eficientemente da solução, podendo ser indicada para programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados com As.

Palavras-chave: enzimas antioxidativas, fitorremediação, macrófita aquática.

Abstract

The effects of toxic concentrations of arsenic (As) on growth and on the antioxidant defense system were analyzed in water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). Plants were grown in nutrient solution containing 0; 3; 7; 10 and 13 μM As, in the form of sodium arsenate for three days, which showed symptoms of toxicity which varied according to concentration metalloid present in the nutrient solution. In this period, there were symptoms of toxicity that varied according to the concentration of this metalloid in the nutrient solution. The As contents in roots increased with increasing concentration of As in the nutrient solution up to 9 μM , while in leaves the levels of this element increased linearly with As concentration. When treated with 3 μM of As, the plants were able removing 97% of this element from the solution and, although there was reduction in removal efficiency at higher concentrations, it appears that even under 13 μM the plants were able to remove over 50% of this element, accumulating large amounts of As. The values of bioconcentration factor (BCF) were lower than 500, while the values of transfer factor (TF) in plants exposed to levels greater than 7 μM As, were greater than 1. This indicates that, as it increases the absorption of As by *E. crassipes*, there is increased translocation of this element to the shoot. The lower levels of chlorophyll and carotenoids found in *E. crassipes* probably compromised its photosynthetic capacity, justifying the reduction in relative growth rate of plants exposed to higher concentrations of As. Moreover, there was increase of anthocyanin content with increasing concentrations of As. In plants exposed to moderate concentrations of As, there was reduction in the levels of hydrogen peroxide (H_2O_2), indicating the efficient action of the enzymes involved in combating oxidative stress. The treatment with As increased the activity of superoxide dismutase (SOD) in leaves, up to 8 μM , which may represent part of a defense mechanism to oxidative stress caused by this element. The increase in activity of catalase (CAT) and a reduction in the levels of H_2O_2 , in the roots of plants exposed to 6 μM of As, suggest that this enzyme operates effectively in the removal of this compound in this organ. As exposure inhibited the activity of peroxidase (POXs) in roots, however, leaves showed greater stimulation of enzyme activity. Thus, probably the reduction in levels of H_2O_2 , observed in roots was due to the action of CAT, while POXs seem to have been responsible for the efficient removal of H_2O_2 in leaves. The activity of ascorbate peroxidase (APX) was

stimulated in the presence of moderate concentrations of As in leaves, indicating that this enzyme should efficiently contribute to the removal of H₂O₂ produced in this organ. Thus, SOD, CAT, POX and APX act together to remove the excess reactive oxygen species of plants exposed to moderate concentrations of As. So, below 7 µM of As, *E. crassipes* keeps their defense mechanisms at appropriate levels, able to tolerate this element and to remove it efficiently from the solution and may be indicated for the phytoremediation of aquatic environments contaminated with arsenic.

Keywords: antioxidant enzymes, phytoremediation, aquatic macrophytes.

1. Introdução

O arsênio (As) é considerado o poluente de maior risco à saúde humana, devido à sua toxicidade e disseminação no ambiente, podendo contaminar os seres humanos por diversas maneiras (ATSDR, 2007). O As é um metaloide que existe em quatro estádios de oxidação, As^{-3} , As^0 , As^{+3} e As^{+5} , sendo o arsenato (As^{+5}) a forma inorgânica predominante em ambientes aeróbicos, enquanto que o arsenito (As^{+3}) prevalece em ambientes anóxicos (Oremland e Stolz, 2003).

Práticas antrópicas e processos biogeoquímicos têm liberado grandes quantidades de As no ambiente (Bharracharya *et al.*, 2007), causando a contaminação de recursos hídricos em várias regiões, como observado no Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais (Gonçalves *et al.*, 2007). Os sistemas aquáticos são os principais receptores de poluentes distribuídos no meio ambiente (Dhote e Dixit, 2009) e, dessa forma, o consumo de água contaminada constitui-se na principal forma de intoxicação por As (Smedley e Kinniburgh, 2002; Alkorta *et al.*, 2004). Diante disso, verifica-se a necessidade de medidas de remediação de ambientes contaminados por As, como forma de minimizar seus efeitos em locais onde ele é amplamente distribuído, bem como reduzir a sua dispersão para ambientes não contaminados. Assim, a fitoextração de As por macrófitas aquáticas representa uma ferramenta importante para a fitorremediação de águas contaminadas, podendo atuar, também, em estudos de bioindicação (Robinson *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2008).

A fitorremediação é uma técnica promissora que utiliza plantas para remover, imobilizar ou sequestrar contaminantes tóxicos do meio ambiente, incluindo solo, água e ar (Prasad, 2003), que pode ser utilizada em associação com as técnicas físico-químicas convencionais de tratamento.

As plantas, ao absorverem o As, adotam diferentes estratégias para evitar a ação tóxica do poluente, envolvendo mecanismos de biotransformação para formas menos tóxicas (Pickering *et al.*, 2000), armazenamento do As no vacúolo (Pickering *et al.*, 2006) e ativação de sistemas de defesa ao estresse oxidativo (Miltler, 2002). O sistema de defesa antioxidativo compreende duas classes gerais: antioxidantes não-enzimáticos, como o α -tocoferol, caroteno, glutatona e ascorbato, e antioxidantes enzimáticos, tais como dismutase do superóxido, catalase, peroxidases, ciclo

ascorbato/glutationa, entre outras (Miltler, 2002; Cao *et al.*, 2004; Abercrombie *et al.*, 2008).

A principal ação tóxica do arsenito se deve às reações com grupos sulfidrílicos e, o arsenato, por competir com o fosfato em processos celulares. Entretanto, o estresse oxidativo causado pelas reações de oxidação e redução nas células vem sendo considerado o principal mecanismo de dano celular causado por esses íons (Megharg e Hartley-Whitaker, 2002). No caso do arsenato, isso pode ser verificado em dois processos: na substituição do fosfato na síntese de ATP, formando ADP-As e causando ruptura no fluxo de energia nas células (Meharg, 1994); e na redução de arsenato a arsenito, que, embora seja uma das principais estratégias para desintoxicação do As nas plantas (Bleeker *et al.*, 2006), também pode gerar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001).

Muitos estudos demonstram que *Eichhornia crassipes* (aguapé) é eficiente na remoção de vários metais, como cádmio (Maine *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002); cobre, níquel, zinco (Cordes *et al.*, 2002); cromo (Lytle *et al.*, 1998); chumbo (Harun *et al.*, 2008); e mercúrio (Mishra *et al.*, 2008c), e devido à sua grande distribuição e produção de biomassa, tem sido utilizada como indicadora e remediadora de ambientes contaminados por metais pesados (Klumpp *et al.* 2002; Mishra *et al.*, 2008b). Em relação ao As, alguns estudos sobre a eficiência de remoção desse elemento por *E. crassipes* vêm sendo realizados, no entanto, verifica-se a necessidade de estudos sobre os mecanismos que envolvem a tolerância dessa macrófita ao As.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência de concentrações crescentes de As sobre o crescimento e o sistema antioxidativo de plantas de *E. crassipes*, avaliando o potencial dessa espécie na remoção e no acúmulo de As, e suas possibilidades de uso em programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados com esse elemento.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção das plantas e aplicação dos tratamentos

As plantas aquáticas da espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms foram coletadas na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa (MG – Brasil) e mantidas por 24 horas em água desionizada. Em seguida, as plantas foram transferidas para recipientes de polietileno, com 10 L de solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), pH 6,5, e colocadas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $230 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), sob fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por três dias.

Após o período de aclimação, as plantas foram selecionadas de acordo com a massa fresca, uniformidade de tamanho e número de folhas, mantendo-se duas plantas em vasos contendo 0,5 L da solução nutritiva de Clark, pH 6,5, contendo ou não As, na forma de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, nas concentrações de 0, 3, 7, 10 e 13 μM , as quais correspondem a 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg L^{-1} , respectivamente. Após três dias de tratamento, as plantas foram lavadas em água corrente e desionizada, separadas em parte aérea e raízes e, em seguida, colocadas para secar em estufa convencional a 80°C até a obtenção da massa seca constante. O material foi utilizado para a obtenção da massa seca das folhas e raízes e determinação dos teores de As nesses órgãos. Para as demais análises, foram utilizadas amostras de massa fresca de folhas e raízes, sendo que para as determinações das atividades enzimáticas, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C , para análises posteriores.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco tratamentos (concentração de As) e cinco repetições, sendo que cada unidade experimental consistiu de duas plantas por vaso.

2.2. Sintomatologia visual das plantas expostas ao As

O registro fotográfico da sintomatologia das plantas foi feito utilizando-se uma câmera digital (Canon PC 1058), ao final de três dias de exposição a diferentes concentrações de As.

2.3. Determinação da taxa de crescimento relativo (TCR) e do teor de As nas plantas

As taxas de crescimento relativo das plantas foram calculadas utilizando-se a equação proposta por Hunt (1978): $R_w = (\ln w_1 - \ln w_0) \times 1000 / (t_1 - t_0)$, em que: R_w = taxa de crescimento relativo, em termos de massa seca (MS), 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).

Para determinação dos teores de As, o material vegetal foi moído, e aproximadamente 0,1 g de massa seca de raízes e folhas foram submetidos à mineralização úmida com 3 mL de uma mistura nítrico-perclórica 2:1, à temperatura de 100-130 °C até a completa oxidação da matéria orgânica (Marin *et al.*, 1993). As amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, analisadas por espectrofotometria de absorção atômica (Modelo AA-6701F, Shimadzu Corporation Made in Japan Kyoto), para determinação dos teores de As.

2.4. Determinação da eficiência de remoção de As, do fator de bioconcentração (FBC) e do fator de transferência (FT)

A eficiência de remoção de As foi calculada pela porcentagem de As removido da solução nutritiva pelas plantas. A quantidade de As presente em solução (em mg) foi considerada 100%. O teor de As absorvido pelas plantas ($\text{mg g}^{-1} \text{ MS}$) foi multiplicada pela quantidade de massa seca produzida durante o período de exposição ao metaloide, obtendo-se, portanto, a quantidade de As removido da solução. Da relação entre a quantidade de As na planta e aquela inicialmente presente na solução foi calculado o percentual de As que as plantas removeram do meio.

O fator de bioconcentração (FBC) foi calculado pela seguinte equação (Zayed *et al.*, 1998a): $\text{FBC} = C_{\text{PL}} / C_{\text{SOLUÇÃO}}$, em que: C_{PL} = concentração de As na planta, em $\text{mg kg}^{-1} \text{ MS}$; $C_{\text{SOLUÇÃO}}$ = concentração de As na solução, em mg L^{-1} .

O fator de transferência (FT) foi calculado pela seguinte equação (Zayed *et al.*, 1998b; Mattina *et al.*, 2003): $\text{FT} = C_{\text{PA}} / C_{\text{R}}$, em que: C_{PA} = concentração de As na parte aérea, em $\text{mg g}^{-1} \text{ MS}$; C_{R} = concentração de As na raiz, em $\text{mg g}^{-1} \text{ MS}$.

2.5. Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos

Os teores de clorofilas *a*, *b*, e carotenoides foram determinados utilizando-se quatro discos foliares com 5 mm de diâmetro, retirados da terceira folha totalmente expandida, e incubados em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), saturado com CaCO₃, à temperatura ambiente por 48 horas. A absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (UV-visível Quimis 0790U2M) e os valores utilizados para cálculo dos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides, conforme metodologia de Wellburn (1994).

2.6. Determinação do teor de antocianina

Amostras de 0,1 g de massa fresca de raízes e pecíolos foram homogeneizadas em 5 mL de metanol – HCl 1% (v/v) em banho de gelo e centrifugadas a 10.000 *xg* por 30 min, a 4°C. O teor total de antocianina foi determinado pela diferença entre a absorvância a 536 e 600 nm (Hodges *et al.*, 1999) e os resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ MF (massa fresca), como equivalentes de cianidina-3-glucosídeo, através do coeficiente de extinção molar (26900 L cm⁻¹ mol⁻¹).

2.7. Determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Amostras de 0,2 g de massa fresca de raízes e folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e, então, homogeneizadas em 2,0 mL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração através de quatro camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 *xg*, por 15 min, a 4°C, coletando-se o sobrenadante (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 50 μL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de FeNH₄(SO₄) 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorvância determinada a 560 nm. Brancos para as cores dos reagentes e dos extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. Os teores de H₂O₂ nas amostras foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões de H₂O₂ e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

2.8. Obtenção dos extratos enzimáticos brutos para determinação das atividades das enzimas antioxidativas

Os extratos enzimáticos brutos para a determinação das atividades das dismutases do superóxido (SODs), catalases (CATs), peroxidases (POXs) e peroxidases do ascorbato (APXs) foram obtidos pela homogeneização de 0,3 g de massa fresca de raízes e folhas em nitrogênio líquido, seguida de adição de 2 mL de meio de extração, filtração através de quatro camadas de gaze, e de centrifugação a 12.000 *xg*, por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram executadas à temperatura de 4 °C. Os meios de extração foram: 1) tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999), para as enzimas SOD, CAT e POX; 2) tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 1 mM, PMSF 1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM e PVPP 1 % (p/v) (Peixoto *et al.*, 1999), para a APX.

Para expressar a atividade dessas enzimas, foram determinados os teores de proteínas dos extratos enzimáticos pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando BSA como padrão.

2.9. Determinação da atividade das dismutases do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade das SODs foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM. A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação, sob iluminação de 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 período, 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).

2.10. Determinação da atividade das catalases (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade das CATs 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 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e McHale, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade das CATs determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,4 a 0,8 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson *et al.*, 1995) e expressa em µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.11. Determinação da atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade das POXs foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático diluído 1:20, tanto de raiz quanto de folhas, a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). O acréscimo na absorvância a 420 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina, sendo, a atividade das POXs determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,4 a 0,8 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em µmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.12. Determinação da atividade das peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

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 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM (Nakano e Asada, 1981, modificado por Koshiba, 1993). O decréscimo na absorvância a 290 nm, à

temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade das APXs determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,4 a 0,8 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano e Asada, 1981) e expressa em μmol de ácido ascórbico (AA) min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.13. Análise estatística

Os dados foram analisados através da análise de regressão utilizando o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV), versão 9.1, e os gráficos confeccionados através do software SigmaPlot, versão 10.

3. Resultados e Discussão

Após três dias de exposição ao As, as plantas de *Eichhornia crassipes* apresentaram sintomas de toxidez que variaram conforme a concentração do metaloide presente na solução nutritiva. Em solução contendo 3 μM de As, as plantas mantiveram-se saudáveis, com necrose inicial no ápice das folhas mais velhas. A partir da concentração de 7 μM de As, foi possível visualizar sintomas graduais de toxidez, com murcha das folhas mais velhas, evoluindo para as folhas mais novas, até a murcha quase total das plantas submetidas a 13 μM de As (Figura 1).

Contrariamente ao observado para *E. crassipes*, não foi visualizado necrose nas folhas de plântulas de *Brassica rapa* submetidas a tratamentos com 0 a 67 μM de As (Shaibur e Kawai, 2009), o que pode ser justificado pela baixa translocação do metaloide para a parte aérea nessa espécie. Por outro lado, em *Pteris vittata*, a toxicidade ao As foi caracterizada por uma coloração marrom e necrose ao longo das margens das pinas mais velhas (Li *et al.*, 2006), enquanto que, em *Oryza sativa*, houve clorose nas folhas mais jovens, quando exposta a concentrações de até 26,8 μM de As (Shaibur *et al.*, 2006).



Figura 1. Sintomatologia visual de plantas de *Eichhornia crassipes*, após três dias de exposição a diferentes concentrações de As.

Os teores de As nas raízes de *E. crassipes* aumentaram até a concentração de 9 μM (110 μg g⁻¹MS), a partir da qual houve uma redução do teor desse elemento. Por outro lado, houve aumento dos teores de As nas folhas com o incremento da concentração de As em solução, acumulando até 192 μg g⁻¹MS na presença de 13 μM de As. Verificou-se, ainda, que a partir de 7 μM de As, o teor desse elemento nas folhas foi maior que nas raízes (Figura 2).

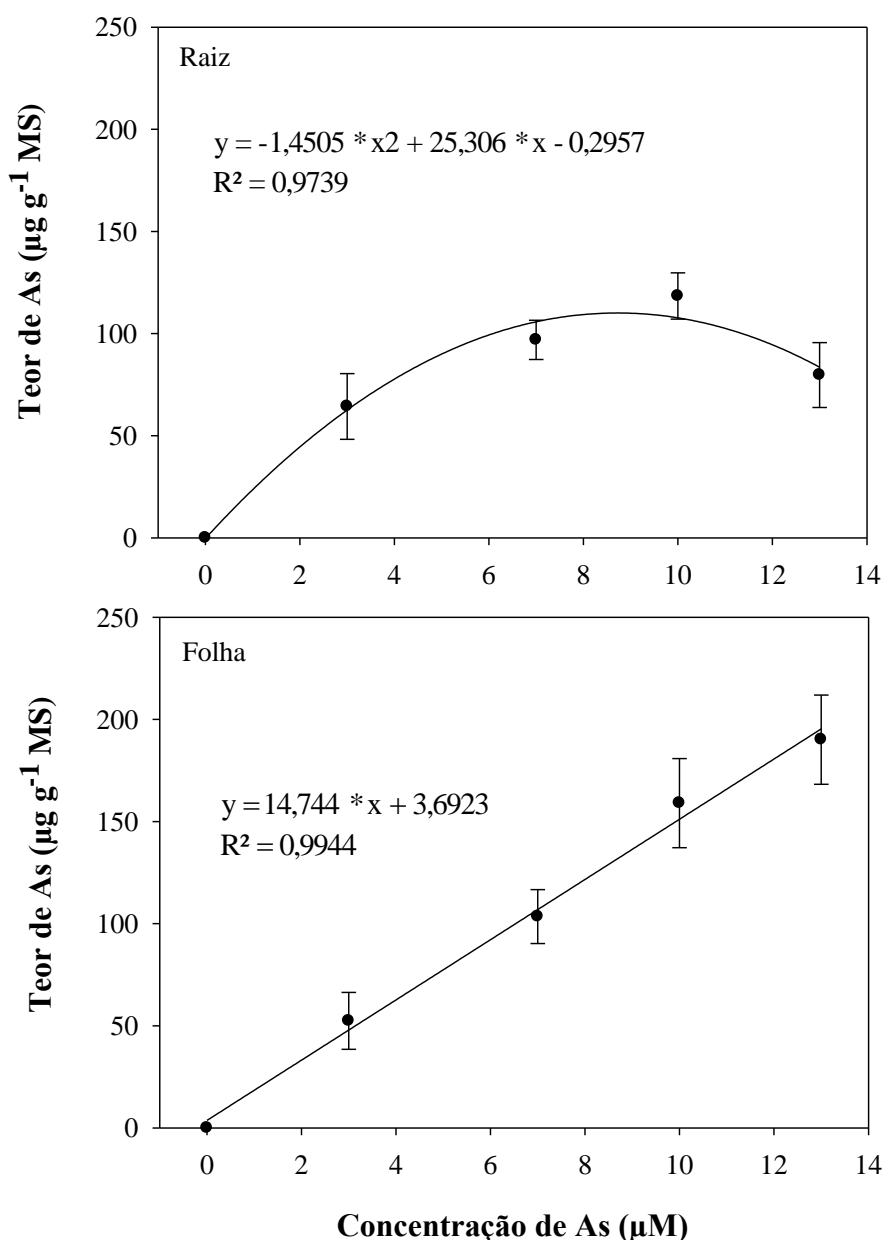


Figura 2. Teores de As em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

Resultados semelhantes foram obtidos em *Silene paradoxa* (Arnetoli *et al.*, 2008), *Pistacia lentiscus* e *Tamarix gallica* (Moreno-Jiménez *et al.*, 2009), cujas plantas apresentaram aumento nos teores de As nas raízes e na parte aérea com o incremento da concentração de arsenato na solução nutritiva. Contudo, nessas espécies, o acúmulo foi maior nas raízes. Robinson *et al.* (2003) também verificaram

uma correlação positiva entre os teores de As encontrados em *Lepidium sativum* e a concentração desse elemento em solução.

Essa redução nos teores de As nas raízes, e o aumento destes nas folhas, indica que à medida que se aumenta a concentração de As na solução nutritiva, há maior absorção desse elemento pelas plantas de *E. crassipes* e, conseqüentemente, maior translocação para a parte aérea. Da mesma forma, Nateewattana *et al.* (2010) verificaram que o acúmulo de As em *E. crassipes* foi maior na parte aérea, sendo que essa macrófita acumulou mais As que *Typha angustifolia*, *Ipomoea aquatica*, *Canna glauca* e *Colocasia esculenta*, acumulando até 206 $\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$.

A exposição de *E. crassipes* a concentrações de 0 a 13 μM de As resultou em decréscimo linear da taxa de crescimento relativo (TCR), o qual foi relacionado com o aumento do teor total de As na planta, atingindo 276 $\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$, quando submetidas a 13 μM de As (Figura 3).

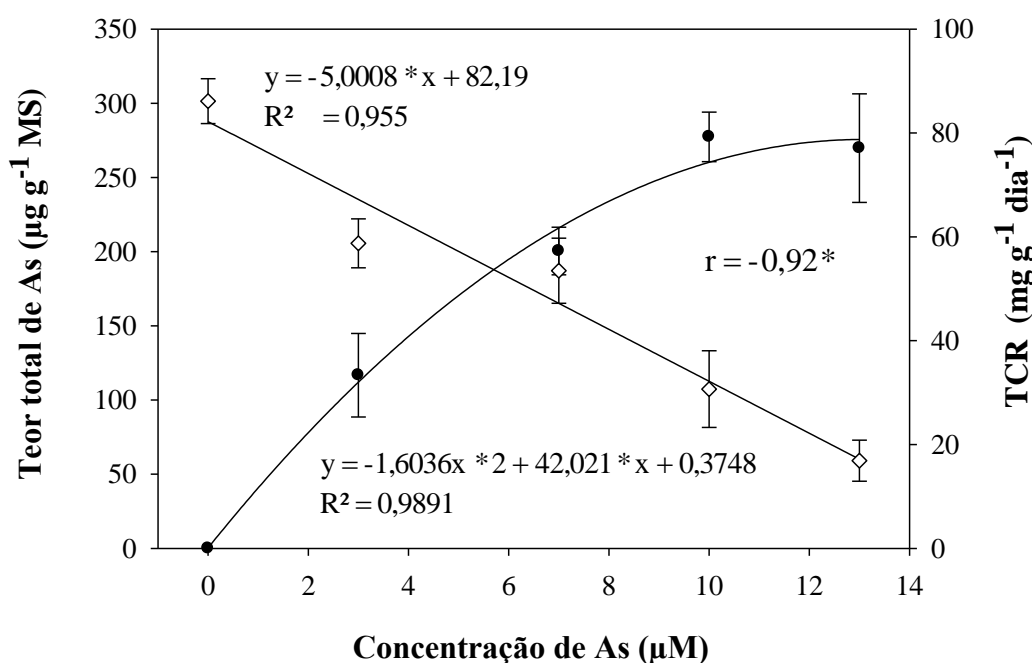


Figura 3. Teores totais de As (●) e taxa de crescimento relativo – TCR (◇) de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

A forte correlação negativa entre a TCR e o teor total de As nas plantas, cujo coeficiente de correlação foi de -0,92, indica que a redução no crescimento dessa macrófita está relacionada à toxicidade a concentrações crescentes de As, o que

sugere que *E. crassipes* apresenta baixa capacidade de tolerância a concentrações mais elevadas desse elemento.

A maior absorção de As com o aumento desse metaloide em solução, também, foi observada em *Spirodela polyrrhiza* (Rahman *et al.*, 2007; 2008), *Azolla filiculoides* (Zhang *et al.*, 2008) e *Brassica juncea* (Srivastava *et al.*, 2009). Entretanto, os teores de As encontrados neste estudo, para *E. crassipes*, foram superiores aos encontrados nessas espécies. Associado à absorção de As, verifica-se que, em várias outras espécies de plantas, ocorre significativa redução no crescimento, conforme observado em *Lemna gibba* (Mkandarwiree *et al.*, 2006), *Azolla filiculoides* e *Azolla caroliniana* (Zhang *et al.* 2008).

Quando submetidas a tratamentos com 3 μM de As, as plantas de *E. crassipes* foram capazes de remover 97% desse elemento da solução, sendo que houve redução da eficiência de remoção à medida que se aumentou a concentração de As na solução nutritiva (Figura 4).

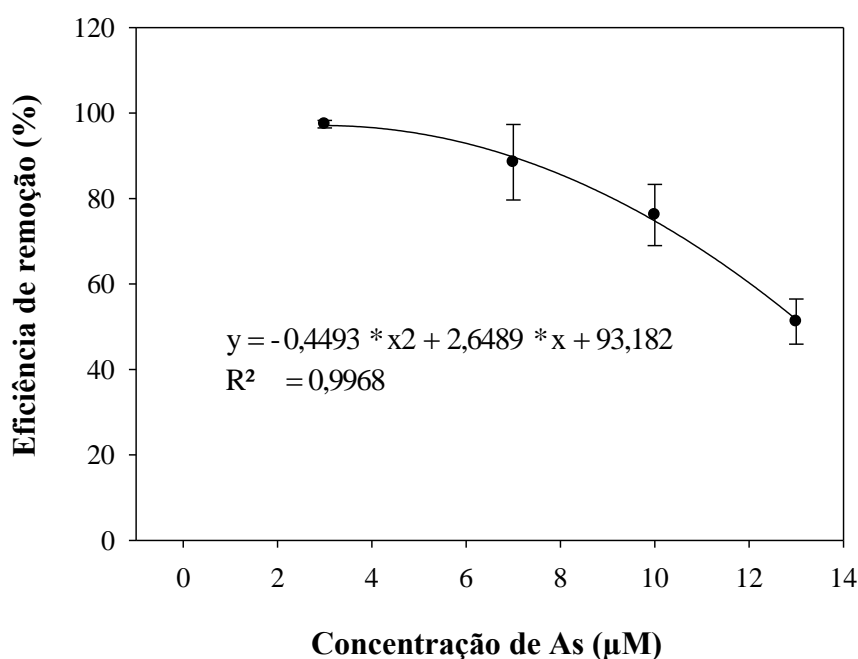


Figura 4. Eficiência de remoção de As por plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

Resultado semelhante foi encontrado por Snyder (2006), no qual essa espécie removeu 97% do As contido em solução na concentração de 4 μM . Elevada

capacidade de remoção foi, também, verificada por Mishra *et al.* (2008c), em que *E. crassipes* foi capaz de remover até 80% do As contido na água, na concentração de 0,7 μM , sendo mais eficiente em relação à *Lemna minor* e *Spirodela polyrrhiza*. Da mesma forma, Alvarado *et al.* (2008) verificaram que *E. crassipes* foi mais eficiente na remoção de As que *Lemna minor*, quando mantidas em solução contendo 2 μM desse elemento. E no estudo de Misbahuddin e Fariduddin (2002), *E. crassipes* foi capaz de remover 100% do As contido em solução 5,3 μM . Por outro lado, na pesquisa de Keith *et al.* (2006), *E. crassipes* não foi capaz de remover de forma eficiente o As de soluções com concentrações de 67, 133 e 267 μM , o que corrobora a evidência deste estudo de que essa espécie é mais eficiente na remoção de As contido em solução sob baixas concentrações.

Embora tenha havido redução da eficiência de remoção de As por *E. crassipes* nas concentrações mais elevadas, verifica-se que mesmo sob 13 μM de As, as plantas foram capazes de remover mais de 50% desse elemento, acumulando grandes quantidades de As. Com isso, pode-se inferir que, em função da rápida absorção desse metaloide, elevadas concentrações de As afetam os mecanismos de tolerância de *E. crassipes*, reduzindo a eficiência de remoção por essa espécie.

O maior valor do fator de bioconcentração (FBC) foi encontrado na menor concentração de As estudada (Figura 5), com posterior redução à medida que se aumentou a concentração desse elemento na solução nutritiva. Por sua vez, houve um incremento no fator de transferência (FT), indicando maior translocação desse elemento das raízes para a parte aérea (Figura 6).

Altos valores de FBC em espécies aquáticas podem torná-las úteis para a bioindicação e fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados por As, sendo que valores de $\text{FBC} \geq 1000$ indicam que a espécie vegetal é hiperacumuladora (Zayed *et al.*, 1998). Os valores de FBC obtidos para *E. crassipes* foram menores que 500, o que não a classificaria como uma espécie hiperacumuladora de As, considerando apenas esse fator. No entanto, não se pode descartar o uso dessa espécie em programas de fitorremediação de ambientes contaminados com esse elemento, uma vez que essa macrófita apresenta rápido crescimento e grande produção de biomassa. De acordo com Wang *et al.* (2002), há limitações quando se indica plantas para fitorremediação considerando apenas a hiperacumulação do metal, sem levar em conta a quantidade de biomassa produzida. Isso foi observado nas espécies *Lemna minor* e *E. crassipes* expostas ao cádmio, em que a quantidade

desse elemento acumulado por *Lemna* foi maior que em *E. crassipes*, mas, em função da biomassa, a quantidade removida por essa espécie foi cinco a dez vezes maior que em *Lemna minor* (Wang *et al.*, 2002).

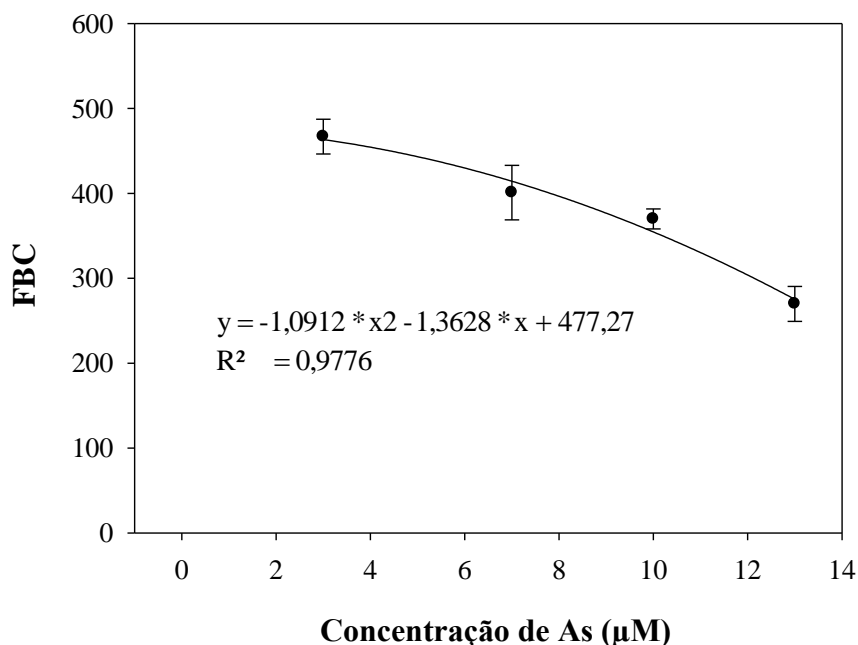


Figura 5. Fator de bioconcentração (FBC) de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

O As apresenta baixa mobilidade nas plantas e, conseqüentemente, reduzida translocação das raízes para a parte aérea, com exceção de plantas hiperacumuladoras (Zhao *et al.*, 2009). Plantas com baixo FT ($< 0,1$) são chamadas de excludoras, em função da restrita absorção e, principalmente, restrita translocação de As das raízes para a parte aérea. Por outro lado, plantas hiperacumuladoras de As são capazes de acumular o As em mais de 2% da massa seca de suas partes aéreas, com FT geralmente excedendo 1,0 (Zhao *et al.*, 2009; 2010).

Em diversas espécies ocorre baixa eficiência de translocação de As das raízes para a parte aérea, como observado em *Cicer arietinum* (Gupta *et al.*, 2008), *Jatropha curcas* (Yadav *et al.*, 2009) e *Brassica rapa* (Shaibur e Kawai, 2009). Contudo, para utilização em programas de fitorremediação, é interessante que as plantas apresentem elevada translocação e, conseqüentemente, elevado acúmulo de As na parte aérea. Os valores de FT encontrados neste estudo, para plantas de *E.*

crassipes submetidas a concentrações maiores que 7 μM de As, foram superiores a 1,0. Isso indica que, à medida que se aumenta a absorção de As por *E. crassipes*, há maior translocação desse elemento para a parte aérea, o que demonstra o grande potencial dessa macrófita na remoção do As de ambientes aquáticos, assim como para outros elementos, conforme sugerido por Agunbiade *et al.* (2009).

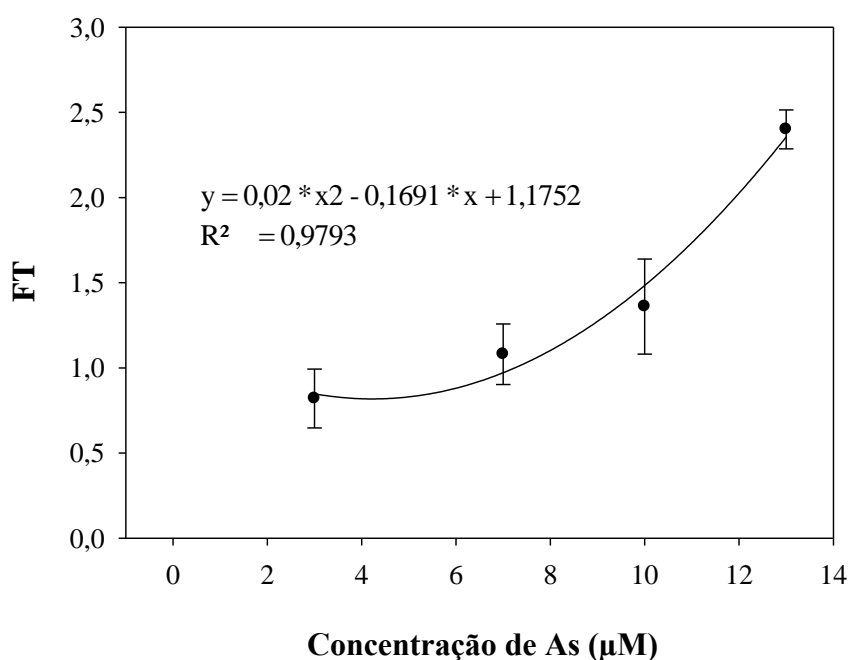


Figura 6. Fator de transferência (FT) do As em plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

Assim, pode-se dizer que as concentrações mais elevadas de As (acima de 7 μM) afetaram significativamente o desenvolvimento das plantas, com severos sintomas de toxidez, o que ocorreu em função da rápida absorção e grande translocação de As para a parte aérea, comprometendo o metabolismo geral da planta, e afetando negativamente os mecanismos de tolerância de *E. crassipes* a esse metaloide.

A exposição a concentrações crescentes de As resultou em decréscimos significativos nos teores de clorofilas *a*, *b* e total (Figura 7) e carotenoides (Figura 8).

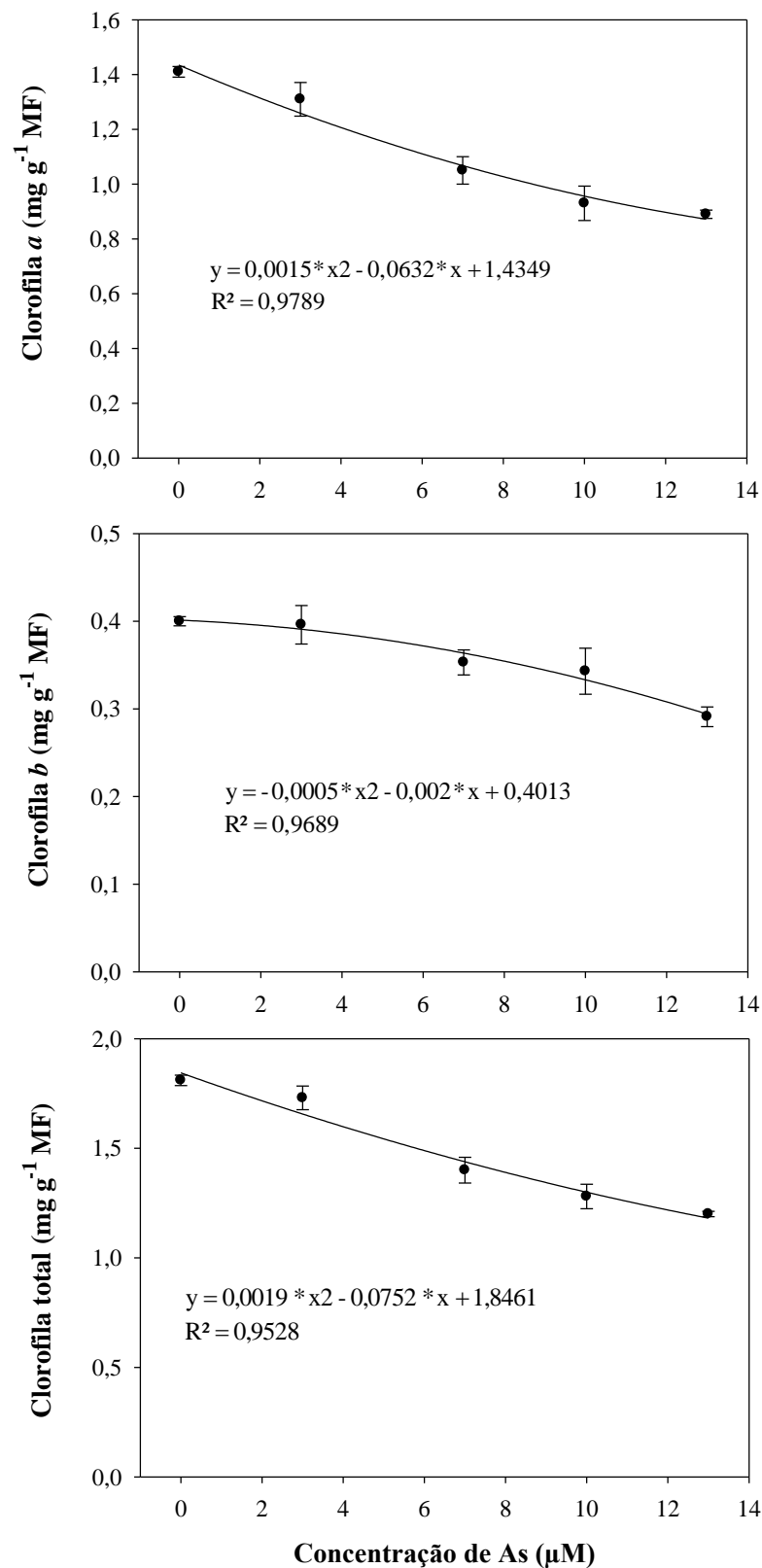


Figura 7. Teores de clorofilas *a*, *b*, e total em folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

A análise nas variações dos teores desses pigmentos fotossintéticos já foi utilizada para indicar danos oxidativos decorrentes da exposição de plantas ao As (Singh *et al.*, 2006). Em *E. crassipes*, esses danos ocorreram em plantas expostas às concentrações elevadas de As, resultando na alteração dos teores de pigmentos fotossintéticos. Efeitos tóxicos semelhantes foram observados em *Zea mays* (Jain e Gadre, 1997), *Trifolium pretense* (Mascher *et al.*, 2002), *Pteris vittata*, *Pteris ensiformis* (Singh *et al.*, 2006), *Oryza sativa* (Shaibur *et al.*, 2006), *Pistacia lentiscus*, *Tamarix gallica* (Moreno-Jiménez *et al.*, 2009) e *Nasturtium officinale* (Ozturk *et al.*, 2010).

A redução nos teores das clorofilas pode ser decorrente da peroxidação lipídica causada pela exposição das plantas ao As, com consequentes danos nas membranas dos cloroplastos e inibição da síntese de clorofilas (Singh *et al.*, 2006), como também devido à menor absorção de alguns nutrientes, tais como fósforo, ferro, cobre e manganês (Srivastava *et al.*, 2007).

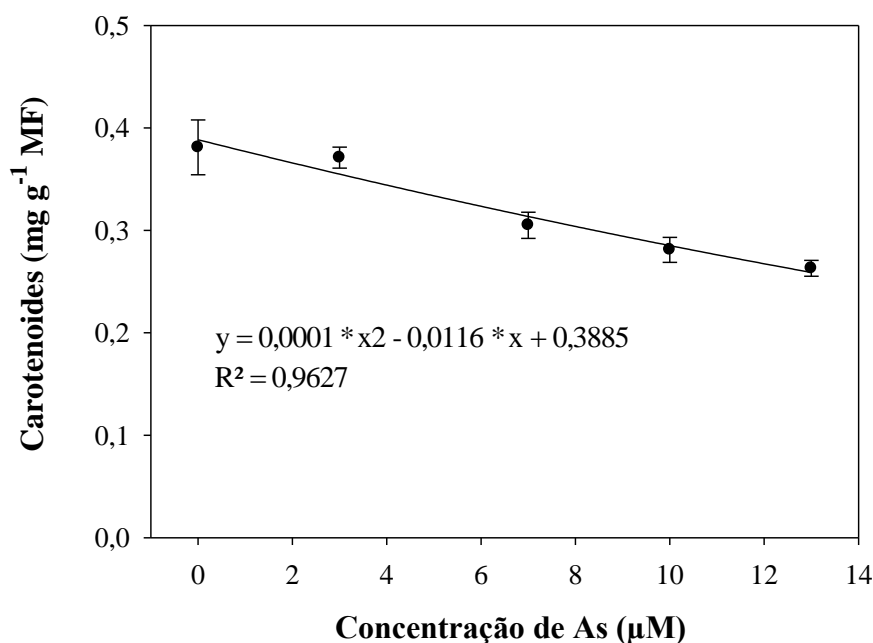


Figura 8. Teores de carotenoides em folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

Os teores de carotenoides, também, foram afetados significativamente pela exposição das plantas a elevadas concentrações de As. Os carotenoides são uma classe de pigmentos hidrofóbicos naturalmente encontrados nas plantas, os quais

apresentam papel fundamental no processo fotossintético, bem como na atividade antioxidante associada às membranas (Singh *et al.*, 2006). Assim, verifica-se que a presença de As nos tecidos de *E. crassipes* pode ter contribuído para a diminuição nos teores de carotenoides, reduzindo o efeito protetor desse pigmento nas plantas.

De modo geral, os menores teores de clorofilas e carotenoides encontrados em *E. crassipes*, provavelmente, comprometeram a sua capacidade fotossintética, justificando a redução na taxa de crescimento relativo das plantas expostas a concentrações mais elevadas de As.

Nas raízes e pecíolos de *E. crassipes*, houve aumento proporcional nos teores de antocianina com o acréscimo das concentrações de As, sendo que as raízes apresentaram maiores teores dessa substância em comparação ao pecíolo (Figura 9).

O arsenato, devido à sua similaridade com o fosfato, é absorvido pelas plantas pelos mesmos transportadores (Abedin *et al.*, 2002), como observado em *Spirodela polyrrhiza* (Rahman *et al.*, 2008) e *Lemna gibba* (Mkandawire e Dudel, 2005), o que pode comprometer a absorção de fosfato e, dessa forma, resultar em deficiência de fósforo e indução de síntese de antocianinas (Catarcha, 2007).

As antocianinas são metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos flavonoides com atividade antioxidante (Chalker-Scott, 1999), as quais são capazes de consumir radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio (Chen *et al.*, 1996), reduzindo a oxidação de componentes celulares (Valko *et al.*, 2006). Aparentemente, o aumento das concentrações de As pode ter provocado a deficiência de fósforo em *E. crassipes*, induzindo maior síntese de antocianinas. Contudo, o aumento nos teores dessa substância não foi suficiente para conferir tolerância à planta a elevadas concentrações de As.

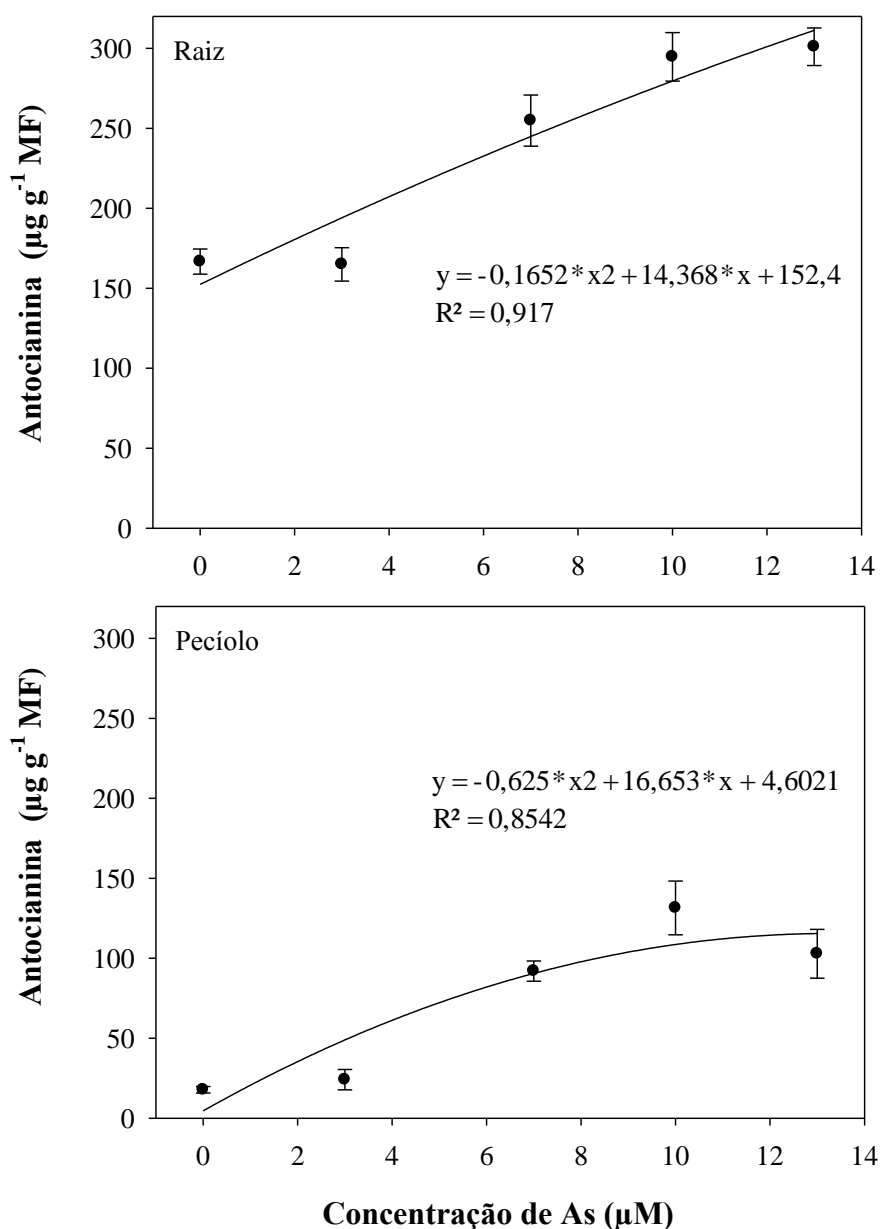


Figura 9. Teores de antocianina em raízes e pecíolos de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

Os danos oxidativos potenciais decorrentes da exposição das plantas ao As podem, também, ser estudados por meio da análise dos compostos causadores desses danos, os quais são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) (Singh *et al.*, 2006) e pela análise da atividade de enzimas envolvidas na remoção desses compostos.

A exposição das plantas a concentrações crescentes de As resultou em decréscimo inicial do teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas raízes e nas folhas, com posterior aumento a partir da concentração de 5 μM de As (Figura 10).

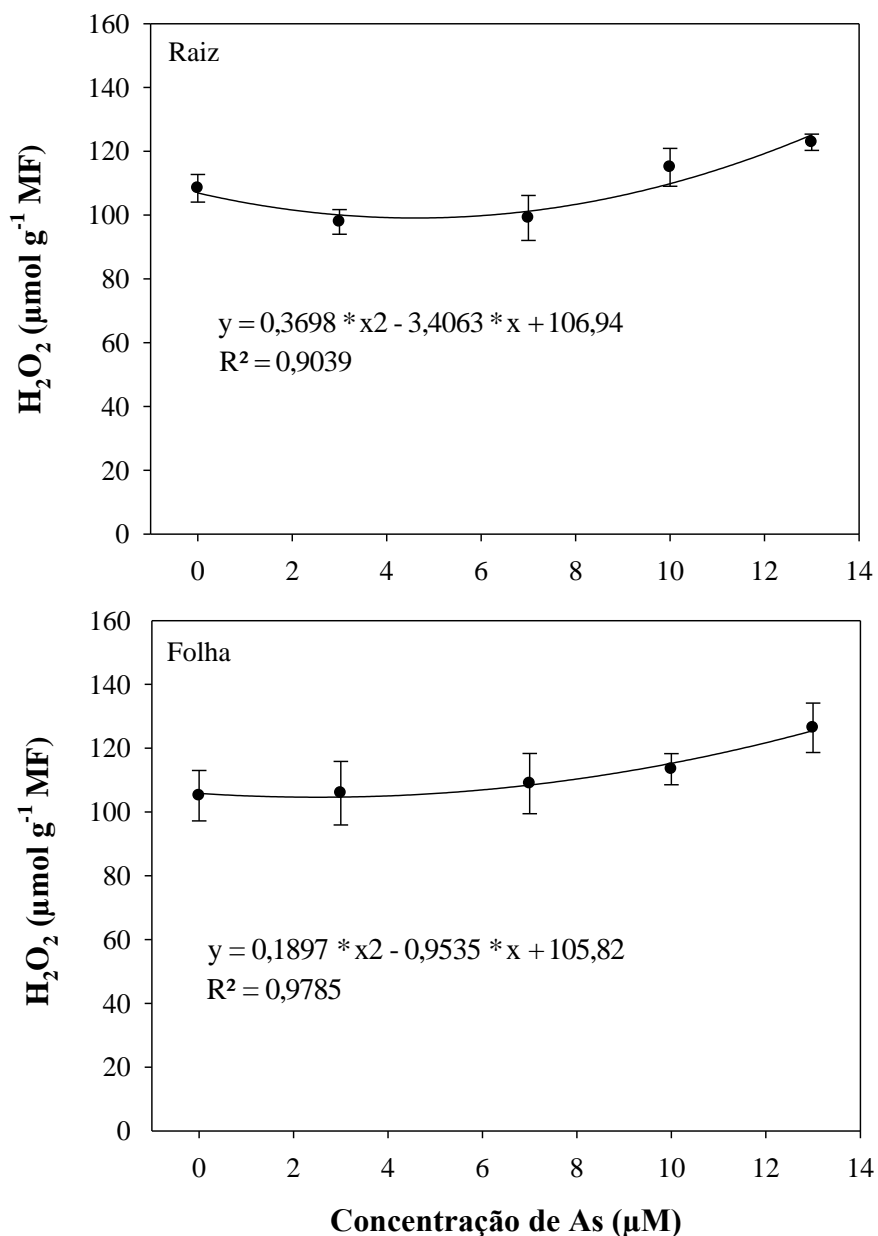


Figura 10. Teores de peróxido de hidrogênio em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

O H_2O_2 , produto da atividade da dismutase do superóxido, é tóxico às células, sendo que essa redução nos teores desse composto em *E. crassipes*, expostas a concentrações moderadas de As, deve-se, provavelmente, à ação eficiente das

enzimas envolvidas com o combate ao estresse oxidativo, como a catalase e o ciclo ascorbato-glutationa. Entretanto, o posterior aumento nos teores de H_2O_2 pode ser decorrente da presença de elevados níveis endógenos de As, comprometendo o sistema de defesa antioxidativo nessa espécie.

Aumentos na produção de H_2O_2 em plantas expostas ao As ocorrem em diversas espécies vegetais, como em *Hydrilla verticillata* (Srivastava e D'Souza, 2010) e *Brassica juncea* (Khan *et al.*, 2009). Por outro lado, em *Ceratophyllum demersum*, não houve aumento significativo nos teores de H_2O_2 sob concentrações de até 20 μM de As (Mishra *et al.*, 2008a), e em *Phaseolus aureus*, houve redução nos teores desse composto na presença de 50 μM de As (Singh *et al.*, 2007).

O tratamento com As aumentou a atividade da dismutase do superóxido (SOD) nas folhas, até a concentração de 8 μM desse metaloide. Por sua vez, a presença de As na solução nutritiva induziu um ligeiro decréscimo da atividade dessa enzima nas raízes (Figura 11).

As SODs constituem a primeira linha de defesa contra as EROs (Alscher *et al.*, 2002), sendo metaloenzimas muito eficientes na eliminação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Asada, 1992; Scandalios, 1993), reduzindo a formação do radical hidroxila (HO^{\bullet}) gerado pelas reações “Haber-Weiss” (Arora, 2002), e convertendo o $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2 (Møller, 2001; Ahmad *et al.*, 2008).

A atividade da SOD, em níveis adequados sob condições de estresse, é fundamental para a manutenção do $O_2^{\bullet-}$ em concentrações que não causem danos celulares. Assim, o aumento na atividade dessa enzima, observado nas folhas de *E. crassipes* expostas a concentrações de até 8 μM de As, pode representar parte do mecanismo de defesa ao estresse oxidativo causado por esse elemento. Aumentos similares na atividade da SOD, em resposta a tratamentos com As, já foram relatados em *Trifolium pratense* (Mascher *et al.*, 2002), *Nephrolepis exaltata* (Srivastava *et al.*, 2005), *Phaseolus aureus* (Singh *et al.*, 2007), diversas espécies de *Pteris* (Liu *et al.*, 2009) e *Brassica juncea* (Khan *et al.*, 2009).

Verifica-se, ainda, que há decréscimo na atividade da SOD nas plantas submetidas a concentrações mais elevadas de As, o qual pode ser atribuído à inativação enzimática pelo excesso de EROs, decorrentes da ação tóxica do As, conforme sugeriram Khan *et al.* (2009).

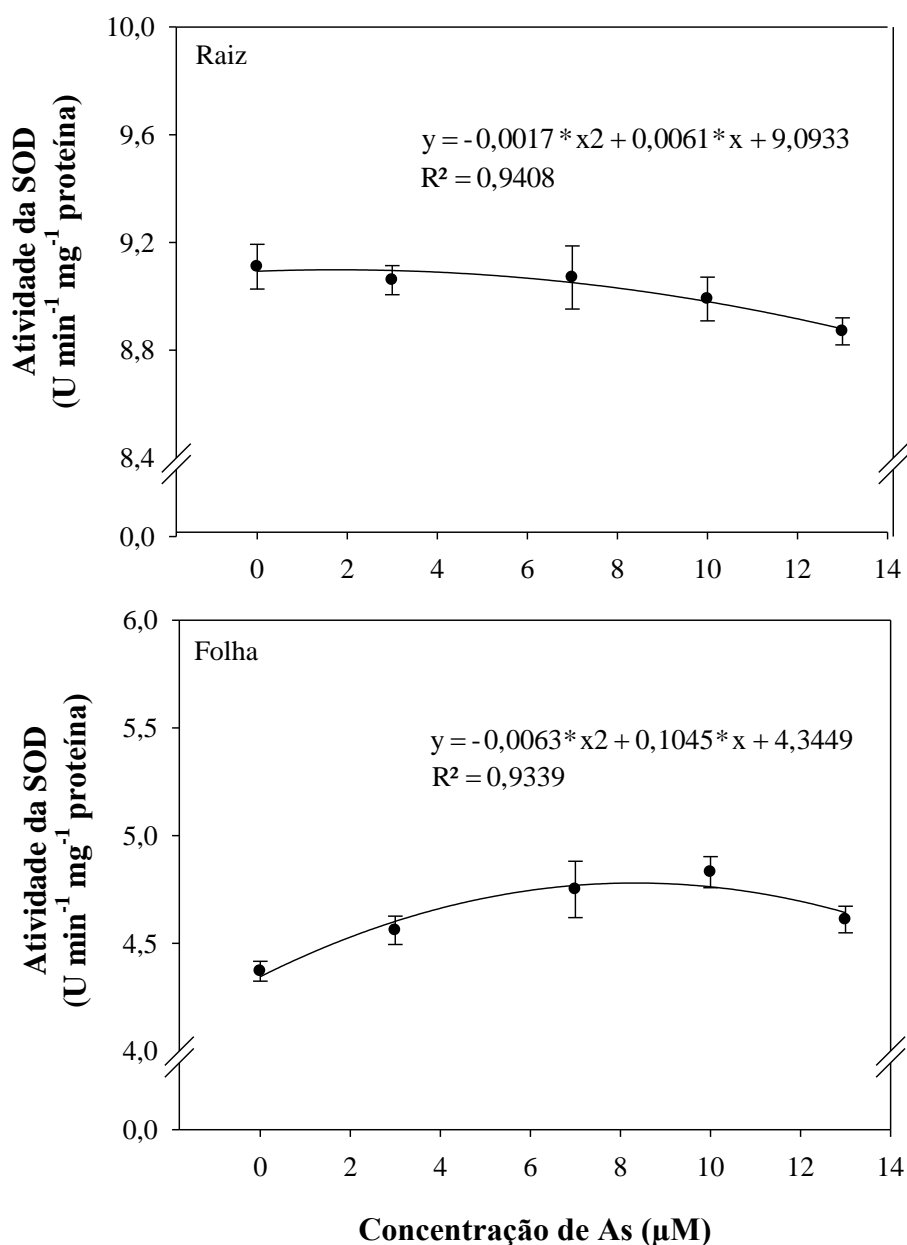


Figura 11. Atividade das dismutases do superóxido (SODs) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

Além da SOD, a catalase (CAT) é uma enzima importante contra o estresse oxidativo, sendo capaz de eliminar o H₂O₂, principal produto gerado pela SOD (Asada, 1992; Møller, 2001), formando H₂O e O₂ (Lin e Kao, 2000; Møller, 2001). Nas plantas expostas ao As, observaram-se acréscimos significativos na atividade dessa enzima nas raízes, a qual aumentou até a concentração de 6 μM, com redução nas concentrações mais elevadas de As, mas mantendo-se superior à atividade

observada nas folhas. Contudo, nas folhas, a presença do As reduziu a atividade dessa enzima (Figura 12).

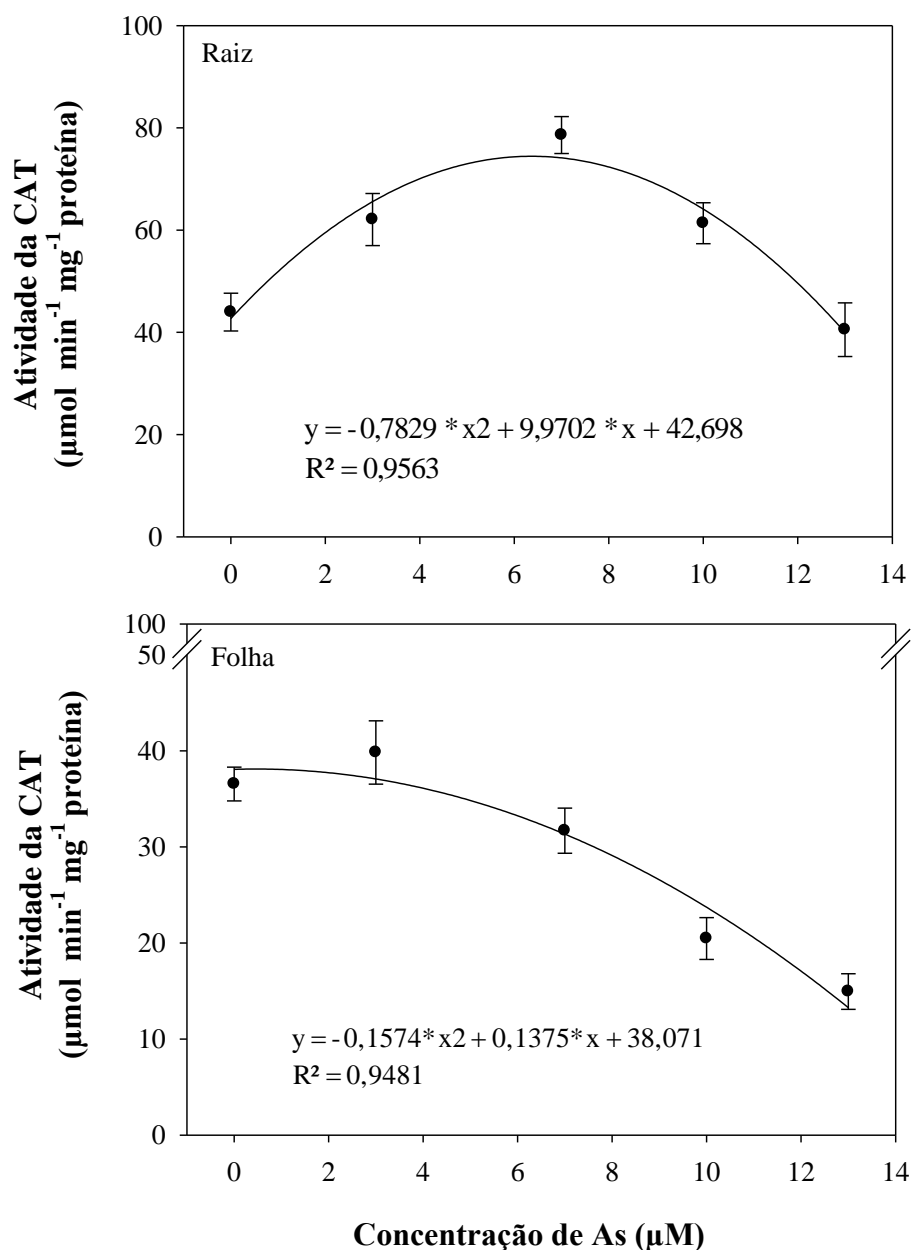


Figura 12. Atividade das catalases (CATs) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

Segundo Srivastava *et al.* (2005), a CAT é uma enzima mais eficiente na remoção do H₂O₂ em espécies vegetais hiperacumuladoras, não tendo a mesma importância em espécies vegetais sensíveis. No presente estudo, o aumento na

atividade da CAT e a redução nos teores de H_2O_2 , nas raízes das plantas expostas até 6 μM de As, sugere que essa enzima atua efetivamente na remoção do H_2O_2 nesse órgão. Todavia, concentrações mais elevadas de As podem ter provocado a oxidação da CAT, em função da ação de EROs, reduzindo a atividade antioxidativa dessa enzima. Já nas folhas, a exposição a baixas concentrações de As foi suficiente para inibir a atividade dessa enzima e, com isso, a CAT parece não atuar na remoção do H_2O_2 produzido em resposta à ação tóxica do As nas folhas. Reduções na atividade da CAT, também, foram observadas em raízes de *Phaseolus aureus* submetidas a 50 μM de As (Singh *et al.*, 2007). Por outro lado, Khan *et al.* (2009) verificaram que não houve aumento na atividade da CAT em folhas de *Brassica juncea* tratadas com 5 e 25 μM de As.

A exposição a concentrações de 0 a 13 μM de As reduziu significativamente a atividade das peroxidases (POXs) nas raízes, enquanto nas folhas houve um acréscimo na atividade dessa enzima até a concentração de 10 μM . Verifica-se, ainda, que a atividade da POX nas raízes chega a ser até 17 vezes maior em relação às folhas (Figura 13).

Segundo Willekens *et al.* (1997), a função da CAT na célula é remover a maior parte do H_2O_2 , enquanto as POXs estariam, principalmente, envolvidas na eliminação do H_2O_2 que não foi utilizado pela CAT, a qual apresenta menor afinidade pelo H_2O_2 em relação às POXs. O sistema CAT/POX pode, então, atuar cooperativamente para remover o H_2O_2 com o mínimo de gasto de poder redutor.

Contrariamente ao observado para a CAT, a exposição ao As reduziu a atividade das POXs nas raízes, entretanto, nas folhas, houve maior estímulo na atividade dessa enzima. Assim, verifica-se que, provavelmente, a redução nos teores de H_2O_2 , observado nas raízes, foi decorrente da ação da CAT. Por outro lado, as POXs parecem ter sido responsáveis pela remoção eficiente do H_2O_2 nas folhas. Resultado semelhante foi obtido em *Trifolium pratense*, em que houve aumento na atividade das POXs, nas folhas, com o acréscimo da concentração de As (Mascher *et al.*, 2002).

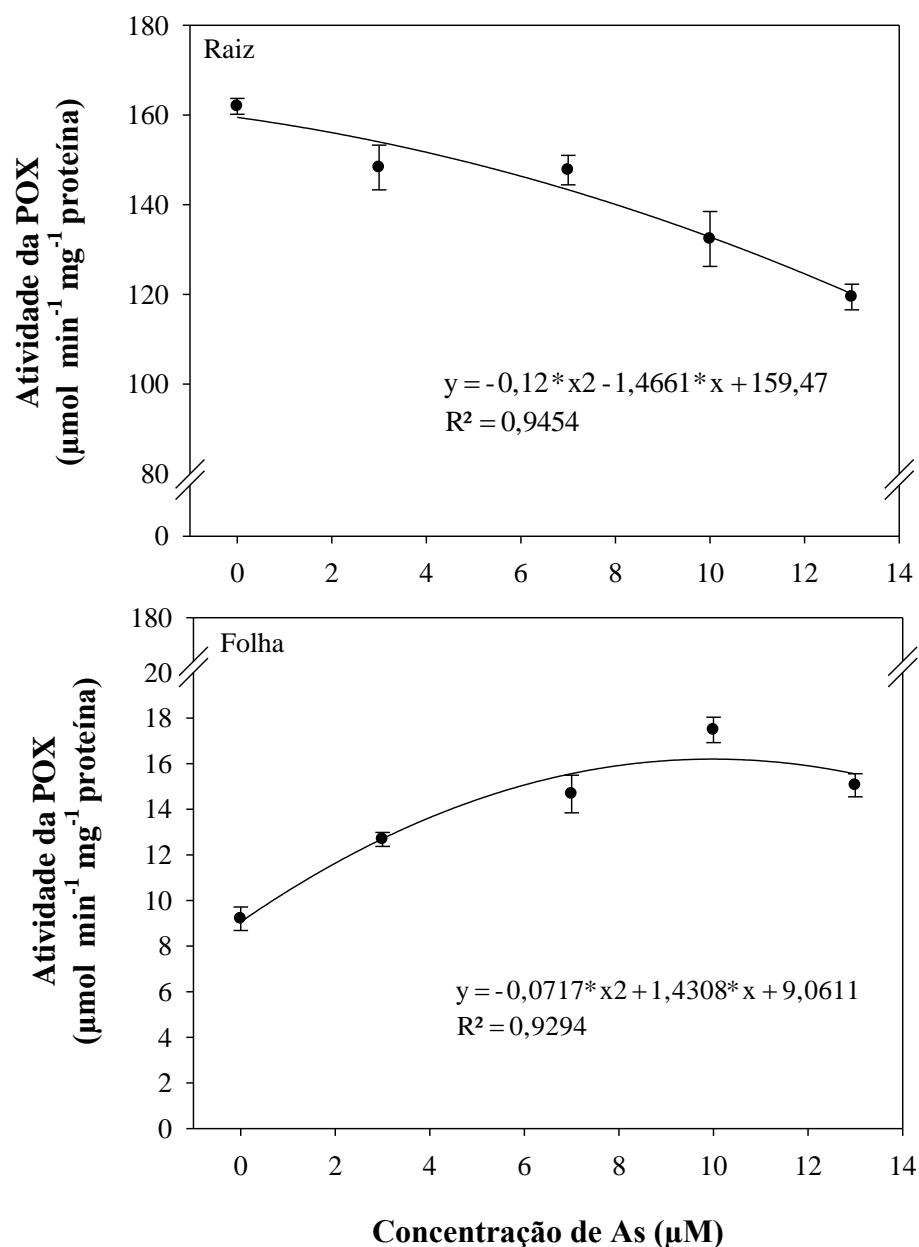


Figura 13. Atividade das peroxidases (POXs) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

Nas raízes, houve redução na atividade da peroxidase do ascorbato (APX) quando as plantas foram submetidas aos tratamentos com As. Enquanto nas folhas, houve incremento na atividade da APX até a concentração de 5,5 μM , com redução em concentrações mais elevadas (Figura 14).

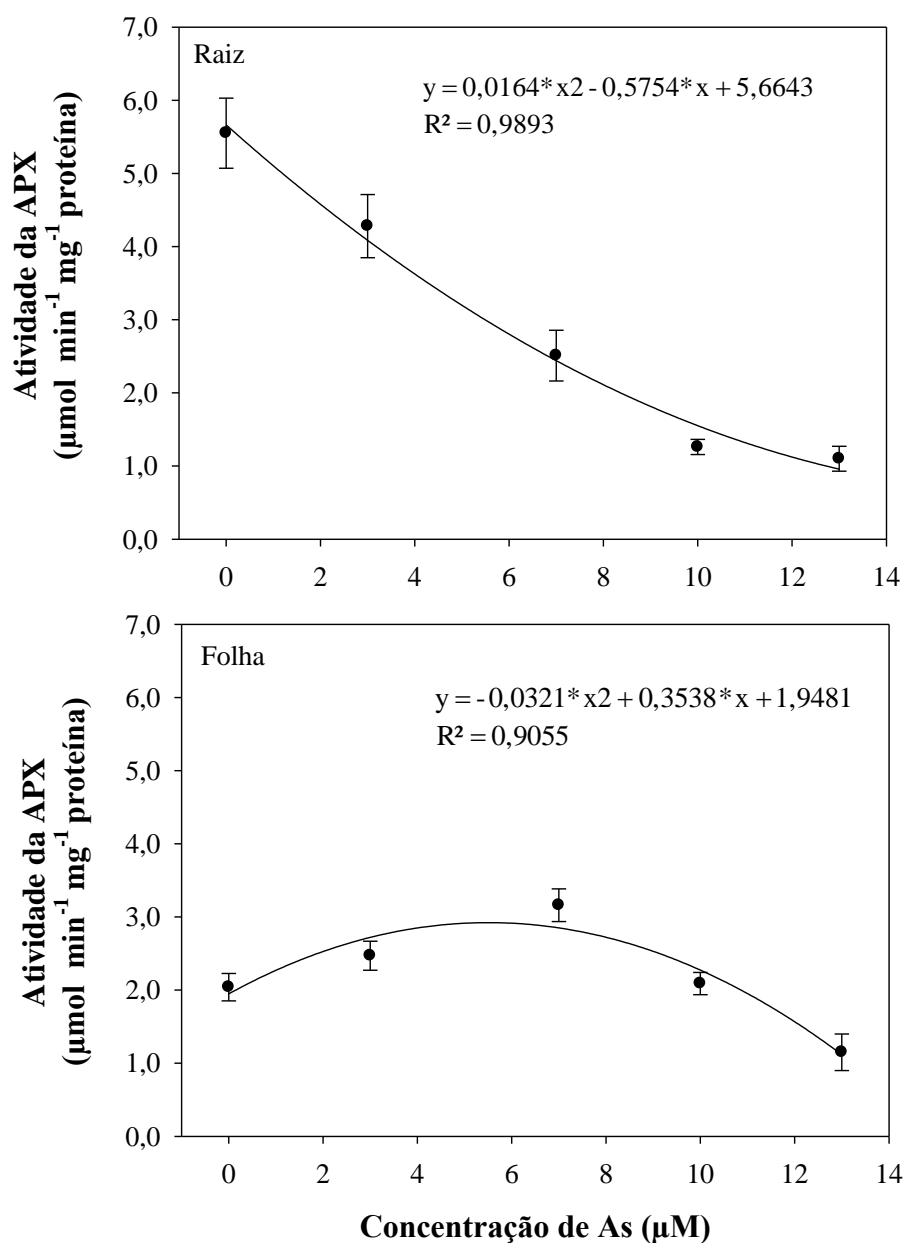


Figura 14. Atividade das peroxidases do ascorbato (APXs) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas a diferentes concentrações de As. (*) Significativo ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão da média.

A APX, também, é requerida para eliminar o H_2O_2 , produzido principalmente nos cloroplastos e outras organelas celulares (Asada, 1992). Esta enzima utiliza o poder redutor do ácido ascórbico (Srivastava *et al.*, 2005) e apresenta maior afinidade pelo H_2O_2 (μM) do que a CAT (mM) (Ahmad *et al.*, 2008). Da mesma forma que nas POXs, a atividade da APX foi estimulada na presença de moderadas

concentrações de As nas folhas, indicando que essa enzima deve contribuir eficientemente para a remoção do H₂O₂ produzido nesse órgão.

Trabalhos realizados com *Phaseolus aureus* (Singh *et al.*, 2007), *Hydrilla verticillata* (Srivastava *et al.*, 2007), *Ceratophyllum demersum* (Mishra *et al.*, 2008a) e *Brassica juncea* (Khan *et al.*, 2009) demonstraram que a exposição ao As, também, induz o aumento na atividade da APX nessas espécies. De forma semelhante, a atividade da APX em *Pteris vittata*, *Pteris ensiformis* e *Nephrolepis exaltata* aumentou com a exposição ao As, sendo essa atividade maior nas raízes (Srivastava *et al.*, 2005).

Assim, o aumento nas atividades da SOD, POX e APX nas folhas, e da CAT nas raízes, devem ter contribuído para a remoção do excesso de EROs nas plantas expostas a concentrações mais baixas de As. Sob tais condições, a ação conjunta da CAT, POX e APX proporcionaram a eficiente remoção do H₂O₂ resultante da conversão de O₂^{•-} pela SOD, entretanto, concentrações de As mais elevadas reduzem a ação dessas enzimas.

De uma forma geral, verifica-se que concentrações de As maiores que 7 µM afetam significativamente a sobrevivência de *E. crassipes*, com redução na atividade das enzimas antioxidativas, comprometendo a tolerância dessa macrófita ao As. Isso pode ser justificado pelo fato de que, devido à grande biomassa, essa espécie absorve rapidamente o arsenato, o qual deve ser reduzido a arsenito na planta, gerando o aumento da produção de EROs e, com isso, não consegue manter o sistema de defesa em níveis adequados na mesma proporção em que acumula o As. Entretanto, para concentrações de As inferiores a 7 µM, a qual ainda é muito superior ao limite estabelecido pela Organização Mundial da Saúde, para a água de consumo (em torno de 0,1 µM), *E. crassipes* mantém seus mecanismos de defesa em níveis adequados, capazes de remover e acumular a maior parte desse elemento contido em solução, sem sintomas severos de toxidez, podendo ser indicada para programas de fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados com concentrações moderadas de As.

4. Referências Bibliográficas

Abercrombie J, Halfhill MD, Ranjan P, Rao MR, Saxton AM, Yuan JS, Stewart Jr CN, 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) Stress. **BMC Plant Biology**, 8:87.

Agunbiade F, Olu-Owolabi BI, Adebowale KO, 2009. Phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* in metal-contaminated coastal water. **Bioresource Technology**, 100:4521–4526.

Ahmad P, Sarwat M, Sharma S, 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, 51:167-173.

Alkorta I, Allica, JH, Garbisu C, 2004. Plants against the global epidemic of arsenic poisoning. **Environment International**, 30:949– 951.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS, 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53:1331–1341.

Alvarado S, Guédez M, Lué-Merú MP, Nelson G, Álvaro A, Jesús AC, Gyula Z, 2008. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). **Bioresource Technology**, 99:8436–8440.

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.

ATSDR, 2007. CERCLA priority list of hazardous substances. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>.

Arnetoli M, Vooijs R, Bookum Wt, Galardi F, Gonnelli C, Gabbrielli R, Schat H, Verkleij JAC, 2008. Arsenate tolerance in *Silene paradoxa* does not rely on phytochelatin-dependent sequestration. **Environmental Pollution**, 152:585-591.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC, 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, 82:1227-1238.

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

Beauchamp C, Fridovich I, 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, 44:276-287.

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

Breusegem FV, Vranová E, Dat JF, Inzé D, 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, 161: 405–414.

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**, New York, Academic Press, 488-495.

Catarecha P, Segura, MD, Zorrilla JMF, Ponce, BG, Lanz M, Solano R, Ares JP, Leyva A, 2007. Mutant of the *Arabidopsis* Phosphate Transporter PHT1;1 Displays Enhanced Arsenic Accumulation. **The Plant Cell**, 19:1123-1133.

Chalker-Scott L, 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. **Photochemistry and Photobiology**, 70:1-9.

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

Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung, KP, Wang, J, 1996. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. **Chemistry and Physics of Lipids**, 79:157–163.

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

Cordes, KB, Mehra, A, Farago, ME, Banerjee, DK, 2000. Uptake of Cd, Cu, Ni and Zn by the water hyacinth, *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms from pulverized fuel ash (PFA) leachates and slurries. **Environmental Geochemistry and Health**, 22:297–316.

Dhote S, Dixit S, 2009. Water quality improvement through macrophytes—a review. **Environmental Monitoring Assessment**, 152:149–153.

Gay C, Gebicki JM, 2000. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferricytlenol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, 284: 217-220.

Giannopolitis CN, Ries SK, 1977. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, 59:309-314.

Gupta DK, Tripathi RD, Srivastava S, Dwivedi S, Rai UN, Yang XE, Huanj H, Inouhe M, 2008. Arsenic accumulation in root and shoot vis-a-vis its effects on growth and level of phytochelatins in seedlings of *Cicer arietinum* L. **Journal of Environmental Biology**, 29:281-286.

Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Meharg AA, 2001. Copper and arsenate induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. **Plant, Cell and Environment**, 24:713–722.

Harun NH, Tuah PM, Markom NZ, Yusof MY, 2008. Distribution of heavy metals in *Monochoria hastata* and *Eichornia crassipes* in natural habitats. International Conference on Environmental Research and Technology (ICERT 2008).

Havir EA, McHale NA, 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84:450-455.

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

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

Jain M, Gadre R, 1997. Effect of As on chlorophyll and protein contents and enzymatic activities in greening maize leaves. **Water, Air, and Soil Pollution**, 93:109-115.

Kar M, Nishra D, 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, 57:315-319.

Keith C, Borazjani H, Diehl SV, Su Y, Baldwin. Removal of copper, chromium, and arsenic by water hyacinths. 36th Annual Mississippi Water Resources Conference, 2006.

Khan I, Ahmad A, Iqbal M, 2009. Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72:626-634.

Klumpp A, Bauer K, Franz-Gerstein C, Menezes M, 2002. Variation of nutrient and metal concentrations in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia (Brazil). **Environment International**, 28:165-171.

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

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

Li WX, Chen TB, Huang ZC, Lei M, Liao XY, 2006. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Chemosphere**, 62:803–809.

Liu Y, Wang HB, Wong MH, Ye ZH, 2009. The role of arsenate reductase and superoxide dismutase in As accumulation in four *Pteris* species. **Environment International**, 35:491–495.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, 193:265-275.

Lytle CM, Lytle FW, Yang N, Qian JH, Hansen D, Zayed A, Terry N, 1998. Reduction of Cr (IV) to Cr (III) by wetland plants: potential for in situ heavy metal detoxification. **Environmental Science and Technology**, 32:3087–3093.

Maine MA, Duarte MV, Sune LS, 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. **Water Resource**, 35:2629–2634.

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.

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.

Mattina MI, Berger WL, Musante C, 2003. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. **Environmental Pollution**, 124:375–378.

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

Misbahuddin M, Fariduddin A, 2002. Water hyacinth removes arsenic from arsenic-contaminated drinking water. **Archives of environmental health**, 57:516-518.

Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Trivedi PK, 2008a. Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. **Aquatic Toxicology**, 86:205–215.

Mishra VK, Upadhyay AR, Pandey SK, Tripathi BD, 2008b. Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent. **Environmental Monitoring and Assessment**, 141:49–58.

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

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.

Moreno-Jiménez E, Esteban E, Carpena-Ruiz RO, Penalosa JM, 2009. Arsenic- and mercury-induced phytotoxicity in the Mediterranean shrubs *Pistacia lentiscus* and *Tamarix gallica* grown in hydroponic culture. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72:1781–1789.

Møller, IM, 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52:561–91.

Mukherjee A, Bhattacharya P, Savage K, Foster A, Bunschuh J, 2008. Distribution of geogenic arsenic in hydrologic systems: Controls and challenges. **Journal of Contaminant Hydrology**, 99:1-7.

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

Nateewattana J, Trichaiyaporn S, Saouy M, Nattewattana J, Thavornnyutikarn P, Pengchai P, Choonluchanon, 2010. Monitoring of arsenic in aquatic plants, water, and sediment of wastewater treatment ponds at the Mae Moh Lignite power plant, Thailand. **Environmental Monitoring Assessment**, 165:585–594.

Oremland RS, Stolz JF, 2003. The ecology of arsenic. **Science**, 300:939–44.

Ozturk F, Duman F, Leblebici Z, Temizgul R, 2010. Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. **Environmental and Experimental Botany**, 69:167–174.

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.

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

Pickering, IJ, Gummaelius, L, Harris, HH, Prince, RC, Hirsch, G, Banks, JA, Salt, DE, George, GN, 2006. Localizing the biochemical transformations of arsenate in hyperaccumulating fern. **Environmental Science and Technology**, 40:5010–5014.

Prasad MNV, 2003. Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: hype for commercialization. **Russian Journal of Plant Physiology**, 50:686–700.

Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Okumura C, Rahman CM, 2007. Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.): A good option for phytoremediation. **Chemosphere**, 69:493–499.

Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Rahman MM, 2008. Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrhiza* L.: Interactions with phosphate and iron. **Journal of Hazardous Materials**, 160:356–361.

Robinson B, Duwing C, Bolan N, Kannathasan M, Saravanan A, 2003. Uptake of arsenic by New Zealand watercress (*Lepidium sativum*). **The Science of the Total Environment**, 30:67–73.

Robinson B, Kim N, Marchetti M, Moni C, Schroeter L, Dijssel CVD, Milne G, Clothier B, 2006. Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. **Environmental and Experimental Botany**, 58:206–215.

Shaibur MR, Kitajima N, Sugawara R, Kondo T, Huq SMI, Kawai S, 2006. Physiological and mineralogical properties of arsenic-induced chlorosis in rice seedlings grown hydroponically. **Soil Science and Plant Nutrition**, 52:691–700.

Shaibur MR, Kawai S, 2009. Effect of arsenic on visible symptom and arsenic concentration in hydroponic Japanese mustard spinach. **Environmental and Experimental Botany**, 67:65–70.

Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B, 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. **Plant Science**, 170:274–282.

Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K, 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, 53:65–73.

Smedley PL, Kinniburgh DG, 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. **Applied Geochemistry**, 17:517–568.

Snyder KV, 2006. Removal of arsenic from drinking water by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). **Journal of U.S. SJWP**, 1:41-58.

Srivastava M, Ma LQ, Singh N, Singh S, 2005. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. **Journal of Experimental Botany**, 56:1335–1342.

Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD, Dwivedi S, Trivedi PK, Tandon PK, 2007. Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Environmental Science Technology**, 4:2930-2936.

Srivastava S, Srivastava AK, Suprasanna P, D'Souza SF, 2009. Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 15:1-13.

Srivastava S, D'Souza SF, 2010. Effect of variable sulfur supply on arsenic tolerance and antioxidant responses in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73:1314-1322.

Yadav SK, Juwarkar AA, Kumar GP, Thawale PR, Singh SK, Charabarti T, 2009. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, 100:4616–4622.

Wang Q, Cui Y, Dong Y, 2002. Phytoremediation of polluted waters potentials and prospects of wetland plants. **Acta Biotechnologica**, 22:199–208.

Wellburn, AR, 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144:307–313.

Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Montagu MV, Inzé D, Camp WV, 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. **The EMBO Journal**, 16:4806–4816.

World Health Organization, 1993. Guidelines for drinking-water quality, v.1:Recommendations, 2nd ed. WHO, Geneva.

Zayed A, Gowthaman S and Terry N, 1998a. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. **Journal of Environmental Quality**, 27, 715-21.

Zayed A, Lytle CM, Qian JH, Terry N, 1998b. Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. **Planta**, 206: 293-299.

Zhang X, Lin AJ, Zhao FJ, Xu GZ, Duan GL, Zhu YG, 2008. Arsenic accumulation by the aquatic fern *Azolla*: Comparison of arsenate uptake, speciation and efflux by *A. caroliniana* and *A. filiculoides*. **Environmental Pollution**, 156:1149–1155.

Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP, 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New Phytologist**, 181:777–794.

Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA, 2010. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. **Annual Review of Plant Biology**, 61:535–59.

CAPÍTULO 2

Tolerância ao arsênio em *Eichhornia crassipes*: metabolismo da glutathione e estrutura anatômica

Resumo

Plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) foram submetidas a concentrações tóxicas de arsênio (As) para analisar as variações ocorridas no metabolismo da glutathione e as modificações estruturais nas folhas e nas raízes. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva, contendo ou não 7 μM de As, na forma de arsenato de sódio, durante três dias. Após esse período, foram analisadas as atividades das enzimas sulfotransferase do ATP (ATPS), redutase da glutathione (GR), peroxidase da glutathione (GSH-Px), sulfotransferase da glutathione (GST) e sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -ECS), bem como os teores de glutathione e tióis totais, protéicos e não-protéicos, além de análises estruturais em folhas e raízes. A exposição ao As aumentou a atividade da ATPS nas raízes, mas não alterou a atividade dessa enzima nas folhas. Por outro lado, o As reduziu a atividade da GSH-Px e elevou a atividade da GR, tanto nas folhas quanto nas raízes. A GST atua de forma mais efetiva nas raízes, onde houve aumento na atividade dessa enzima, indicando maior complexação de GSH ao metaloide nesses órgãos. O tratamento com As não afetou a atividade da γ -ECS nas raízes, mas estimulou a ação dessa enzima nas folhas. Além disso, houve redução significativa nos teores de glutathione total e aumento na concentração de tióis totais e de tióis não-protéicos, os quais sugerem maior síntese de fitoquelatinas. As análises anatômicas evidenciaram danos significativos somente na região apical das folhas, onde se iniciam os sintomas de toxidez ao As. Dessa forma, o aumento na atividade de enzimas envolvidas com o metabolismo da glutathione é um mecanismo importante para a tolerância e o acúmulo de As em *E. crassipes*.

Palavras-chave: aguapé, anatomia vegetal, tióis, toxicidade.

Abstract

Water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) was subjected to toxic concentrations of arsenic (As) to analyze the variations in glutathione metabolism and structural changes in leaves and roots. Plants were grown in nutrient solution containing or not 7 μM As, in the form of sodium arsenate for three days. After this period, the activities of enzymes sulfurylase ATP (ATPS), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST) and the γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) were analyzed, as well as the levels of glutathione and total thiols, protein and non protein, and structural analysis in leaves and roots. The As exposure increased the activity of ATPS in roots, but did not alter the enzyme activity in leaves. On the other hand, As reduced activity of GSH-Px and increased the activity of GR both in leaves and roots. The GST operates more effectively in the roots, where there was an increase in activity of this enzyme, indicating GSH conjugation to metalloid in these organs. The As treatment did not affect the activity of γ -ECS in the roots, but stimulated the action of this enzyme in leaves. Furthermore, there was a significant reduction in total glutathione contents and increase of total thiols and non-protein thiols contents, which suggests a higher phytochelatin synthesis. The anatomical analysis revealed significant damage only in the apical region of the leaves, where initiate the toxic symptoms to As. Thus, the increase in activity of enzymes involved in glutathione metabolism is an important mechanism for tolerance and accumulation of As in *E. crassipes*.

Keywords: water hyacinth, plant anatomy, thiols, toxicity.

1. Introdução

O arsênio (As) é um metaloide naturalmente distribuído em todos os ambientes terrestres, sendo que a sua presença em elevadas concentrações deve-se, principalmente, às ações antrópicas (Biswas *et al.*, 2008). A toxicidade do As depende, dentre outros fatores, da sua forma química e concentração (Prata *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2006), sendo encontrado em ampla diversidade de formas químicas no ambiente, resultado de biotransformações ou mudanças nas condições físico-químicas do meio (Haswell *et al.*, 1985). Ocorre em maior abundância nos estados de oxidação +3 (arsenito) e +5 (arsenato), com maior predominância, em condições aeróbicas, da forma química arsenato (Smith *et al.*, 1998). Diferentemente de determinados poluentes, o As não pode ser destruído no ambiente e, dessa forma, é muito importante a escolha de métodos de controle apropriados (Li *et al.*, 2011).

A elevada toxicidade associada ao acúmulo crescente do As em diversos ambientes tem despertado o interesse de pesquisadores no desenvolvimento de métodos para a remediação de solos e águas contaminadas com esse elemento (Haque *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2008), com destaque para a fitorremediação.

A utilização 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 metaloide. Além disso, tal entendimento leva à identificação de alvos para a manipulação genética e química, que pode aumentar a capacidade de remoção de metais pesados dos organismos (Mendoza-Cózatl e Moreno-Sánchez, 2006).

Em geral, as plantas são seriamente afetadas pelo As (Isayenkov e Maathuis, 2008). Entretanto, algumas espécies toleram certas quantidades desse metaloide, pelo fato de possuírem mecanismos de tolerância que lhes permitem desempenhar, dentro de certa normalidade, suas funções metabólicas. A exposição das plantas a altas concentrações de metais pesados resulta na elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, para prevenir os danos biológicos associados a essas substâncias, ocorre a ativação de mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo. Especificamente em relação à toxidez do As, outra estratégia de desintoxicação envolve a redução de arsenato a arsenito e aumento da síntese de substâncias quelantes, como glutatonas e fitoquelatinas, e posterior compartimentação destes

compostos ligados ao arsenito no vacúolo (Schmöger *et al.*, 2000; Meharg e Hartley-Whitaker, 2002; Bleeker *et al.*, 2006; Picault *et al.*, 2006).

A glutatona é um tripeptídeo (Glu-Cys-Gly), sintetizada pela ação das enzimas sintetase da γ -glutamilcisteína e sintetase da glutatona, com gasto de ATP (Noctor e Foyer, 1998), constituindo a principal forma de transporte e armazenamento de enxofre reduzido (Yadav, 2010). Está envolvida em vários processos metabólicos vegetais, desempenhando importante papel na proteção de membranas contra radicais livres e, também, confere proteção às plantas a diversos poluentes, incluindo As (Shri *et al.*, 2009), devido à sua conjugação a estes compostos tóxicos, através da enzima sulfotransferase da glutatona (Moons, 2003), além de ser um precursor das fitoquelatinas (May *et al.*, 1998).

Além dos estudos bioquímicos e fisiológicos, é importante o estudo das modificações estruturais nas diferentes partes das plantas para o melhor entendimento dos mecanismos que conferem tolerância ao As. Assim, a anatomia vegetal pode ser uma ferramenta a mais na avaliação de possíveis danos causados pelo As nas plantas, conforme tem sido utilizada por diversos pesquisadores (Simon *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Kachenco *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011).

Uma planta aquática bastante eficiente na remoção de vários metais pesados é a *Eichhornia crassipes*, vulgarmente conhecida como aguapé, sendo que alguns trabalhos já demonstraram o potencial dessa espécie na remoção de As de ambientes aquáticos (Misbahudin & Fariduddin, 2002; Al Rmalli *et al.*, 2005; Snyder, 2006; Alvarado *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2008b).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar as variações ocorridas no metabolismo da glutatona, bem como as modificações estruturais em plantas de *E. crassipes* expostas ao arsenato, possibilitando a compreensão dos mecanismos que conferem maior tolerância ao As.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção das plantas e aplicação dos tratamentos com As

As plantas aquáticas da espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms foram coletadas na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa (MG – Brasil) e mantidas por 24 horas em água desionizada. Em seguida, as plantas foram transferidas para recipientes de polietileno, com 10 L de solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), pH 6,5, e colocadas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $230 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), sob fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por três dias.

Após o período de aclimação, as plantas foram selecionadas de acordo com a massa fresca, uniformidade de tamanho e número de folhas, mantendo-se duas plantas em vasos contendo 0,5 L da solução nutritiva de Clark, pH 6,5, contendo ou não $7 \mu\text{M}$ de As, na forma de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Após três dias de tratamento, as plantas foram lavadas em água corrente e desionizada, e amostras de folhas e raízes foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80°C para posteriores análises.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos (controle e As $7 \mu\text{M}$) e dez repetições, sendo que cada unidade experimental consistiu de duas plantas por vaso.

2.2. Extração e determinação da atividade das sulfurilases do ATP (ATPS, EC 2.7.7.4)

Amostras de 0,2 g de massa fresca de raízes e folhas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo MgCl_2 2 mM, KCl 0,1 M e DTE (ditioeritritol) 10 mM, acrescidos de 0,1 mg de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a $10.000 \times g$ durante 15 min a 4°C , sendo o sobrenadante utilizado para avaliação da atividade enzimática.

A atividade enzimática foi determinada segundo metodologia descrita por Adams e Johnson (1968). A 0,8 mL do meio de reação contendo 10 μmoles de Tris-

HCl, pH 8,0, 2,5 μ moles de pCMB (p-cloromercuribenzoato) e duas unidades de pirofosfatase foi adicionado 0,2 mL do extrato enzimático, seguido de incubação a 37 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados ao meio de reação 0,5 mL de solução contendo 20 μ moles de Na_2MoO_4 (ou 40 μ moles de NaCl, no caso do branco) e 10 μ moles de ATP, sendo feita nova incubação a 37 °C. Após 20 min, a reação foi paralisada com a adição de 1,0 mL de TCA (ácido tricloroacético) 10% (p/v) gelado. Após centrifugação a 5.000 xg durante 10 min a 4 °C, o teor de fosfato inorgânico no sobrenadante foi determinado pelo método do fosfo-molibdato (Lindeman, 1958). A atividade da sulfúrilase do ATP foi expressa em $\text{nmol de Pi mg}^{-1}$ proteína.

2.3. Extração e determinação da atividade das redutases da glutathiona (GR, EC 1.8.1.7)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de raízes e folhas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 1 mM, triton 0,02%, DTT (ditiotreitól) 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP (polivinil pirrolidona) 1%, conforme metodologia recomendada por Carlberg & Mannervik (1985). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, 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 M pH 7,5, GSSG 20 mM, NADPH 2 mM (Carlberg & Mannervik, 1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30° C, foi medido no primeiro minuto de reação, sendo a atividade da GR determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,4 a 0,8 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em $\text{nmol de glutathiona oxidada min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.4. Extração e determinação da atividade das peroxidases da glutathiona (GSH-PXs, EC 1.11.1.9)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de raízes e folhas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,5, EDTA 1 mM e MgCl₂ 10 mM (Nagalakshimi e Prasad, 2001), seguido de filtração através de quatro camadas de gaze e da centrifugação a 12.000 *xg* por 15 min, a 4°C.

A atividade das GSH-Px foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto de raiz e de folha, a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,114 M, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutathiona (Nagalakshimi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30 °C, foi medido no primeiro minuto de reação sendo, a atividade das GSH-Px determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,2 a 0,6 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ (Anderson e Davis, 2004) e o resultado expresso em nmol de NADPH min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.5. Extração e determinação da atividade das sulfotransferases da glutathiona (GST, EC 2.5.1.18)

A atividade das GSTs foi determinada de acordo com Habig *et al.* (1974). Amostras de 0,3 g de massa fresca de raízes e folhas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,2 M (pH 7,8), EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM e PVPP 5% (p/v). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 12.000 *xg* por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade enzimática foi determinada após adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, GSH 20 mM e CDNB (1-cloro 2,4-dinitrobenzeno) 0,1 mM. O aumento na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30 °C, foi medido no primeiro minuto de reação, sendo a atividade da GST determinada com base na inclinação da

reta no intervalo de 0,2 a 0,4 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.6. Extração e determinação da atividade das sintetases da γ -glutamilcisteína (γ -ECS, EC 6.3.2.2)

A atividade da enzima γ -ECS foi determinada segundo metodologia descrita por Nagalakshmi e Prasad (2001), com algumas modificações.

Amostras de 0,3 g de massa fresca de raízes e folhas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2,0 mL de um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 5 mM e PVPP 1%. O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a $30.000 \times g$ por 10 min, a 4°C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade enzimática foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação contendo 10 μmoles de glutamato de sódio, 10 μmoles de L-aminobutirato, 2 μmoles de Na_2EDTA , 0,2 mg de BSA, 20 μmoles de MgCl_2 , 5 μmoles do sal dissódico de ATP, KCl 150 mM e 100 μmoles de tampão Tris-HCl (pH 8,2). A mistura foi incubada em banho-maria, a 37°C , durante 30 min e, então, a reação foi paralisada pela adição de 100 μL de TCA 50% (p/v). A mistura foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 min e o teor de fosfato inorgânico no sobrenadante foi determinado pelo método do fosfo-molibdato (Lindeman, 1958). A atividade da γ -ECS foi expressa em $\text{nmol de Pi mg}^{-1}$ proteína.

2.7. Determinação de proteínas

Para expressar a atividade das enzimas analisadas, foram determinados os teores de proteínas dos extratos enzimáticos pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando BSA como padrão.

2.8. Determinação dos teores de glutathiona total (GSH+GSSG)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de raízes e folhas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido, seguido da adição de 2,0 mL de meio de homogeneização constituído de HCl 0,1M contendo EDTA 1 mM (Anderson, 1985). Depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 \times g por 15 min a 4 °C.

A alíquotas de 200 μ L do extrato enzimático bruto, foram adicionados 200 μ L de tampão de fosfato de sódio 125 mM, contendo EDTA 6,3 mM, pH 7,5, 500 μ L de NADPH 0,3 mM e 100 μ L de DTNB [ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)] 6 mM. Após incubação a 30°C, por 5 min, adicionaram-se 10 μ L de redutase da glutathiona (50 U mL⁻¹) e determinou-se a absorvância a 412 nm durante 1 minuto. A inclinação da reta foi tomada no intervalo de 0,2 a 0,4 minuto após o início da reação e a concentração de glutathiona determinada por meio de curva de calibração, utilizando-se padrões autênticos de glutathiona reduzida. Os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ massa fresca.

2.9. Determinação dos teores de compostos tiólicos

2.9.1. Extração de tióis

Amostras de 0,5 g de massa fresca de raízes e folhas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e, seguido da adição de 6 mL de meio de extração constituído de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 1 mM e ácido ascórbico 1 % (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 \times g 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.

2.9.2. Determinação do teor de tióis totais

Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante, obtido conforme item 2.8.1, foram adicionadas a 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,2, 0,1 mL do reagente de Ellman [ácido 5,5' - ditiobis (2-nitrobenzoico)] 0,01 M e 7,9 mL de metanol. Após 15 min de reação, a 37 °C, foi determinada a absorvância a 412 nm e,

utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $13100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, foi calculado o teor de tióis totais, expressando-se os resultados em nmol de SH g^{-1} massa fresca (Sedlak e Lindsay, 1968).

2.9.3. Determinação do teor de tióis não-protéicos

Alíquotas de 5,0 mL do sobrenadante, obtido conforme item 2.8.1, foram adicionadas a 1,0 mL de TCA 50 % (p/v), e 4,0 mL de H_2O . Após 1 hora de repouso em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 15 min. Às alíquotas de 2,0 mL do sobrenadante foram adicionados 4,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,4 M, pH 8,9 e 0,1 mL de reagente de Ellman 0,01 M. Após 5 min, em temperatura ambiente, as absorvâncias foram lidas a 412 nm e, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $13100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, foi calculado o teor de tióis não protéicos, expressando-se os resultados em nmol de SH g^{-1} massa fresca (Sedlak e Lindsay, 1968).

2.9.4. 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 $\text{nmoles de SH g}^{-1}$ massa fresca.

2.10. Análise anatômica

Amostras de raízes e da lâmina (região apical e mediana) de folhas totalmente expandidas, retiradas de plantas submetidas a tratamentos com 0 e $7 \mu\text{M}$ de As (quatro repetições), foram fixadas em FAA_{50} por 48 horas e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Após desidratação em série etílica, os fragmentos foram incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha), e seccionados transversalmente em micrótomo rotativo de avanço automático. Os cortes ($5 \mu\text{m}$ de espessura) foram corados com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien e McCully, 1981) e as lâminas foram montadas com resina sintética (Permout). As imagens digitalizadas foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-Photo, acoplado à câmera fotográfica digital

(modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

Para a diafanização, raízes foram submersas em solução de hidróxido de sódio a 10% durante 2h e, em seguida, lavadas em água destilada. Posteriormente, o material foi submetido a uma solução de hipoclorito de sódio a 20% até clarear, sendo lavado novamente em água destilada. Após desidratação em série etílica, o material foi corado com safrablau e submetido à uma série xilólica para montagem em bálsamo-do-canadá.

2.11. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV), versão 9.1, e os gráficos foram confeccionados através do software SigmaPlot, versão 10.

3. Resultados e Discussão

A atividade da sulfúrilase do ATP (ATPS) aumentou significativamente (18%) nas raízes de plantas de *Eichhornia crassipes* mantidas em solução contendo 7 μM de As. Entretanto, para as folhas, não houve diferença significativa entre as plantas tratadas com As e as plantas-controle. Verifica-se, ainda, que a atividade dessa enzima foi, em média, três vezes maior nas raízes (Figura 1).

A exposição a concentrações elevadas de metais, geralmente, estimula a atividade de enzimas envolvidas com o metabolismo de enxofre para a desintoxicação desses metais, por meio da constante demanda de cisteína e glutatona, sendo que o grau de expressão da ATPS é dependente do nível de exposição ao metal, da espécie vegetal e do seu grau de tolerância (Ernst *et al.*, 2008).

A ATPS é uma enzima limitante que catalisa a primeira etapa de assimilação do enxofre, a qual ativa o sulfato inorgânico (SO_4^{2-}) através da adenilação, usando ATP, e formando adenosina-5'-fosfossulfato (APS) e pirofosfato inorgânico (Hatzfeld *et al.*, 2000; Parthiyal *et al.*, 2006). Segundo Khan *et al.* (2009), a ATPS é

uma enzima que está envolvida com a regulação fina da biossíntese de glutatona e de algumas enzimas do ciclo ascobarto-glutaciona.

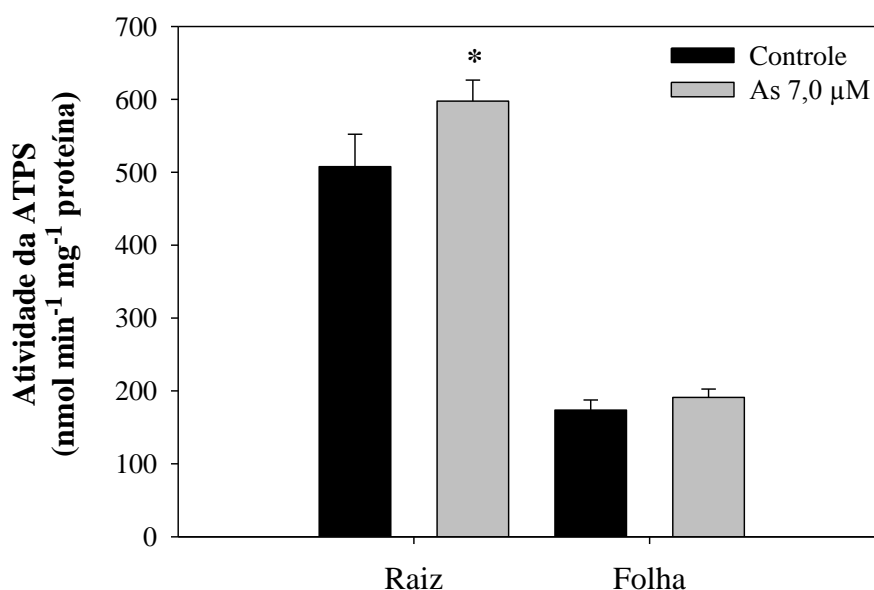


Figura 1. Atividade das sulfurilases do ATP (ATPS) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas ou não a 7 μM de As. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos, para cada parte da planta. As barras representam o desvio padrão da média.

O aumento na atividade da ATPS já foi observado em plantas de *E. crassipes* expostas ao cádmio (Oliveira *et al.*, 2009) e em *Brassica juncea* exposta ao As (Wangeline *et al.*, 2004), sendo que nessa espécie o maior nível de expressão da ATPS foi relacionado com o aumento da tolerância e do acúmulo de As. Esse aumento na atividade da ATPS parece ser uma etapa essencial para suprir a demanda de enxofre reduzido (Oliveira *et al.*, 2009). Em função disso, o aumento na atividade dessa enzima nas raízes das plantas tratadas com As pode representar um mecanismo importante para a tolerância a esse elemento em *E. crassipes*.

A exposição das plantas ao As resultou em reduções significativas na atividade da peroxidase da glutatona (GSH-Px) sendo de 43% nas raízes e de 22% nas folhas (Figura 2).

Além de sua função na desintoxicação de elementos tóxicos, a glutatona apresenta função protetora na redução de hidroxiperóxidos citotóxicos resultantes do estresse oxidativo, sendo essa redução catalisada pelas GSH-Pxs (Dixon *et al.*, 1998).

No entanto, verifica-se que a exposição ao As reduziu a atividade dessa enzima em *E. crassipes*, provavelmente, porque outras peroxidases estão atuando efetivamente contra o estresse oxidativo, permitindo que a glutathiona seja utilizada diretamente nos mecanismos de desintoxicação ao As, que envolvem, principalmente, a conjugação da glutathiona ao As, ou a sua utilização para biossíntese de fitoquelatinas.

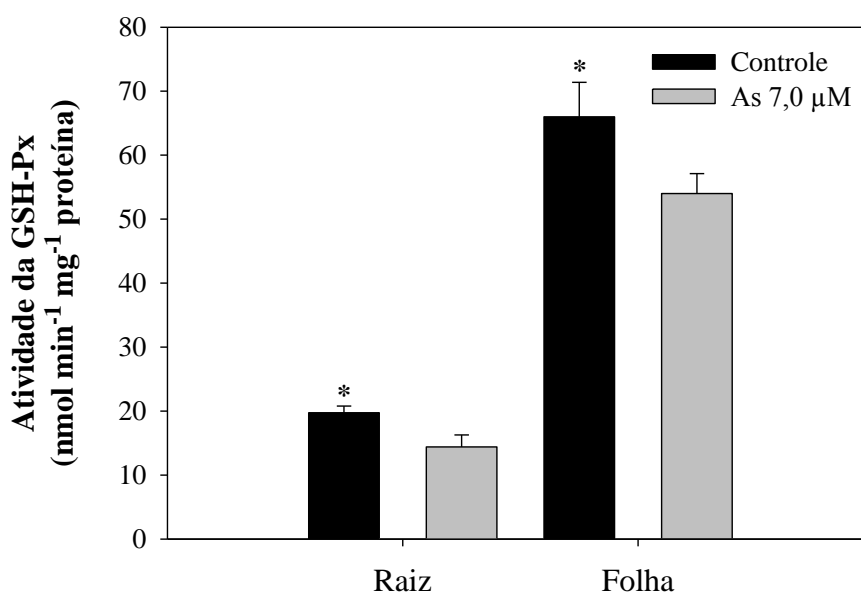


Figura 2. Atividade das peroxidases da glutathiona (GSH-Px) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas ou não a 7 μ M de As. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos, para cada parte da planta. As barras representam o desvio padrão da média.

A presença de As na solução nutritiva aumentou significativamente a atividade da redutase da glutathiona (GR) em plantas de *E. crassipes*, com acréscimos de 17% nas folhas e de 45% nas raízes, sendo que a atividade dessa enzima nas raízes foi, em média, duas vezes superior à da folha (Figura 3).

Uma vez absorvido, o arsenato é reduzido a arsenito, sendo essa reação catalisada pela redutase do arsenato (Mukhopadhyay e Rosen, 2002), a qual requer glutathiona na forma reduzida (GSH), com a GR assumindo grande importância (Duan *et al.*, 2005), uma vez que catalisa a redução, dependente de NADPH, da glutathiona oxidada (GSSG) em GSH. O aumento na atividade dessa enzima resulta, portanto, em aumento da disponibilidade de GSH, conferindo maior tolerância às plantas (Srivastava *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2008). Assim, os aumentos nas

atividades da GR em folhas e raízes de *E. crassipes* indicam que essa enzima contribui para a tolerância e o acúmulo de As, em função da maior disponibilidade de GSH, importante não somente para a redução do arsenato, mas, também, para os diversos mecanismos de desintoxicação ao As que envolvem esse peptídeo.

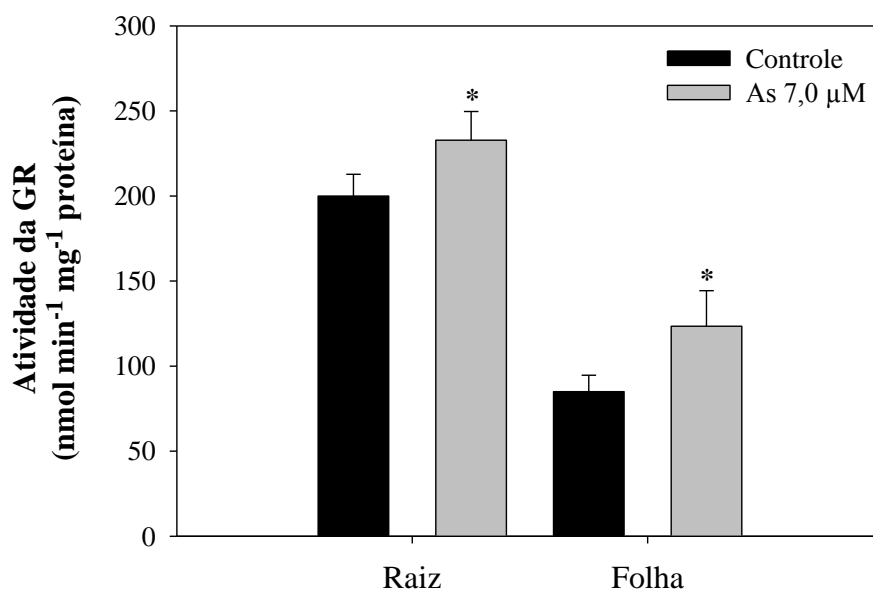


Figura 3. Atividade das redutases da glutaciona (GR) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas ou não a 7 μM de As. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos, para cada parte da planta. As barras representam o desvio padrão da média.

Incrementos na atividade da GR, após exposição ao As, também, foram observados em *Hydrilla verticillata* (Srivastava *et al.*, 2007), *Phaseolus aureus* (Singh *et al.*, 2007) e *Ceratophyllum demersum* (Mishra *et al.*, 2008a). Em algumas espécies, entretanto, a GR parece não possuir papel determinante na tolerância ao As, conforme observado em *Pteris vittata* (Srivastava *et al.*, 2005; Kertulis-Tartar *et al.*, 2009), *Brassica juncea* (Srivastava *et al.*, 2009) e *Sesuvium portulacastrum* (Lokhande *et al.*, 2011), em que a presença de As não alterou a atividade dessa enzima.

Nas raízes das plantas tratadas com As, houve elevação de 51% na atividade da sulfotransferase da glutaciona (GST), enquanto, nas folhas, ocorreu redução significativa de 24% na atividade dessa enzima (Figura 4).

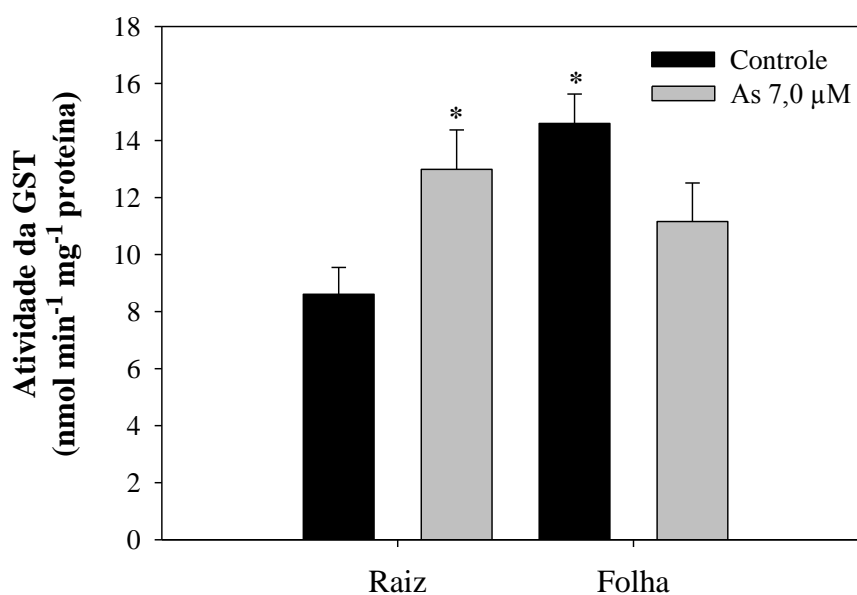


Figura 4. Atividade das sulfotransferases da glutatona (GST) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas ou não a 7 μM de As. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos, para cada parte da planta. As barras representam o desvio padrão da média.

As GSTs catalisam a conjugação de substratos xenobióticos eletrofílicos e, frequentemente hidrofóbicos, com GSH para formar derivados de peptídeos não-tóxicos (Dixon *et al.*, 1998; 2010). Assim, o aumento na atividade da GST, observado neste estudo, indica que essa enzima constitui um importante mecanismo para desintoxicação e acúmulo desse elemento, em função da provável conjugação de GSH ao As, que ocorre, principalmente, nas raízes de *E. crassipes*, após exposição a esse metaloide.

A atividade das enzimas pode variar consideravelmente dependendo das espécies vegetais, de modo que resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram observados em *Ceratophyllum demersum* (Mishra *et al.*, 2008a), enquanto que em *Brassica juncea* (Srivastava *et al.*, 2009) não houve alteração na atividade da GST. Em alguns casos, como observado em *Prosopis* sp. (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009), a atividade da GST apresentou resultados contrários aos observados no presente estudo, em que as maiores atividades dessa enzima ocorreram nas folhas.

A atividade da sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -ECS) em raízes de plantas expostas ao As não diferiu das plantas-controle, sendo essa atividade cerca de cinco

vezes maior que nas folhas, onde houve um aumento significativo de 16% na atividade dessa enzima (Figura 5).

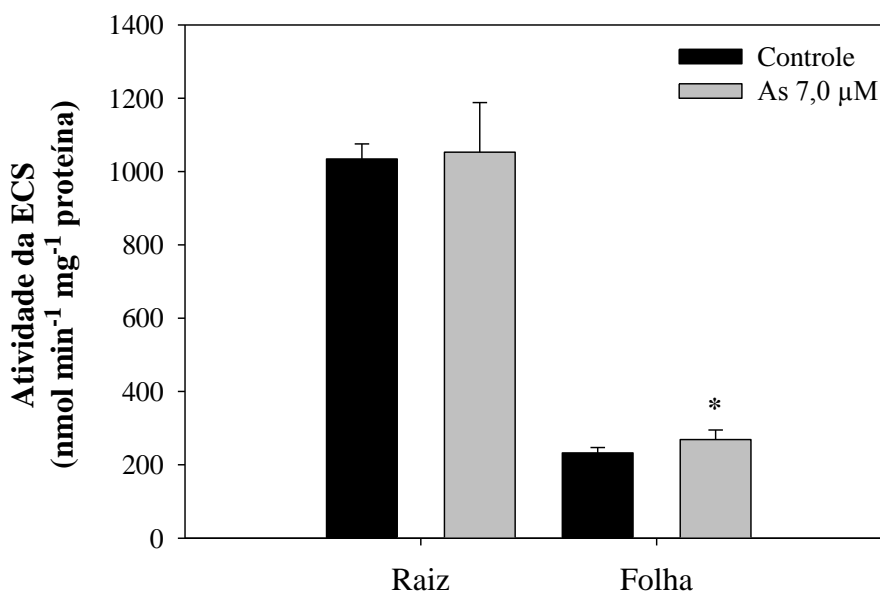


Figura 5. Atividade das sintetases da γ -glutamilcisteína (γ -ECS) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas ou não a 7 μM de As. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos, para cada parte da planta. As barras representam o desvio padrão da média.

A manutenção do *pool* de GSH não se dá somente através da GR, mas também através do envolvimento da γ -ECS (Aravind e Prasad, 2005), que é uma enzima limitante da biossíntese de GSH (May *et al.*, 1998). Uma maneira efetiva de aumentar a concentração de GSH é aumentar a atividade da γ -ECS (Mendoza-Cózatl e Moreno-Sánchez, 2006), sendo que estudos já revelaram que a maior expressão da γ -ECS pode induzir a maior produção de compostos tiólicos, como γ -EC, GSH e fitoquelatinas (Zhu *et al.*, 1999).

Em *E. crassipes*, após exposição ao As, a γ -ECS teve sua atividade aumentada nas folhas, o que pode representar maior disponibilidade de GSH nesse órgão, onde a atividade dessa enzima é inferior à atividade apresentada nas raízes. Aumentos na atividade da γ -ECS, também, foram observados em *Ceratophyllum demersum* (Mishra *et al.*, 2008a). Contudo, em *Sesuvium portulacastrum*, essa enzima parece não assumir papel fundamental no processo de desintoxicação ao As (Lokhande *et al.*, 2011).

Os aumentos nas atividades da GR observados nas raízes e folhas, e da γ -ECS nas folhas, sugerem que os mecanismos de produção de GSH nas raízes envolvem a manutenção do estado redox de GSH. Enquanto nas folhas, onde as atividades dessas enzimas são inferiores em comparação às das raízes, envolvem tanto a manutenção do estado redox, como a ativação da biossíntese de GSH.

As plantas mantidas em solução contendo As apresentaram uma redução significativa nos teores de glutathiona total, sendo essa redução de 40% nas raízes e de 41% nas folhas (Figura 6).

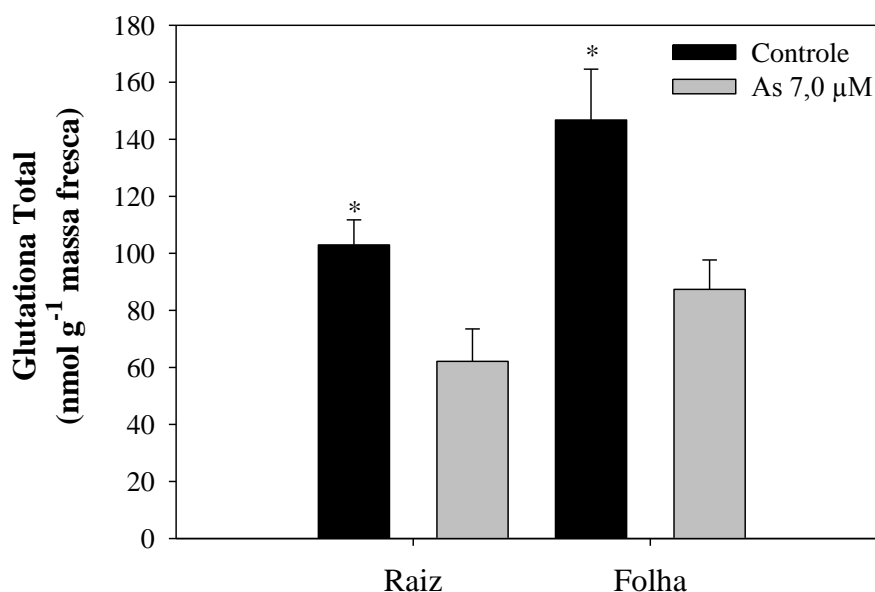


Figura 6. Teores de glutathiona total (GSH+GSSG) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas ou não a 7 µM de As. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos, para cada parte da planta. As barras representam o desvio padrão da média.

O As pode causar a diminuição dos níveis de GSH, através da redução de arsenato a arsenito (Mukhopadhyay e Rosen, 2002), além da formação de complexos arsenito-glutathiona e da síntese de fitoquelatinas (Verbruggen *et al.*, 2009). As fitoquelatinas são peptídeos não-protêicos com estrutura geral $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-gly}$, que podem ser rapidamente sintetizadas em resposta a níveis tóxicos de As (Schmöger *et al.*, 2000) e, entre outros fatores, a síntese desses peptídeos é regulada pelo nível intracelular de GSH.

Sob condições normais, as plantas não sintetizam fitoquelatinas em níveis significativos, entretanto, a síntese desses compostos pode ser estimulada sob exposição ao metaloide, causando declínio nos níveis de cisteína e GSH (Mascher *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2009). Assim, a redução nos teores de GSH em *E. crassipes* expostas ao As pode indicar maior síntese de fitoquelatinas, corroborando os resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2009), os quais também verificaram diminuição nos teores de GSH em *E. crassipes*, na presença de cádmio. Resultados semelhantes foram obtidos em *Trifolium pratense* (Masher *et al.*, 2002), mas em *Cicer arietinum* (Gupta *et al.*, 2008) e *Pteris vittata* (Cao *et al.*, 2004), contrariamente, houve maior aumento na produção de GSH após exposição ao As.

Nas raízes das plantas expostas ao As, houve aumento nos teores de tióis totais de 24% e de tióis não-protéicos de 48%. Nas folhas, o aumento de tióis totais foi de 42% e de tióis não-protéicos de 58%. Tanto nas raízes como nas folhas, não houve alteração significativa nos teores de tióis protéicos. Verifica-se, ainda, que os teores de tióis são naturalmente maiores nas folhas (Figura 7).

Existem registros da importância dos tióis no processo de desintoxicação ao As, como em *Pteris vittata* (Cai *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004), *Cicer arietinum* (Gupta *et al.*, 2008) e *Prosopis* sp. (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009). Todavia, em algumas espécies, esse mecanismo de indução na produção de tióis parece não exercer grande importância no processo de tolerância, conforme observado em *Sesuvium portulacastrum*, em que não houve alteração nos teores de tióis não-protéicos (Lokhande *et al.*, 2011).

Em muitas espécies vegetais, as fitoquelatinas são consideradas os principais ligantes ao As, conferindo maior tolerância a esse metaloide (Sneller *et al.*, 1999; Schmöger *et al.*, 2000; Hartley-Whitaker *et al.*, 2001, 2002; Schat *et al.*, 2002; Raab *et al.*, 2004). Os teores de fitoquelatinas não foram determinados neste estudo, porém a redução nos teores de glutathiona total e o aumento nos teores de tióis não-protéicos sugerem que os mecanismos de tolerância ao As, em *E. crassipes*, devem envolver a síntese de fitoquelatinas.

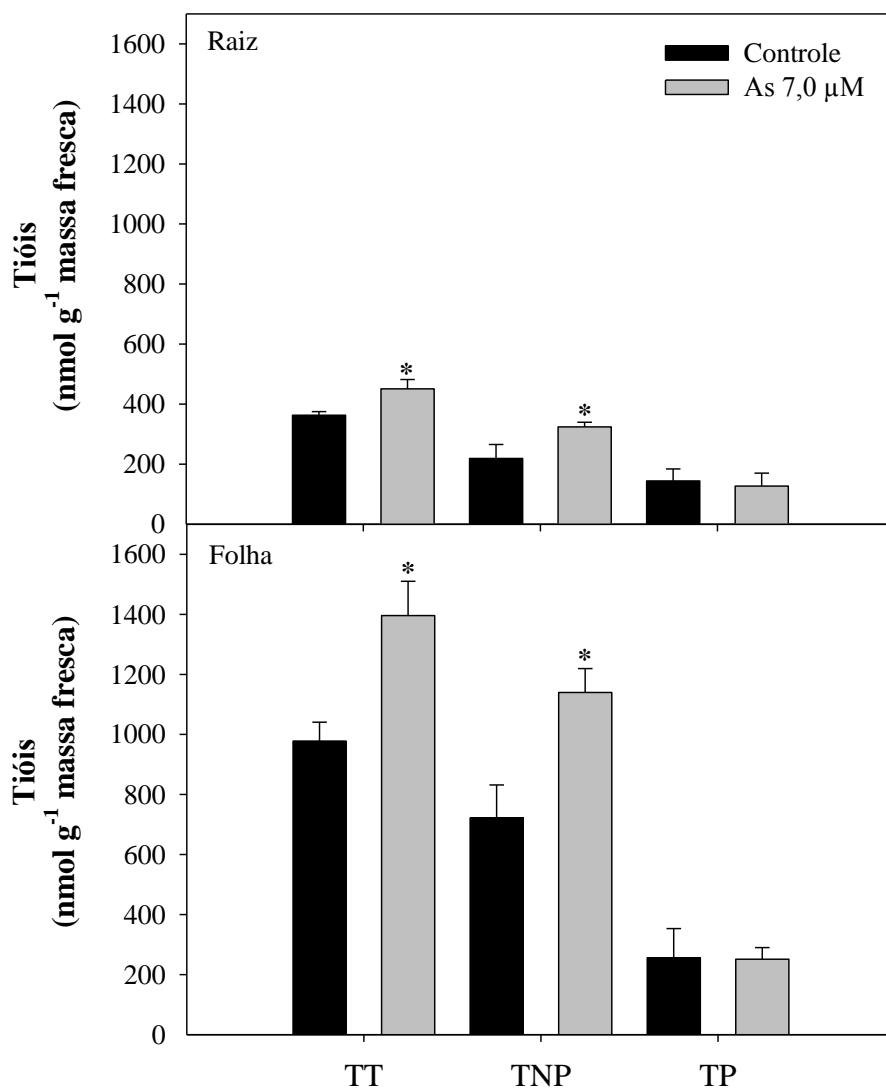


Figura 7. Teores de tióis solúveis totais (TT), tióis não-protéicos (TNP) e tióis protéicos (TP) em raízes e folhas de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas ou não a 7 μM de As. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos, para cada parte da planta. As barras representam o desvio padrão da média.

Quanto às análises anatômicas, verifica-se que as folhas de *E. crassipes* são anfiestomáticas, apresentam epiderme unisseriada, mesofilo dorsiventral constituído de três a quatro camadas de parênquima paliçádico voltado para a face adaxial, e parênquima lacunoso ou parênquima aerífero voltado para a face abaxial, na região apical e mediana, respectivamente; além de feixes vasculares colaterais envoltos por uma bainha parenquimática. Ráfides, também, podem ser observadas ao longo do mesofilo. Os idioblastos ocorrem tanto na face adaxial como abaxial e apresentam

conteúdo corado de verde pelo azul de toluidina, indicando a presença de compostos fenólicos (Figura 8A, B).

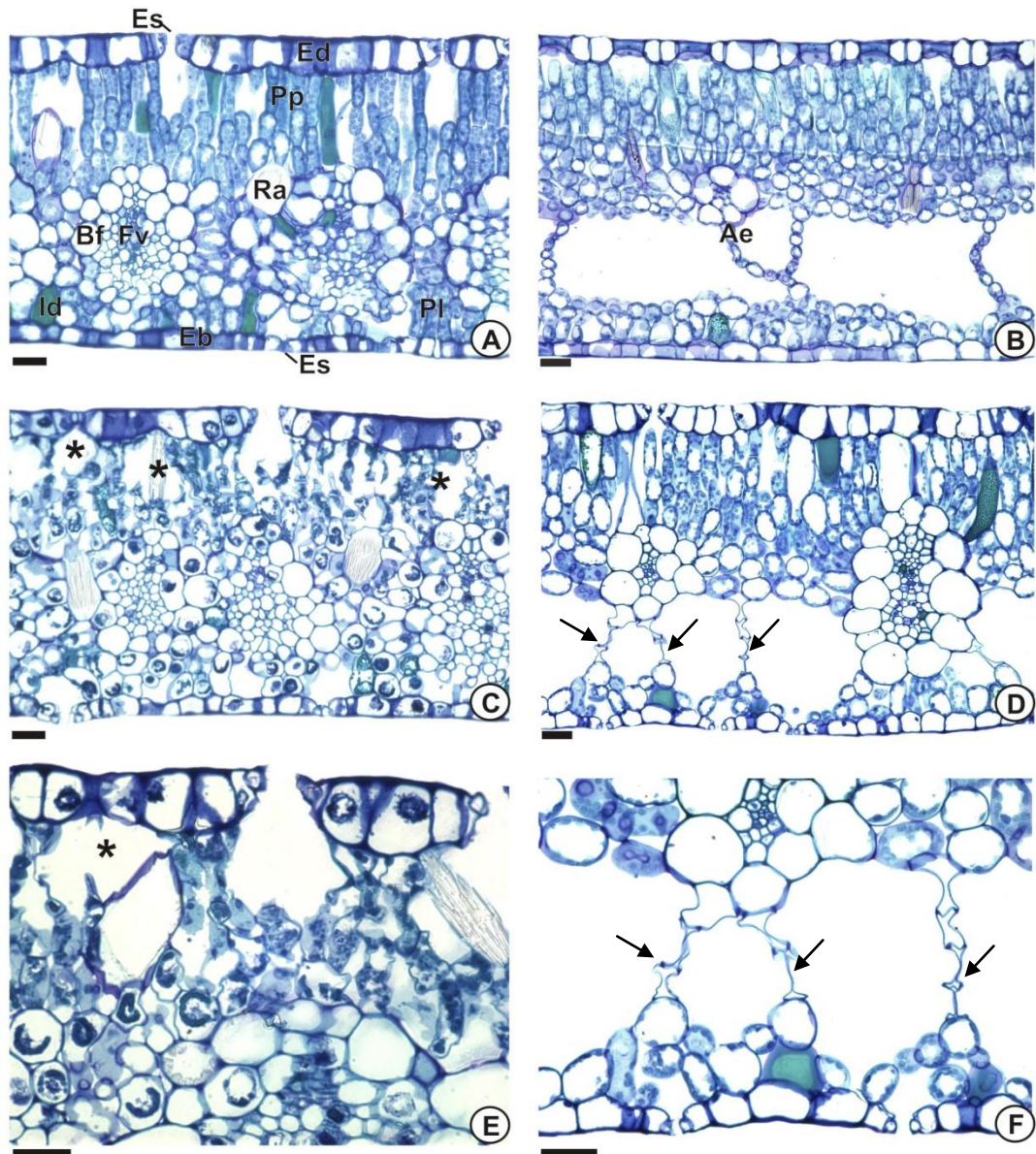


Figura 8. Fotomicrografias de seções transversais do limbo foliar de *Eichhornia crassipes* exposta ou não a 7 μM de As. **A, B,** Controle. **C-F,** 7 μM de As. **A, C, E,** região apical. **B, D, F,** região mediana. Setas indicam células do aerênquima colapsadas. Em C e E, notar região de células colapsadas no parênquima paliçádico (*). Bf, bainha do feixe vascular; Ra, cristais ráfides; Eb, epiderme abaxial; Ed, epiderme adaxial; Es, estômato; Fv, feixe vascular; Id, idioblasto; Pl, parênquima lacunoso; Pp, parênquima paliçádico. Barras: 100 μm .

Os resultados mostram que o As induziu danos na região apical das folhas, os quais incluem plasmólise nas células epidérmicas e nas células dos parênquimas clorofilianos lacunoso e paliçádico, sendo que neste último, em função da menor resistência da parede celular, houve colapso das células (Figura 8C, E). Por outro lado, na região mediana, esses danos não foram observados (Figura 8D), verificou-se apenas colapso das células que delimitam as lacunas do aerênquima (Figura 8F).

Danos nas células epidérmicas e nas células do parênquima paliçádico e lacunoso já foram observados em *Brassica juncea* em resposta a tratamentos com metais pesados (Sridhar *et al.*, 2005). Esses danos não foram observados em folhas jovens de *Pteris vittata* (Li *et al.*, 2006), provavelmente, por se tratar de espécie hiperacumuladora e com eficientes mecanismos de tolerância ao As.

A raiz de *E. crassipes* apresenta epiderme unisseriada, córtex parenquimático constituído de aerênquima, delimitado internamente pela endoderme e externamente pela exoderme, seguido ao centro pelo cilindro vascular, o qual apresenta cinco pólos de protoxilema, ao redor de uma região parenquimatosa. Células com conteúdo fenólico podem ser observadas ao longo do córtex (Figura 9A, B).

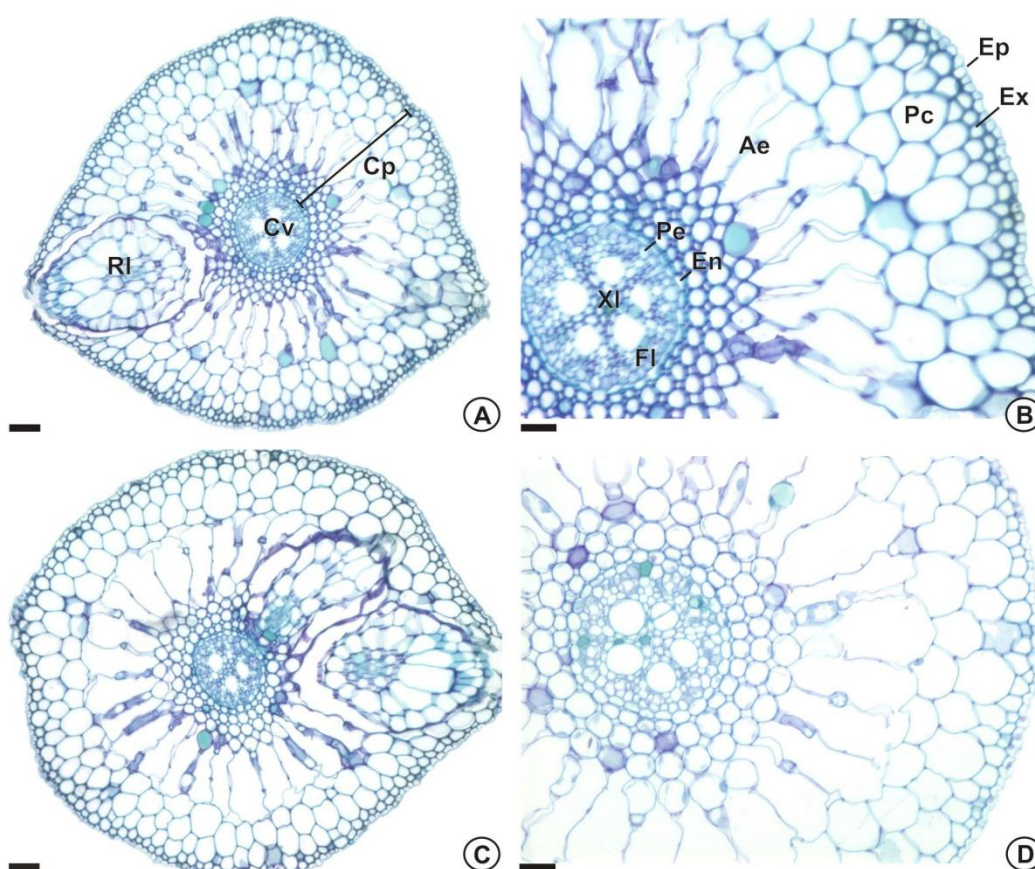


Figura 9. Fotomicrografias de seções transversais da raiz de *Eichhornia crassipes* exposta ou não a 7 μM de As. **A, B,** Controle. **C, D,** 7 μM de As. Ae, aerênquima;

Cp, córtex parenquimático; Cv, cilindro vascular; En, endoderme; Ep, epiderme; Ex, exoderme; F, floema; Pc, parênquima cortical; Pe, periciclo; Rl, raiz lateral; X, xilema. Barras: A, C – 200 μm ; B, D – 100 μm .

Não foram detectados danos estruturais nas raízes de *E. crassipes* após exposição ao As (Figura 9C, D). Além disso, foi possível observar uma disposição diferencial das raízes laterais, as quais passaram a ocupar a região próxima ao ápice radicular das plantas expostas ao As (Figura 10A, B).

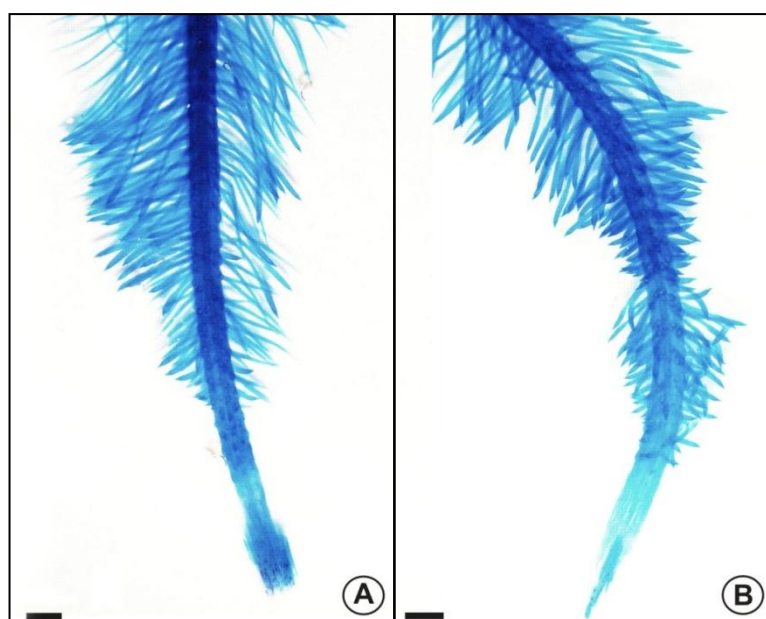


Figura 10. Raízes de plantas de *Eichhornia crassipes* expostas ou não a 7 μM de As. **A**, Controle. **B**, 7 μM de As. Barras: 1,0 cm.

A ausência de danos já foi observada em *E. crassipes* submetida a tratamento com cádmio (Toppi *et al.*, 2007). Por outro lado, as raízes de plantas de *Phaseolus aureus* expostas ao As apresentaram redução ou completa ausência de pelos radiculares, além de danos nas células epidérmicas e no córtex, onde as células perderam o formato e apresentaram sinais de murcha e desintegração (Singh *et al.*, 2007). Já Wu *et al.* (2011) constataram que o aumento das lacunas aeríferas em *Oryza sativa* contribuiu para a menor absorção de As.

Conforme verificado no capítulo 1, após três dias de exposição a 7 μM de As, as plantas já haviam removido quase 90% desse elemento e com elevada translocação para a parte aérea, indicando que os danos estruturais ocorridos nas

folhas são decorrentes de efeitos diretos do As nesse órgão. Contudo, as injúrias ocorreram somente na região apical das folhas, onde se iniciam os sintomas visuais de toxidez ao As, sendo que nas raízes nenhum dano estrutural foi observado, além de raízes laterais adicionais terem se desenvolvido próximo à região apical. Isso evidencia a tolerância dessa espécie à concentração de As estudada, a qual estimulou os mecanismos de defesa da planta durante o período de tratamento.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o aumento na atividade das enzimas envolvidas com o metabolismo da GSH faz parte do mecanismo para a desintoxicação ao As em *E. crassipes*. Neste sentido, esses dados podem contribuir significativamente para a utilização dessa espécie em estudos de campo que visem à aplicação da fitorremediação em ambientes aquáticos contaminados com As.

4. Referências bibliográficas

Adams CA, Johnson RE, 1968. ATP sulfurylase activity in the soybean (*Glycine max* (L.) Merr. **Plant Physiology**, 43:2041-2044.

Ahmad P, Sarwat M, Sharma S, 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, 51:167-173.

Al Rmalli SW, Harrington CF, Ayub M, Haris PI, 2005. A biomaterial based approach for arsenic removal from water. **Journal of Environmental Monitoring**, 7:279–282.

Alvarado S, Guédez M, Lué-Merú MP, Nelson G, Álvaro A, Jesús AC, Gyula Z, 2008. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). **Bioresource Technology**, 99:8436–8440.

Anderson ME, 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, 113:548-555.

Anderson JV, Davis DG, 2004. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum**, 120:421-433.

Aravind P, Prasad MNM, 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43:107–116.

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

Biswas BK, Inoue J, Inoue K, Ghimire KN, Harada H, Ohto K, Kawakita H, 2008. Adsorptive removal of As (V) and As (III) from water by a Zr (IV) – loaded orange waste gel. **Journal of Hazardous Materials**, 154:1066-1074.

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 I, Mannervik B, 1985. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, 113:484-495.

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

Deng D, Wu SC, Wu, FY, Deng H, Wong MH, 2010. Effects of root anatomy and Fe plaque on arsenic uptake by rice seedlings grown in solution culture. **Environmental Pollution**, 158:2589-2595.

Dixon DP, Cummins I, Cole DJ, Edwards R, 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 1:258-266.

Dixon DP, Skipsey M, Edwards R, 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, 71:338–350.

Duan GL, Zhu YG, Tong YP, Cai C, Kneer R, 2005. Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator. **Plant Physiology**, 138, 461–469.

Ernst WHO, Krauss GJ, Verkleij JAC, Wesenberg D, 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. **Plant, Cell and Environment**, 31:123–143.

Gupta DK, Tripathi RD, Mishra S, Srivastava S, Dwived S, Rai UN, Yang XE, Huan H, Inouhe M, 2008. Arsenic accumulation in root and shoot vis-a-vis its effects on growth and level of phytochelatins in seedlings of *Cicer arietinum* L. **Journal of Environmental Biology**, 29:281-286.

Habig WH, Pabst MJ, Jaboby WB, (1974) Glutathione s-transferase. The first step in mercapturic and formation. **Journal of Biological Chemistry**, 249: 7130-7139.

Han FX, Sridhar BBM, Monts DL, Su Y, 2004. Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea* L. Czern. **New Phytologist**, 162:489–499.

Haque N, Peralta-Videa J, Jones GL, Gill TE, Gardea-Torresdey JL, 2008. Screening the phytoremediation potencial of desert broom (*Baccharis sarothroides* Gray) growing on mine tailings in Arizona, USA. **Environmental Pollution**, 153:362-368.

Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Bookum WT, Schat H., Meharg AA, 2001. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Plant Physiology**, 126:299–306.

Hartley-Whitaker J, Woods C, Meharg AA, 2002. Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*? **New Phytologist**, 155:219–225.

Hatzfeld Y, Lee S, Lee M, Leustek T, Saito K, 2000. Functional characterization of a gene encoding a fourth ATP sulfurylase isoform from *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, 248:51–58.

Isayenkov SV, Maathuis FJM, 2008. The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake. **FEBS Letters**, 582:1625-1628.

Johansen DA, 1940. **Plant Microtechnique**. 3^a ed. New York: Paul B. Hoeber, Inc. 790 p.

Kachenco AG, Bhatia NP, Singh B, Siegele R, 2007. Arsenic hyperaccumulation and localization in the pinnule and stipe tissues of the gold-dust fern (*Pityrogramma calomelanos* (L.) Link var. *austroamericana* (Domin) Farw.) using quantitative micro-PIXE spectroscopy. **Plant Soil**, 300:207–219.

Khan NA, Nazar R, Anjum NA, 2009. Growth, photosynthesis and antioxidant metabolism in mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in ATP-sulfurylase activity under salinity stress. **Scientia Horticulturae**, 122:455–460.

Kertulis-Tartar GM, Rathinasabapathi B, Ma LQ, 2009. Characterization of glutathione reductase and catalase in the fronds of two Pteris ferns upon arsenic exposure. **Plant Physiology and Biochemistry**, 47:960–965.

Lafrabie C, Major KM, Major CS, Cebrián J, 2010. Arsenic and mercury bioaccumulation in the aquatic plant, *Vallisneria neotropicalis*. **Chemosphere**, 82:1393-1400.

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.

Li WX, Chen TB, Huang ZC, Lei M, Liao XY, 2006. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Chemosphere**, 62:803–809.

Li H, Ye ZH, Wei ZJ, Wong MH, 2011. Root porosity and radial oxygen loss related to arsenic tolerance and uptake in wetland plants. **Environmental Pollution**, 159:30-37.

Lindeman W, 1958. Observations on the behaviour of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light, Proc, 2nd Int. **Conference on the Peaceful Uses Atomic Energy**, 24:8-15.

Lokhande VH, Srivastava S, Patade VY, Dwivedi S, Tripathi RD, Nikam TD, Suprasanna P, 2011. Investigation of arsenic accumulation and tolerance potential of *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. **Chemosphere**, 82:529–534.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, 193:265-275.

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.

May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montague M, Inze D, 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **Journal of Experimental Botany**, 49: 649–667.

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

Mendoza-Cózatl DG, Moreno-Sánchez R, 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. **Journal of Theoretical Biology**, 238,919–936.

Meuwly P, Rauser WE, 1992. Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium. **Plant Physiology**, 99:8-15.

Misbahuddin M, Fariduddin A, 2002. Water hyacinth removes arsenic from arsenic-contaminated drinking water. **Archives of environmental health**, 576:516-518.

Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Trivedi PK, 2008a. Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. **Aquatic Toxicology**, 86:205–215.

Mishra VK, Upadhyay R, Pathak V, Tripathi B, 2008b. Phytoremediation of Mercury and Arsenic from Tropical Opencast Coalmine Effluent Through Naturally Occurring Aquatic Macrophytes. **Water, Air and Soil Pollution**, 192:303–314.

Mokgalaka-Matlala NS, Flores-Tavizón E, Catillo-Michel H, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL, 2009. Arsenic tolerance in mesquite (*Prosopis* sp.): Low molecular weight thiols synthesis and glutathione activity in response to arsenic. **Plant Physiology and Biochemistry**, 47:822–826.

Moons A, 2003. *Osgtu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. **FEBS Letters**, 553:427-432.

Mukhopadhyay R, Rosen BP, 2002. Arsenate Reductases in Prokaryotes and Eukaryotes. **Environmental Health Perspectives**, 110:745-748.

Nagalakshmi N, Prasad MNV, 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Science**, 160:291-299.

Noctor G, Foyer C, 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49:249–279.

O'Brien TP, McCully ME, 1981. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne, Termacarphy Pty Ltd. 360p.

Oliveira JA, Cambraia J, Sousa MV, Oliva MA, 2009. Sulphate uptake and metabolism in water hyacinth and salvinia during cadmium stress. **Aquatic Botany**, 91:257–261.

Phartiyal P, Kim WS, Cahoon RE, Jez JM, Krishnan HB, 2006. Soybean ATP sulfurylase, a homodimeric enzyme involved in sulfur assimilation, is abundantly expressed in roots and induced by cold treatment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 450: 20–29.

Picault N, Cazalé AC, Beyly A, Cuiné S, Carrier P, Liu DT, Forestier C, Peltier G, 2006. Chloroplast targeting of phytochelation synthase in Arabidopsis: effects on heavy metal tolerance and accumulation. **Biochimie**, 88:1743-1750.

Prata 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.

Raab A, Feldmann J, Meharg AA, 2004. The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica* L. **Plant Physiology**, 134:1113–1122.

Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Rahman MM, 2008. Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrhiza* L.: Interactions with phosphate and iron. **Journal of Hazardous Materials**, 160:356–361.

Schat H, Llugany M, Voojijis R, Hartley-Whitaker J, Bleeker P, 2002. The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator metallophytes. **Journal of Experimental Botany**, 53:2381-2392.

Schmöger MEV, Oven M, Grill E, 2000. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiology**, 122:793-802.

Sedlak J, Lindsay RH, 1968. Estimation of total, protein bound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue by Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25:192-208.

Simon T, Eberhard A, Rohr R, 2000. Effect of Ni and As on radish tuber cultivated on artificially polluted soils. **European Journal of Soil Biology**, 36: 73–80.

Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K, 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, 53:65–73.

Smith E, Naidu R, Alston AM, 1998. Arsenic in the soil environment: a review. **Advances in Agronomy**, 64:149-195.

Sneller FEC, van Heerwaarden LM, Kraaijeveld-Smit FJL, Bookum WMT, Koevoets PLM, Schat H, Verkleij JAC, 1999. Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. **New Phytologist**, 144:223–232.

Snyder KV, 2006. Removal of arsenic from drinking water by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). **Journal of U.S. SJWP**, 1:41-58.

Sridhar BBM, Dieh SV, Han FX, Monts DL, Su Y, 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, 54:131–141.

Srivastava M, Ma LQ, Singh N, Singh S, 2005. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. **Journal of Experimental Botany**, 56:1335–1342.

Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD, Dwivedi S, Trivedi PK, Tandon PK, 2007. Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Environmental Science and Technology**, 4:2930-2936.

Srivastava S, Srivastava AK, Suprasanna P, D'Souza SF, 2009. Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 15:1-13.

Toppi LS, Vurro E, Rossi L, Marabottini R, Musetti R, Careri M, Maffini M, Mucchino C, Corradini C, Badiani M, 2007. Different compensatory mechanisms in two metal-accumulating aquatic macrophytes exposed to acute cadmium stress in outdoor artificial lakes. **Chemosphere**, 68:769–780.

Verbruggen N., Hermans C., Schat H. (2009) Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants Nathalie. **Current Opinion in Plant Biology** 12:1–9.

Yadav SK, 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. **South African Journal of Botany**, 76:167–179.

Wangelin, A.L., Burkhead, J.L., Hale, K.L., Lindblom, S.D., Terry, N., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2004. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard: effects on tolerance and accumulation of twelve metals. **Journal of Environmental Quality**, 33:54-60.

Wu C, Ye Z, Shu W, Zhu Y, Wong M, 2011. Arsenic accumulation and speciation in rice are affected by root aeration and variation of genotypes. **Journal of Experimental Botany**, 1:10.

Zhang W, Cai Y, Downum K, Ma LQ, 2004. Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). **Environmental Pollution**, 131:337-345.

Zhang J, Zhao QZ, Duan GL, Huang YC, 2010. Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings. **Environmental and Experimental Botany**. *In press*.

Zhu YL, Pilon-Smits AH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N, 1999. Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. **Plant Physiology**, 121:1169–1177.

CONCLUSÕES GERAIS

O sucesso da fitorremediação depende do entendimento dos mecanismos que envolvem a tolerância e o acúmulo de As na planta, sendo que com este estudo, foi possível analisar algumas respostas fisiológicas, bioquímicas e estruturais de *E. crassipes* após exposição a esse metaloide. A partir dessas análises, verificou-se que essa macrófita aquática é bastante eficiente na remoção de As, com elevada translocação para a parte aérea, sendo que concentrações mais elevadas de As comprometem o desenvolvimento da planta, com efeito negativo sobre as enzimas envolvidas no combate ao estresse oxidativo. Além disso, os resultados do presente estudo sugerem que o aumento na atividade das enzimas antioxidativas, induzido por concentrações moderadas de As, representa um mecanismo de defesa secundário contra esse metaloide.

As enzimas envolvidas com o metabolismo da glutatona, como ATPS, GR, GST e γ -ECS, parecem ser importantes nos processos para a desintoxicação do As acumulado tanto na raiz, como na parte aérea. Além disso, a redução nos teores de glutatona nas plantas tratadas com As indicam provável síntese de fitoquelatinas, importantes na complexação do metaloide e na redução de sua toxicidade. Adicionalmente, os estudos anatômicos evidenciaram danos estruturais significativos apenas na região apical das folhas de plantas expostas a 7 μ M de As, onde os sintomas de toxidez a esse elemento se iniciam, enquanto nas raízes nenhum dano estrutural foi observado, o que reforça a tolerância de *E. crassipes* a essa concentração de As.

Dessa forma, os resultados deste estudo contribuirão para a melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a tolerância e o acúmulo de As em *E. crassipes*, podendo auxiliar na otimização da eficiência da fitorremediação de ambientes contaminados com As.