

NEIDIQUELE MARIA SILVEIRA

**TOXICIDADE DO ARSÊNIO E MEDIAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NAS
RESPOSTAS CELULARES EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

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

T

S587T
2012

Silveira, Neidiquele Maria, 1987-

Toxicidade do arsênio e mediação do óxido nítrico nas respostas celulares em alface (*Lactuca sativa* L.) / Neidiquele Maria Silveira. – Viçosa, MG, 2012.
x, 33f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 27-33.

1. Alface. 2. *Lactuca sativa*. 3. Arsênio - Efeito fisiológico.
4. Antioxidantes. 5. Stress oxidativo. 6. Óxido nítrico.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 635.52

NEIDIQUELE MARIA SILVEIRA

**TOXICIDADE DO ARSÊNIO E MEDIAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NAS
RESPOSTAS CELULARES EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

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

APROVADA: 16 de fevereiro de 2012.

Luzimar Campos da Silva

Cleberson Ribeiro
(Coorientador)

Juraci Alves de Oliveira
(Orientador)

À Deus e aos meus familiares,

OFEREÇO

Aos meus pais Maria das Graças
e José Tadeu (in memoriam), pelo exemplo
e a minha irmã Neidimila, pelo amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sem Ele nada seria possível.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV) - Programa de Fisiologia Vegetal - por proporcionarem condições para o desenvolvimento desse trabalho e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Professor, Orientador e amigo Juraci Alves de Oliveira pelo exemplo de profissionalismo, amizade e conselhos.

Aos Coorientadores Prof. Cleberson Ribeiro e Prof. José Cambraia, pelas dicas e ajudas imprescindíveis.

A Prof^a Luzimar Campos pelo apoio e disponibilidade na banca de defesa.

Aos Professores do Curso de Fisiologia Vegetal.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) que permitiu realizar a análise de fluorescência, em especial a Karla que se disponibilizou a ajudar.

Aos amigos do laboratório, Fernanda, Grasielle, Regiane, Cristiane, Leandro, Daniela Cassol e Flávio pelo incentivo, momentos de descontração e ajuda! Ao estagiário Luhan pela ajuda, amizade e torcida.

Ao laboratorista Carlos, pela ajuda.

Aos amigos do curso de Fisiologia Vegetal, pelos momentos de descontração, conselhos e amizade que irei levar pra vida toda!

A toda minha família que sempre me apoiou.

As amigas da república pelas risadas, companheirismo e conselhos.

BIOGRAFIA

Neidiquele Maria Silveira, filha de Maria das Graças Ferreira Silveira e José Tadeu da Silveira, nasceu em 08 de maio de 1987, na cidade de Elói Mendes, MG.

Em Janeiro de 2010 graduou-se em Ciências Biológicas, bacharelado, pela Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG.

Iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa em março de 2010 e, em fevereiro de 2012 submeteu-se à defesa de dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1) INTRODUÇÃO.....	1
2) OBJETIVO GERAL	5
2.1 Objetivos específicos.....	5
3) MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1 Cultivo e exposição das plantas ao arsenato e ao nitroprussiato de sódio.....	6
3.2 Determinação da concentração de arsênio.....	7
3.3 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio	7
3.4 Determinação da concentração de ânion superóxido	8
3.5 Avaliação da peroxidação de lipídios.....	8
3.6 Avaliação do efeito do arsênio sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidativo das plantas.....	9
3.6.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos.....	9
3.6.2 Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1).....	9
3.6.3 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	10
3.6.4 Determinação da atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7).....	10
3.6.5 Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)	11
3.6.6 Determinação da atividade da redutase da glutathione (GR, EC 1.6.4.2).....	11
3.6.7 Determinação da atividade da peroxidase da glutathione (GPX, EC 1.11.1.9).....	11
3.7 Detecção <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico (NO).....	12
3.8 Determinação de proteínas.....	12
3.9 Delineamento experimental e análise estatística.....	13
4) RESULTADOS	13
4.1 Concentração de arsênio (As) em folhas de alface	13
4.2 Produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido	14
4.3 Concentração de malonaldeído (MDA)	15
4.4 Efeito do As e do NO sobre a atividade de enzimas antioxidantes	16
4.5 Produção de NO detectada com DAF 2-DA	19

5) DISCUSSÃO.....	21
6) CONCLUSÃO.....	25
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	277

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática das reações envolvendo o marcador DAF-2DA para a detecção de NO por microscopia de fluorescência.....5
- Figura 2** Teores de peróxido de hidrogênio (A) e ânion superóxido (B) em folhas de *Lactuca sativa*, após 4, 12 e 24 horas de exposição aos tratamentos: Controle (■), SNP 100µM (■), As 50µM (■) e As+SNP (□).....15
- Figura 3** Teores de malonaldeído (MDA) em folhas de *Lactuca sativa*, após 4, 12 e 24 horas de exposição aos tratamentos: Controle (■), SNP 100µM (■), As 50µM (■) e As+SNP (□).....16
- Figura 4** Atividade das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), peroxidase (C), peroxidase do ascorbato (D), redutase da glutathiona (E) e peroxidase da glutathiona (F), em *Lactuca sativa* após 4, 12 e 24 horas de exposição aos tratamentos: Controle (■), SNP 100µM (■), As 50µM (■) e As+SNP (□).....18
- Figura 5** Produção *in situ* de NO em folhas de *Lactuca sativa*, coletadas após 24 h de tratamento, utilizando o marcador DAF- 2 DA. A) Controle; B) SNP; C) As e D) As+SNP. Ao lado gráfico mostrando a intensidade da produção de NO.....20

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Teores de As em folhas de <i>Lactuca sativa</i> , após diferentes tempos de exposição aos tratamentos.....	14
---	----

RESUMO

SILVEIRA, Neidiquele Maria, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Toxicidade do arsênio e mediação do óxido nítrico nas respostas celulares em alface (*Lactuca sativa* L.)** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientadores: Cleberson Ribeiro e José Cambraia.

Plantas de alface (*Lactuca sativa* L. cv Hanson) Asteraceae) foram submetidas a níveis tóxicos de arsênio (As) com o objetivo de induzir o estresse oxidativo e avaliar o papel do óxido nítrico (NO), fornecido via SNP, como agente atenuante desse estresse. As plantas foram tratadas com 50 μM de As, com ou sem SNP, na concentração de 100 μM , adicionados à solução nutritiva durante o período de 4, 12 e 24 horas. A concentração de H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e MDA foram determinadas, além da atividade das enzimas catalase (CAT), dismutase do superóxido (SOD), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutathione (GR) e peroxidase da glutathione (GPX), a concentração de As e detecção de NO através da microscopia confocal. Plantas de alface expostas ao As apresentaram elevada concentração desse elemento nas folhas, em média 6,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ de MS, durante o período de 24 horas, mostrando rápida absorção e translocação para a parte aérea. Elevadas concentrações de As nas folhas foram acompanhadas de significativo incremento nas concentrações de H_2O_2 e MDA. A presença de SNP, no entanto, atuando como doador de NO, promoveu redução na concentração do H_2O_2 . As atividades das enzimas nas plantas expostas ao As aumentou significativamente, indicativo da participação na redução do estresse induzido pelo metaloide. Nas plantas expostas ao As e SNP, as atividades enzimáticas foram reduzidas, possivelmente pela ação direta do NO sobre os metabólitos tóxicos produzidos durante o estresse. Nas plantas submetidas ao estresse por As, observou-se maior produção de NO, resultado comprovado pelo aumento na fluorescência. Quando fornecido na forma exógena, o NO também agiu diretamente na remoção de metabólitos tóxicos gerados em resposta ao As. Assim, verificou-se que o NO, fornecido pelo SNP, ameniza a toxicidade do As sobre folhas de alface.

ABSTRACT

SILVEIRA, Neidiquele Maria, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa. February, 2012. **Toxicity of arsenic and nitric oxide in the mediation of cellular responses in lettuce (*Lactuca sativa* L.)** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisers: Cleberson Ribeiro and José Cambraia.

Lettuce plants (*Lactuca sativa* L. cv Hanson) Asteraceae) were exposed to different arsenic (As) toxic levels aiming to induce the oxidative stress and evaluate the role of nitric oxide (NO), given as SNP, as an attenuating agent of this kind of stress. Plants were treated with 50 μM As, with or without SNP at the concentration of 100 μM , added to the nutrient solution in 4, 12 and 24 hours. The concentration of H_2O_2 , O_2^- and MDA, the enzymatic activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPX) and the As and NO concentration were measured. Lettuce plants exposed to As showed elevated As concentration in leaves, in average 6,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, in the short period of 24 hours with fast uptake and translocation to the leaves. The high As concentration detected in leaves were followed by a significant increase in H_2O_2 and MDA concentrations. SNP presence, however, acting as NO donor promoted reduction in the concentration of these oxidative agents. The enzymatic activities in the plants exposed to As were increased which indicates an active participation of these enzymes as part of the strategy to reduce the oxidative stress induced by the metalloid. In the plants exposed to As and SNP, these activities were reduced, possibly related to the NO direct action in the scavenging of the generated toxic metabolites. In the plants exposed to As, there was higher production of NO observed through the high fluorescence intensity. When given as an exogenous form, NO acted directly in the scavenging of the toxic metabolites generated in response to As exposure. Therefore, it was observed that NO, given as SNP, attenuate As-induced toxicity in lettuce leaves.

1) INTRODUÇÃO

As plantas são frequentemente expostas a condições de estresses bióticos e abióticos e, para minimizar ou remediar os danos biológicos causados por estes estresses, as plantas podem induzir modificações no seu metabolismo, ao nível estrutural, bioquímico ou molecular. Para tanto, o vegetal detecta precocemente a condição desfavorável e ativa cascatas de sinalização que levarão às respostas de tolerância. Várias vias de sinalização de estresse já foram descritas na literatura, como as vias mediadas por cálcio (Berridge et al., 2003) e por guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (Meier et al., 2009).

Recentemente, estudos têm demonstrado o papel do óxido nítrico (NO) como mediador em várias vias de sinalização envolvidas na resistência a doenças, na morte celular, na senescência, no desenvolvimento da raiz, na germinação, nas respostas hormonais, no crescimento, na floração e nas respostas a estresses bióticos (Halliwell e Gutteridge, 1984; Malan et al., 1990; Elstern, 1991; Gille e Sigler, 1995; Foyer et al., 1997; Prasad e Rengel, 1998; Prasad et al., 1999; Tsugane et al., 1999; Geoffroy et al., 2002; Mittler, 2002; Pinheiro et al., 2002).

Em relação à resposta a estresses abióticos, além do papel sinalizador, o NO possui ação antioxidante, como constatado em plântulas de arroz (Singh et al., 2009) submetidas a diversos agentes estressores, dentre eles, o arsênio (As).

Diversos estudos têm demonstrado que o NO, quando fornecido de forma exógena, através de moléculas, como o nitroprussiato de sódio (SNP), pode atenuar o estresse causado por As (Singh et al., 2009). O SNP ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) é uma molécula inorgânica que não atravessa as membranas celulares, mas é capaz de liberar NO, que por sua vez, se difunde nas células. A liberação de NO, neste caso, é acompanhada pela liberação de cianeto, o que pode levar à toxicidade celular. Além

disso, dependendo da dose aplicada, pode haver a produção de peroxinitrito e peróxido de hidrogênio (Wang et al., 2002). Contudo, dentre as moléculas doadoras de NO, o SNP tem demonstrado os melhores resultados (Murgia et al., 2004). Assim, para que esse radical exerça suas funções sinalizadoras, é essencial o controle de sua homeostase, permitindo níveis adequados de concentração em diferentes situações fisiológicas ou de estresse. Os níveis endógenos do NO são determinados pelo balanço entre a síntese e a degradação desse radical.

De fato, para que ocorra a síntese de NO, é necessário que haja um estímulo, propiciando aumento dos níveis endógenos dessa molécula. Isso ocorre, por exemplo, durante a resposta de defesa do vegetal ao ataque de diversos tipos de patógenos. Num trabalho pioneiro, Delledonne et al., 1998 verificaram a indução da produção de NO por células de soja em resposta à inoculação com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.

O arsênio (As) é um metalóide encontrado na água, no solo e no ar a partir de fontes naturais e antrópicas. As formas inorgânicas, arsenato (As^V), presente em águas superficiais, e o arsenito (As^{III}), presente em águas subterrâneas, são consideradas as mais tóxicas e disponíveis para as plantas (Tripathi et al., 2007; Mishra et al., 2010).

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação entre hábitos alimentares e o risco de doenças, devido a contaminação com As (Mulabagal et al., 2010). Uma das maiores fontes de contaminação do homem por As se faz pela ingestão de água e alimentos, principalmente vegetais (Williams et al., 2006; Bienert et al., 2008; Ashan et al., 2010).

Uma das hortaliças mais consumidas no mundo é a alface (*Lactuca sativa* L.), devido às suas características e propriedades nutricionais (Mulabagal et al., 2010). A contaminação dessa espécie, portanto, representa um grande risco à saúde pública.

Dessa forma, estudos acerca da capacidade de acumular As por essa espécie, assim como sua capacidade em resistir à toxicidade desse elemento, torna-se indispensável, no intuito de preservação e manutenção da saúde pública.

As plantas, normalmente, absorvem o As^{V} ou As^{III} por meio de diferentes sistemas de transporte. O As^{V} é absorvido através de transportadores de fosfato (P^{V}), já que os elementos são quimicamente semelhantes e, provavelmente, parte da toxicidade ocorre pela substituição do P^{V} pelo As^{V} , com consequência sobre sua principal fonte de energia – o ATP (Zhao et al., 2009; Wang et al., 2010). O As^{III} é absorvido através das aquaporinas, predominantemente na forma neutra $\text{As}(\text{OH})_3$. Essa molécula possui grande afinidade pelos grupos sulfidrilas – SH, importantes componentes de enzimas e proteínas, o que pode levar à disfunção e morte celular (Zhao et al., 2009; Wang et al., 2010).

De acordo com Shri et al., 2009, o As tem sido relacionado com o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais ocasionam o estresse oxidativo. Há evidência de que parte das ROS geradas se deve à conversão do As^{III} para As^{V} , processo que ocorre nas plantas assim que o As^{V} é absorvido (Hartley-Whitaker et al., 2001; Stoeva e Bineva, 2003). Como o processo de oxidação de As^{V} ocorre rapidamente, entende-se que parte dos efeitos tóxicos do As está relacionado ao seu produto de oxidação, o As^{III} (Zhao et al., 2010).

As ROS, como ânions superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são fortes agentes oxidantes que podem, direta ou indiretamente, danificar o DNA, biomoléculas, lipídios e proteínas (Gunes et al., 2007; Gunes et al., 2009). Os danos aos lipídios, constituintes das membranas, podem alterar a sua permeabilidade e seletividade, alterando a absorção e transporte de nutrientes como o potássio, cálcio, magnésio e fósforo (Shaibur et al., 2008a; Mathuis, 2009), conforme

observado em arroz (Shaibur et al., 2006, 2008c) e cevada (Shaibur et al., 2008b).

A avaliação das atividades das enzimas antioxidantes e a taxa na peroxidação de lipídios têm sido comumente utilizadas como indicadores de estresse oxidativo em plantas (Lee et al., 2007; Mishra et al., 2010).

As respostas bioquímicas das plantas à toxicidade dos metais são complexas, e várias estratégias de defesa tem sido sugeridas, como aumento na atividade de enzimas antioxidantes como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases totais (POX), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutathiona (GR) e peroxidase da glutathiona (GPX), assim como aumento na concentração de antioxidantes não-enzimáticos (ascorbato, glutathiona e α -tocoferol) (Gunes et al., 2009).

Um dos maiores obstáculos na pesquisa do radical óxido nítrico é sua exata localização e quantificação em extratos ou tecidos de plantas (Sthör e Stremlau, 2006). As diaminofluoresceínas (DAFs) são marcadores utilizados para a detecção do NO em tecidos *in vivo* ou *in situ*, através da emissão de fluorescência (Yao et al., 2004, Kojima et al., 1998).

A transformação química do composto 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) está baseada na reatividade de diaminas vicinais aromáticas com o NO, em presença de O₂. A N-nitrosilação de DAFs resulta na formação de um triazol, DAF-2T, que emite fluorescência esverdeada (Kojima et al., 1998) (Fig 1). DAFs não reagem diretamente com o NO, mas sim com suas formas oxidadas como, por exemplo, N₂O₃ (Fernandes et al., 2004, Mur et al., 2011). Entre as DAFs mais utilizadas como indicadores de NO, tem destaque o composto permeável à membrana plasmática, DAF-2 diacetato (DAF-2DA), que ao entrar na célula é hidrolisado por esterases para formar DAF-2, sensível ao NO (Kojima et al., 1998). O limite de detecção de DAF-2DA para o NO é de, aproximadamente, 5 nM (Kojima et al., 1998). Como o DAF-2DA é capaz de entrar na

célula, este indicador não pode ser utilizado para monitorar o conteúdo extracelular de NO. De modo geral, as DAFs permitem a marcação do NO em amostras biológicas (Nagano, 1999). A excitação desta classe de indicadores está no comprimento de luz visível (causando menos danos às células), e não está sujeita a autofluorescência de amostras biológicas (Nagano, 1999). Seu pH ótimo é de 7,4, no entanto, existem alguns problemas metodológicos no uso de DAFs para aplicações biológicas, dentre eles está a sensibilidade deste indicador ao pH (Halbach, 2003).

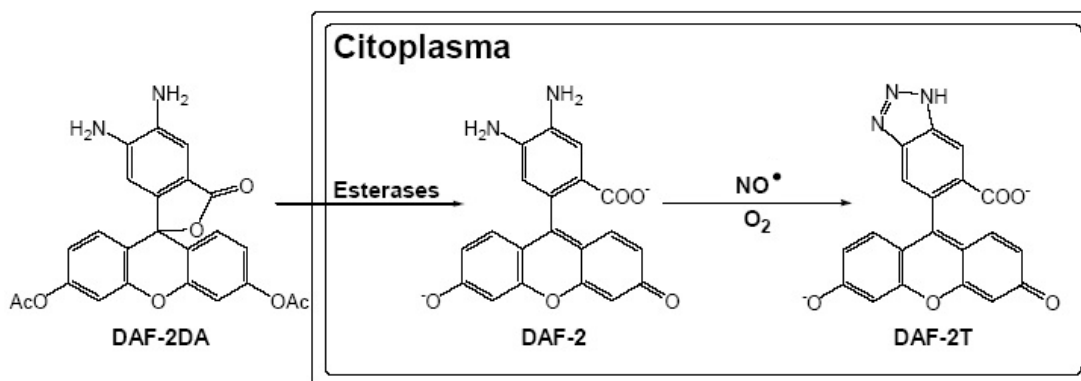


Figura 1 Representação esquemática das reações envolvendo o marcador DAF-2DA para a detecção de NO por microscopia de fluorescência

2) OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do NO sobre o estresse oxidativo causado por níveis tóxicos de arsênio em cultivar de alface (*Lactuca sativa* L. cv Hanson)

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os teores dos agentes oxidantes e a atividade das enzimas antioxidantes em plantas de *Lactuca sativa* expostas ao As.

- Avaliar a influência do NO sobre os teores dos agentes oxidantes e o funcionamento dos mecanismos antioxidativos enzimáticos sob níveis tóxicos de As.
- Detectar e localizar a presença de NO nos tecidos foliares com uso da microscopia confocal.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo e exposição das plantas ao arsenato e ao nitroprussiato de sódio

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv Hanson) Asteraceae) adquiridas no comércio local da cidade de Viçosa/ MG, foram utilizadas em todos os experimentos. Elas foram colocadas pra germinar em areia lavada e esterilizada, sendo umedecida com solução de Clark (1975) 1/3 força iônica. Após 20 dias de germinação, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de forma e de tamanho da parte aérea e raiz. Em seguida, foram aplicados os tratamentos, transferindo as plantas para vasos (2 plantas/vaso) contendo 1,8 L da solução nutritiva de Clark (1975), aeradas, pH 6,5 (ajustado diariamente) e mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo luminoso de 16 horas.

As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: (a) solução nutritiva, como controle; (b) solução nutritiva com nitroprussiato de sódio (SNP) 100 μM ; (c) solução nutritiva com arsênio (na forma de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 50 μM e (d) solução nutritiva com As 50 μM juntamente com SNP 100 μM . No período de 4, 12 e 24 horas do início dos tratamentos, as folhas foram coletadas, lavadas em água corrente e armazenadas a -80 °C para posteriores análises.

3.2 Determinação da concentração de arsênio

Amostras de 0,1 g de material seco das folhas foram digeridas com mistura nitro-perclórica (2:1), em bloco digestor, com temperatura controlada (100-120°C) até a completa oxidação do material vegetal (Marin et al. 1993). O extrato mineral obtido foi diluído para 50 mL com água desionizada e, então, o As foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidreto (modelo Shimadzu AA6701F).

3.3 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

Amostras de 0,3 g de folhas, trituradas em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, seguido de centrifugação a 10.000 xg, por 15 min, 4°C (Kuo e Kao, 2003).

Alíquotas de 30 µL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000), homogeneizadas e mantidas no escuro por 30 min. Seguiu-se a determinação da absorvância a 560 nm e a quantificação de H₂O₂ realizada com base em curva de calibração, utilizando concentrações padronizadas de peróxido de hidrogênio. Brancos para os reagentes e os extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra.

3.4 Determinação da concentração de ânion superóxido

Amostras de 0,05 g de folhas foram cortadas em pequenos segmentos e incubadas em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na_2EDTA) 100 μM , β -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20 μM e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001), em tubos tipo “penicilina”, hermeticamente fechados. A reação foi iniciada pela introdução de 100 μL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, utilizando-se seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 min. Os tecidos foram removidos e, a partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura da absorvância a 480 nm, durante 5 min. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem material vegetal. A produção de ânion superóxido foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Boveris, 1984).

3.5 Avaliação da peroxidação de lipídios

Amostras de 0,3 g de folhas foram homogeneizadas com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) e centrifugadas a 12.000 xg por 15 min. Alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) em TCA 20 %. A mistura foi incubada em água fervente por 30 min, e a reação foi interrompida em banho de gelo por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg durante 10 min, e a absorvância determinada a 532 nm. A turbidez inespecífica foi corrigida através da subtração da absorvância da mesma em 600 nm. Utilizou-se o coeficiente de extinção $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para quantificar a concentração dos peróxidos de lipídios, sendo os resultados expressos em nmol MDA g^{-1} de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

3.6 Avaliação do efeito do arsênio sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidativo das plantas

3.6.1 Obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações da atividade da catalase (CAT), da peroxidase (POX), da peroxidase do ascorbato (APX), da superóxido dismutase (SOD), da peroxidase da glutatona (GPX) e da redutase da glutatona (GR), foram obtidas pela maceração de 0,3 g de folhas em nitrogênio líquido e, então, adicionados 2 mL de meio de homogeneização, seguido de centrifugação a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C. Os meios de homogeneização 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 CAT, POX e SOD. 2) Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ascorbato 1 mM e EDTA 1 mM (Nakano e Asada, 1981), para a APX. 3) Tampão Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM e MgCl₂ 10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001), para a GPX. 4) Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1%, para a GR (Carlberg e Mannervik, 1985).

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

Determinou-se a atividade da SOD pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto a 2,97 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 (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT,

foi determinada pela medição da absorvância a 560 nm. A medição da absorvância, nesse mesmo comprimento de onda, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual tempo, serviu de branco e foi subtraída da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50 % a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

3.6.3 Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Determinou-se a atividade da catalase pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM (Havir e McHale, 1987). Durante o primeiro minuto de reação, mantida a 25°C, mediu-se o decréscimo na absorvância a 240 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.6.4 Determinação da atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM (Kar e Mishra, 1976). O incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C, determinou-se a produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

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

A atividade da APX foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de ascorbato 0,8 mM e H_2O_2 1,0 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0. Observou-se o decréscimo na absorvância a 290 nm, à 25°C, durante o primeiro minuto de reação (Nakano e Asada, 1981; Koshiba, 1993). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.6.6 Determinação da atividade da redutase da glutathione (GR, EC 1.6.4.2)

A atividade da redutase da glutathione foi determinada pela adição de 100 μL de extrato enzimático bruto de folhas a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, glutathione oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM (em tampão TRIS-HCl 0,5 mM, pH 7,5), segundo Carlberg e Mannervik (1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30°C, foi medido no primeiro minuto. Calculou-se a atividade enzimática através do coeficiente de extinção molar de 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Foyer e Halliwell, 1976) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ proteína.

3.6.7 Determinação da atividade da peroxidase da glutathione (GPX, EC 1.11.1.9)

A atividade da peroxidase da glutathione foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto de folhas diluído 1:5, 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, glutathione reduzida (GSH) 1 mM, NADPH 0,2 mM, H_2O_2 0,25 mM e 1 unidade de

redutase da glutatona (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30°C, foi medido no primeiro minuto de reação. Calculou-se a atividade enzimática através do coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Anderson e Davis, 2004) e o resultado expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.7 Detecção *in situ* da produção de óxido nítrico (NO)

Com 24 h de exposição aos tratamentos, procedeu-se à coleta de folhas jovens completamente expandidas, para análise *in situ* da produção de NO. Cortes transversais finos, obtidos em micrótomo de mesa, da parte mediana da folha foram incubados em solução de 4,5 diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA) 10 mM, à temperatura ambiente, na ausência de luz e sob agitação (Kojima et al., 1998; Magalhães et al., 2000). Decorridos 20 min, os cortes foram lavados em água destilada para retirada do excesso da substância marcadora e, em seguida, montados em água entre lâmina e lamínula. Seguiu-se análise imediata em microscópio confocal Zeiss LSM 510 e filtros de comprimentos de onda de 450 e 515 nm. As imagens obtidas foram computadas e analisadas utilizando-se o programa Zeiss LCM Image Browser. Para todos os tratamentos, foi feito o controle negativo, sem a presença da substância marcadora DAF-2DA, a fim de visualizar a fluorescência natural (autofluorescência).

3.8 Determinação de proteínas

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford et al. (1976), utilizando BSA como padrão.

3.9 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (4x3), sendo 4 tratamentos e 3 tempos de exposição, com 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de significância para todos os experimentos. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar, desenvolvido por Ferreira (1999).

4) RESULTADOS

4.1 Concentração de arsênio (As) em folhas de alface

A absorção e translocação do As pelas plantas de alface ocorreu de forma relativamente rápida, atingindo teores elevados com 24 h (Tabela 1). Nas primeiras quatro horas de exposição não se observou qualquer efeito do SNP sobre os teores de As nas folhas de plantas expostas ao As. Nos tempos de 12 e 24 h de exposição, entretanto, observou-se expressiva participação do NO na redução da absorção/translocação de As, fazendo com que os teores de As nas folhas das plantas expostas ao As fossem 113,1% e 426,9% maiores do que aquelas obtidas no tratamento com As + SNP (Tabela 1).

Observa-se que os teores de As nas folhas de plantas mantidas em meio contendo As+SNP manteve-se praticamente inalterada a partir de 12 horas de exposição. Por outro lado, naquelas plantas expostas apenas ao As ocorreu aumento médio de 550% no teor de As na folha com o tempo de exposição (Tabela 1).

TABELA 1: Teores de As em folhas de *Lactuca sativa*, após diferentes tempos de exposição aos tratamentos.

Tratamentos	Concentração As ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)		
	4 h	12 h	24 Lh
Controle	0,082 Ba	0,021 Ca	0,001 Ca
SNP	0,022 Ba	0,017 Ca	0,000 Ca
As	0,971 Ac	2,325 Ab	6,312 Aa
As+SNP	0,741 Ab	1,091 Ba	1,198 Ba

Médias seguidas de letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, e pela mesma letra minúscula, entre cada tratamento para tempos de exposição diferentes, não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.2 Produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido

A exposição das plantas ao As resultou em aumento significativo no teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com o decorrer do tempo, alcançando valores 104,8% maiores do que aqueles obtidos em plantas controle, com 12 h de tratamento. A presença do SNP, no entanto, foi capaz de impedir esse acréscimo e mantê-lo em concentrações aproximadamente iguais às daquelas do controle, mesmo com 24 h de tratamento. Nesse tempo, verificou-se que o teor de H_2O_2 foi aproximadamente 38% menor nas plantas expostas ao As+SNP em relação às plantas expostas ao As (Fig 2A).

Isoladamente, o SNP não teve influência significativa no teor de H_2O_2 , permanecendo os valores aproximadamente iguais aos da planta controle.

A exposição das plantas aos tratamentos com SNP e As, de forma isolada ou em associação, não promoveu alteração nos teores de ânion superóxido, mesmo com 24 h de exposição (Fig 2B).

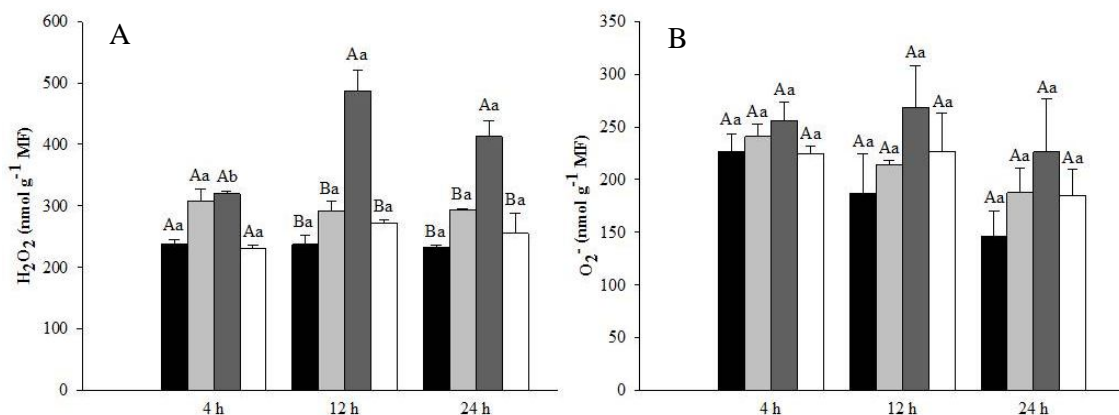


Figura 2 Teores de peróxido de hidrogênio (A) e ânion superóxido (B) em folhas de *Lactuca sativa*, após 4, 12 e 24 horas de exposição aos tratamentos: Controle (■), SNP 100µM (■), As 50µM (■) e As+SNP (□). Médias seguidas de letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, e pela mesma letra minúscula, entre cada tratamento para tempos de exposição diferentes, não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 Concentração de malonaldeído (MDA)

O teor de peroxidação lipídica nas folhas da alface, quando submetidas ao As, foi significativamente maior comparado aos demais tratamentos, principalmente nas primeiras horas de exposição. Com 12 h de exposição ao As, o incremento na concentração de MDA foi 202% maior do que o controle, reduzindo para 90% ao final de 24 h. A aplicação de SNP, eliminou os efeitos causados pelo As na peroxidação das membranas celulares já a partir de 4 h e se estendeu até o fim do experimento (Fig 3).

A adição de SNP isoladamente não causou alteração significativa na concentração de MDA, permanecendo próximo aos valores observados no controle.

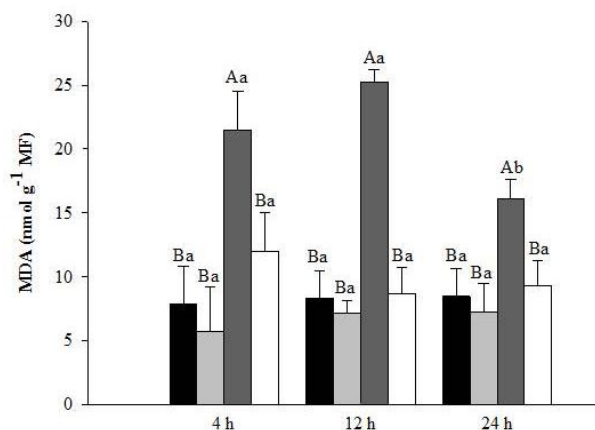


Figura 3 Teores de malonaldeído (MDA) em folhas de *Lactuca sativa*, após 4, 12 e 24 horas de exposição aos tratamentos: Controle (■), SNP 100µM (■), As 50µM (■) e As+SNP (□). Médias seguidas de letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, e pela mesma letra minúscula, entre cada tratamento para tempos de exposição diferentes, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.4 Efeito do As e do NO sobre a atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) nas plantas expostas ao As, de modo geral, foi maior que nas plantas controle e tratadas com SNP. A presença do SNP em solução contendo As promoveu redução significativa na atividade dessa enzima, em todos os períodos avaliados, quando comparada àquela de plantas expostas apenas ao As (Fig 4A).

A exposição das plantas ao As resultou em incremento significativo na atividade da catalase (CAT) nas primeiras 4 horas de tratamento, mantendo-se elevada nos demais períodos de tempo (Fig 4B). A aplicação de SNP causou redução no aumento da atividade da CAT promovido pelo As, mas ainda assim, manteve-se mais elevada que nas plantas controle.

As plantas expostas ao As apresentaram aumento na atividade da peroxidase (POX), alcançando valores 237% maiores do que aqueles obtidos em plantas controle com 4 h de tratamento. Essa atividade se manteve elevada ao longo do tempo de exposição, com maior aumento em 24 h de tratamento (Fig 4C). A associação do As

com o SNP, no entanto, promoveu redução na atividade dessa enzima, obtendo valores similares àqueles das plantas controle.

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) permaneceu estatisticamente igual em todos os tratamentos nas primeiras 12 horas de tratamento. Com 24 horas, no entanto, ocorreu acréscimo de 147% na atividade após exposição ao As. A aplicação de SNP ao tratamento com As reduziu a atividade da enzima, que ainda assim, permaneceram 69% maior que no controle (Fig 4D).

O estresse ocasionado pela exposição das plantas ao As promoveu acréscimo na atividade da redutase da glutatona (GR) com 12 horas de tratamento, e incremento adicional com 24 horas. A adição do SNP à solução contendo As alterou o padrão de atividade da enzima, reduzindo-a para valores próximos aos das plantas controle (Fig 4E).

Os maiores acréscimos na atividade da peroxidase da glutatona (GPX) ocorreram no início do período de exposição ao As. Em 4 horas de exposição essa atividade foi 104% maior do que o controle, aumentando para 129% em 12 horas de tratamento. Essa elevada atividade, porém, não se manteve com 24 horas de exposição ao As, atingindo valores semelhantes àqueles dos demais tratamentos. O SNP aplicado isolado ou em associação com o As, não alterou a atividade dessa enzima, quando comparado ao controle nos diferentes tempos de tratamento (Fig 4F). A aplicação de SNP na presença de As reduziu o aumento na atividade da enzima causado por As, exceto com 24 h de tratamento.

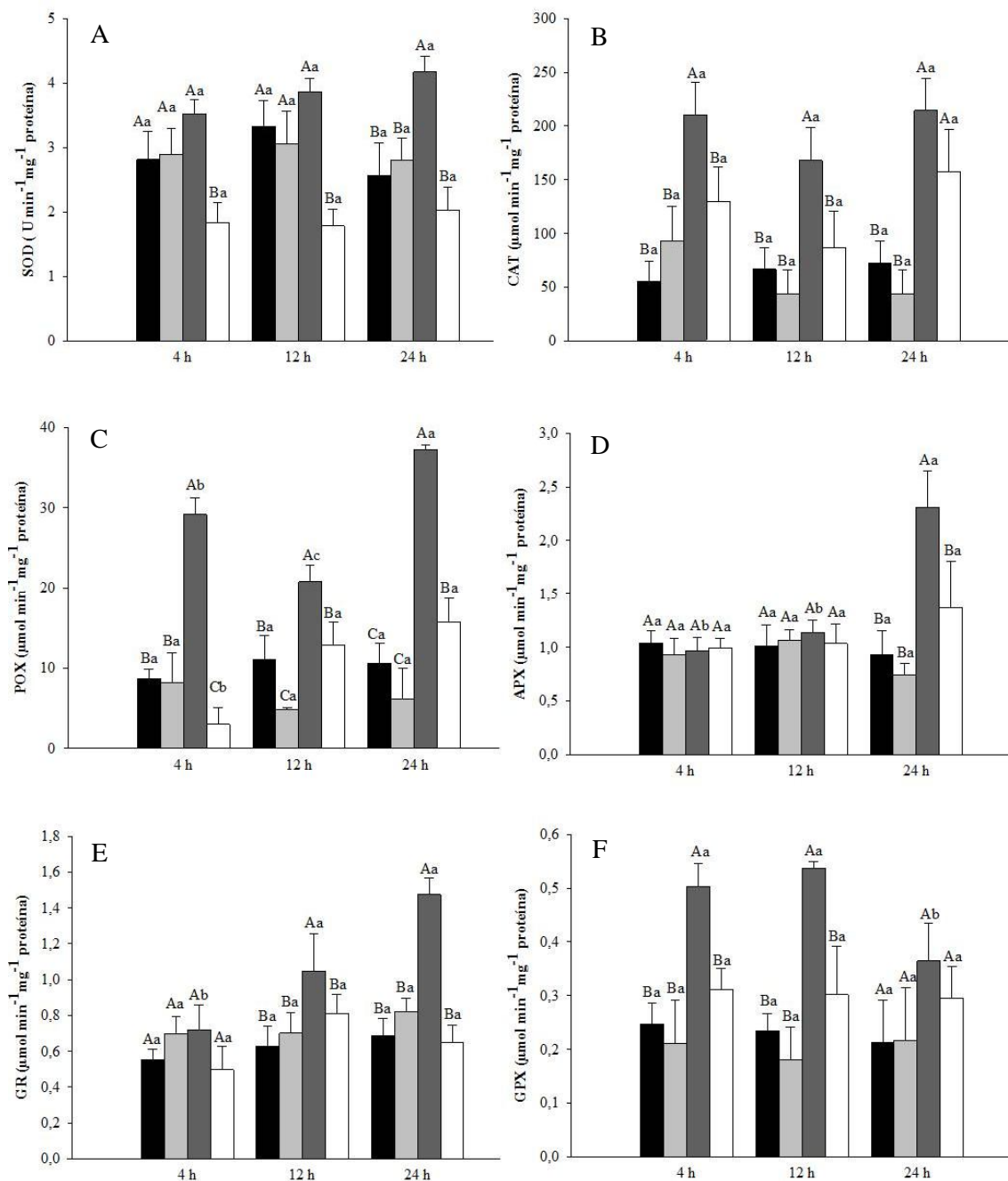


Figura 4 Atividade das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), peroxidase (C), peroxidase do ascorbato (D), redutase da glutaciona (E) e peroxidase da glutaciona (F), em *Lactuca sativa* após 4, 12 e 24 horas de exposição aos tratamentos: Controle (■), SNP 100µM (▒), As 50µM (■) e As+SNP (□). Médias seguidas de letra maiúscula, entre os tratamentos para o mesmo tempo de exposição, e pela mesma letra minúscula, entre cada tratamento para tempos de exposição diferentes, não diferem significativamente pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4.5 Produção de NO detectada com DAF 2-DA

A folha da planta controle, sem aplicação do marcador DAF 2-DA, não apresentou emissão de fluorescência, sendo este considerado o controle negativo de fluorescência natural das folhas de alface. Já no tratamento controle, com aplicação de DAF 2-DA, apresentou reduzida emissão de fluorescência, revelando insignificante produção de NO, com valores de intensidade abaixo de 40 (Fig 6A). Nas plantas expostas apenas ao SNP, doador exógeno de NO, observou-se intensa emissão de fluorescência, atingindo picos de intensidade superiores a 250, limite máximo de detecção (Fig 6B).

A exposição das plantas ao As resultou em elevada emissão de fluorescência, possível de ser visualizada em grande parte do corte, principalmente na região do parênquima paliádico e da nervura principal (Fig 6C). Isso indica que nessas regiões houve o maior acúmulo de NO, com picos de intensidade de emissão ultrapassando o limite máximo de detecção.

Nas plantas expostas ao As + SNP ocorreu intensa produção de NO, o que pode ser verificado pelos picos de emissão de fluorescência apresentados na figura 6D. Embora a emissão tenha ocorrido em valores equivalentes àqueles observados nas plantas expostas apenas ao As, o padrão de distribuição da fluorescência foi diferente, não sendo possível identificar nenhum tecido específico, ocorrendo apenas emissões pontuais de fluorescência em células individuais ao longo da lâmina foliar.

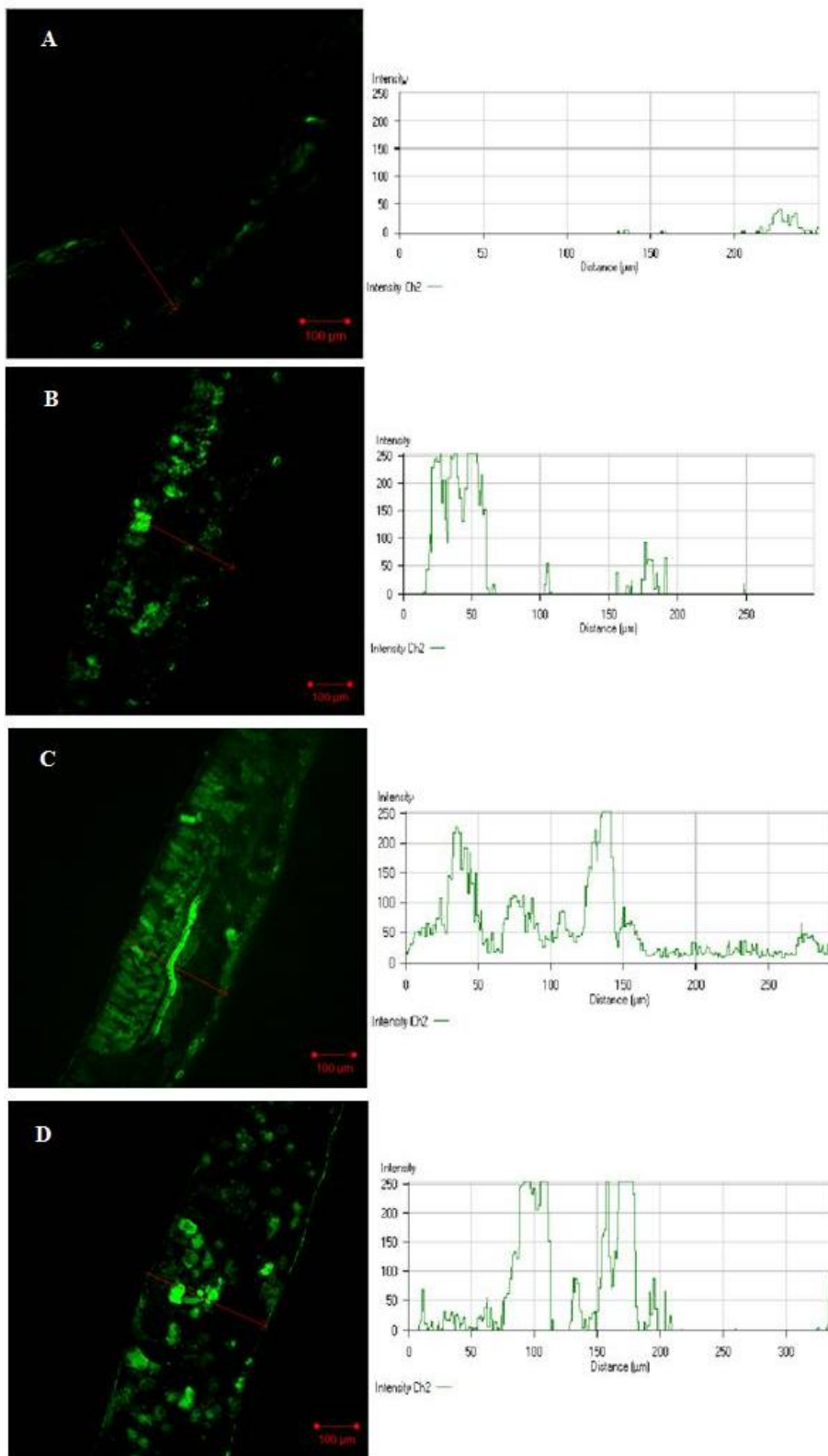


Figura 5 Produção *in situ* de NO em folhas de *Lactuca sativa*, coletadas após 24 h de tratamento, utilizando o marcador DAF- 2 DA. A) Controle; B) SNP; C) As e D) As+SNP. Ao lado gráfico mostrando a intensidade da produção de NO.

5) DISCUSSÃO

Plantas de alface expostas ao As, na concentração de 50 μM , apresentaram elevada concentração desse elemento nas folhas, em média 6,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ de MS, em um curto período de 24 horas, mostrando rápida absorção e translocação para a parte aérea. Por se tratar de uma planta com elevada taxa de crescimento e transpiratória, a translocação do As para as folhas, parece ocorrer de modo mais intenso, conforme sugere Gusman et al., 2011. Além da alface (Bunzl et al., 2001), outras espécies olerícolas, como a batata e o tomate (Farid et al., 2003), apresentam elevada translocação do As para as folhas. Os padrões de acúmulo de As são bastante variáveis entre as espécies vegetais, mas, em geral, a absorção deste elemento aumenta com o aumento de sua concentração na solução (Kertulis et al., 2005).

A elevada concentração de agente tóxico no meio celular resulta em diversas alterações metabólicas, principalmente pelo desequilíbrio na geração e, ou consumo de espécies reativas de oxigênio (Peixoto et al., 2005, Gill et al., 2010).

As elevadas concentrações de As detectadas nas folhas das plantas foram acompanhadas de significativo incremento nas concentrações de H_2O_2 e MDA, sem que tenha ocorrido alteração na produção de O_2^- . O H_2O_2 é subproduto inevitável do metabolismo oxidativo normal da planta, podendo ser gerado pela reação de Mehler nos cloroplastos, transporte de elétrons nas mitocôndrias e fotorrespiração em peroxissomos (Neill et al., 2002). Adicionalmente, pode ocorrer aumento na geração de H_2O_2 pela atuação de NADPH oxidases localizadas na membrana plasmática ou peroxidases da parede celular (Mittler, 2002, Singh et al., 2009).

O aumento na produção de H_2O_2 e de outras ROS pode ocasionar a peroxidação de lipídios, como resultado de uma cascata de eventos bioquímicos. Em consequência, pode ocorrer alterações na estrutura das membranas, falência dos mecanismos de troca

de metabólitos e, numa condição extrema, morte celular (Darley-Usmar et al., 2000).

A aplicação de SNP, como doador de NO, promoveu redução na concentração de H_2O_2 e, conseqüentemente, de MDA. Além de atuar como agente indutor de mecanismos antioxidantes, o NO pode combinar diretamente com radical alcoxila e peroxil, interrompendo a peroxidação lipídica (Wink e Mitchell, 1998). A redução na geração de MDA observada nas plantas expostas ao tratamento As + SNP demonstram o efeito citoprotetor do NO, reduzindo os danos celulares, como verificados por Yu et al., 2005, Wang e Yang, 2005, Singh et al., 2008 e 2009 e Valentovicová et al., 2010.

A prevenção dos danos celulares decorrentes da ação das ROS envolve a participação de diversos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Halliwell, 2006). No presente experimento, a exposição das plantas de alface ao As, de modo geral, resultou em aumento significativo nas atividades das enzimas antioxidantes, indicando participação ativa dessas enzimas como parte da estratégia que reduz o estresse induzido pelo metaloide.

A dismutase do superóxido (SOD) é a primeira enzima a atuar na eliminação de O_2^- , buscando manter concentrações que não causem danos ao metabolismo celular (Alscher et al., 2002). Nas plantas expostas ao As, observou-se aumento na atividade da SOD com conseqüente aumento na concentração H_2O_2 , o qual pode se difundir para vários compartimentos onde outras enzimas antioxidantes são ativadas e passam a atuar eliminando o excesso de H_2O_2 (Lee et al., 2001, Mittler et al., 2004).

A aplicação de SNP resultou em redução na atividade da SOD, o que pode ter ocorrido devido à ação direta do NO na remoção do radical O_2^- , reduzindo o teor do substrato para essa enzima (Singh et al., 2009). Resultados semelhantes foram encontrados em raízes de trigo submetidas ao estresse por cádmio, onde a aplicação do SNP causou redução na atividade da SOD, assim como de outras enzimas. Singh et al.

(2009), também encontraram resultados semelhantes em raízes de arroz submetidas ao As e SNP.

A participação da catalase (CAT) na resposta ao estresse causado pelo As ficou evidente logo nas primeiras horas de exposição ao metaloide. O aumento na atividade da CAT tem sido relacionado ao incremento na produção de H_2O_2 em condições de estresse oxidativo (Singh et al., 2009). Pelo fato de possuir baixa afinidade pelo H_2O_2 (Mittler, 2002), essa enzima atua na remoção de maiores concentrações desse composto.

O fornecimento exógeno de NO, via SNP, resultou em redução na atividade da catalase, o que coincidiu com o efeito que o SNP teve sobre os teores de H_2O_2 (Fig 2A). Aparentemente, o SNP, de algum modo, atua no metabolismo oxidativo resultando na diminuição da produção de H_2O_2 (Wang et al., 2010). Essa ação do NO sobre a CAT foi, também, verificado em outras condições de estresse, como relatado por Beligni et al. (2002), em folhas de batata tratadas com herbicida, e por Wang et al. (2011) em *Hydrilla verticillata* tratada com amônia.

Outra enzima que atua na remoção de H_2O_2 é a peroxidase (POX). A atividade desta enzima, no presente experimento, foi cerca de sete vezes menor que a da CAT, indicando menor participação no processo de eliminação de H_2O_2 . A POX, entretanto, apresenta maior afinidade pelo substrato, exercendo a função de ajuste fino no controle dos teores de H_2O_2 (Willekens et al., 1997, Mittler 2002).

A atuação conjunta da catalase e da peroxidase, parece não ter sido suficiente para remover o excesso de H_2O_2 produzido, sob estresse com As, uma vez que a concentração dessa espécie reativa aumentou ao longo do tempo de exposição ao As. A adição de SNP juntamente com o As resultou em redução na concentração do H_2O_2 com consequente redução nas atividades das enzimas antioxidantes, indicativo de importante papel do NO na tolerância da planta a este metaloide (Singh et al., 2009).

A resposta da peroxidase do ascorbato (APX) à ação tóxica do As ocorreu apenas com 24 h de exposição das plantas a esse metalóide. Sua contribuição para o processo de eliminação de H₂O₂ nas folhas, embora pequena comparativamente, passou a se somar à das outras enzimas CAT e POX. Segundo Mizuno et al. (1998), o acúmulo de níveis tóxicos de H₂O₂ em tecidos vegetais, causados por diferentes tipos de estresses pode resultar em ação combinada da CAT, POX e das APX, no sentido de proteger as células das plantas da ação dos peróxidos.

Trabalhos realizados com exposição de plantas ao cobre (Cuypers et al., 2000) e a outros tipos de estresse, como o hídrico (Srivalli et al., 2003) e salino (Huang et al., 2005) demonstraram a participação da enzima redutase da glutathiona (GR) como parte do sistema de proteção celular aos danos oxidativos. No presente experimento, verificou-se aumento na atividade dessa enzima ao longo do tratamento com As, possivelmente ativada pelo acúmulo de metabólitos oxidantes. De modo similar ao observado para outras enzimas, a aplicação do SNP, como fornecedor de NO, resultou em atenuação do efeito do As sobre a atividade da GR, provavelmente, pela redução da disponibilidade de substrato para a enzima.

Como parte do sistema de proteção contra estresse causado por agentes abióticos, a enzima peroxidase da glutathiona (GPX) tem participação efetiva nas respostas celulares em plantas expostas ao As. O aumento na atividade da GPX observado em plantas de alface expostas ao As foi também encontrado em raízes de *Scenedesmus bijugatus* sob estresse por cobre (Nagalakshmi e Prasad, 2001). A enzima GPX faz parte do grupo de enzimas que combatem o H₂O₂ formado durante o estresse oxidativo, utilizando a glutathiona como fornecedora de elétrons. Entretanto, em função de sua baixa atividade, quando comparada às atividades da CAT e POX, tenha contribuído para a eliminação de apenas pequena fração do H₂O₂ do interior das células.

Um dos maiores obstáculos na pesquisa do radical NO é a exata localização e quantificação de sua formação em extratos ou tecidos de plantas (Sthör e Stremlau, 2006). Isso, entretanto, está se tornando possível graças à utilização de marcadores, como as diaminofluoresceínas (DAFs) (Kojima et al., 1998).

Nas plantas submetidas ao estresse por As, houve maior produção de NO, confirmado pela elevada intensidade de fluorescência. Correlacionando os resultados obtidos, sugere-se que o NO produzido, nesse caso, atua como indutor da atividade de enzimas do sistema antioxidante, atenuando os danos oxidativos. Em plantas tratadas com As e SNP foi observada, também, intensa emissão de fluorescência, indicando elevada concentração de NO. Nesse caso, entretanto, o NO teve participação direta na remoção de ROS, atenuando, de forma mais eficiente, os danos tóxicos do As. Resultados semelhantes foram obtidos por Singh et al. (2009), em que plantas de arroz, também expostas ao As, tiveram aumento na atividade das enzimas antioxidantes.

A maior intensidade de fluorescência observada no parênquima paliçádico de plantas expostas ao As pode estar relacionada ao fato de que o NO, por ser uma molécula gasosa, não ter conseguido se difundir nesse tecido, uma vez que suas células são bem justapostas e, por algum motivo ainda não elucidado, o tratamento com As acumulou NO nessa região.

6) CONCLUSÃO

A exposição da planta de alface ao As resultou em rápida absorção e translocação de As para as folhas desta hortaliça. O aumento de As nos tecidos foliares causou estresse oxidativo com a produção de superóxidos e peróxidos de hidrogênio com aumento concomitante das enzimas antioxidantes, indicando a participação ativa destas enzimas como parte da estratégia que reduz o estresse induzido pelo metaloide. Nas plantas

expostas ao As e SNP, fornecedor exógeno de NO, essas atividades foram reduzidas, possivelmente, devido à ação direta do NO na remoção dos metabólitos tóxicos, não requerendo, portanto, incremento na atividade das enzimas do sistema de proteção antioxidante celular. A técnica de microscopia de fluorescência permitiu a visualização e quantificação da emissão de fluorescência proveniente da maior concentração de NO nos tecidos foliares da planta.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahsan N, Lee DG, Kim KH, Alam I, Lee SH, Lee KW, Lee H, Lee BH (2010) Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere* 78: 224-231

Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue 1331-1341

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

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

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287

Beligni MV, Fat A, Bethke PC, Lamattina L e Jones RL (2002) Nitric Oxide Acts as an Antioxidant and Delays Programmed Cell Death in Barley Aleurone Layers. *Plant Physiology* 129:1642-1650

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:517-529

Bienert GP, Thorsen M, Schüssler MD, Nilsson, HR, Wagner A, Tamás MJ, Jahn TP(2008) A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of $As(OH)^3$ and $Sb(OH)^3$ across membranes. *BMC Biology* 6:26

Boveris A (1984) Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods in Enzymology* 105, 429-435

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254

Bunzl K, Trautmannsheimer M, Schramel P, Reifenhäuser W (2001) Availability of arsenic, copper, lead, thallium, and zinc to various vegetables grown in slag-contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 30: 934-939

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

- Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2:764-775
- Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 23: 458-460
- Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H (2000) Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedling during the early stages of metal assimilation. *Physiologia Plantarum* 110:512-517
- Darley-Usmar VM, Patel RP, O'Donnell VB, Freeman BA (2000) Antioxidant Actions of Nitric Oxide. In: Ignarro LJ, *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* 265-276
- Del Longo OT, González A, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiology* 34:1023-1028
- Delledonne M, Xia YJ, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588
- Elstern EF (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Pelland EJ, Steffen KL (Eds). *Active Oxygen/Oxidative Stress in Plant Metabolism* Rockville: American Society of Plant Physiology 13-25
- Farid ATM, Roy KC, Hossain KM, Sen R (2003) A study of arsenic contaminated irrigation water and its carried over effect on vegetable. BUET-UNU International Symposium of Fate of Arsenic in the Environment. Dhaka, Bangladesh, <http://www.unu.edu/env/Arsenic/Dhaka2003/08-Farid.pdf>
- Fernandes E, Costa D, Toste SA, Lima JLFC, Reis S (2004). In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Radical Biology & Medicine* 37: 1895–1905
- Ferreira DF (1999) SISVAR - Sistema de análises estatísticas. Versão 4.3. Lavras: UFLA
- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133:21-25
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum* 100: 241-254
- Gay C, Gebicki JM (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry* 284:217-220
- Geoffroy L, Teisseire H, Couderchet M, Vernet G (2002) Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72: 178-185
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases. *Plant Physiology* 59:309-14

- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in biotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930
- Gille G, Sigler K (1995) Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiologica* 40: 131-152
- Gunes A, Inal A, Bagci EG, Pilbeam DJ (2007) Silicon mediated changes of some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach and tomato grown in sodic-B toxic soil. *Plant Soil* 290:103-114
- Gunes A, Pilbeam DJ, Inal A (2009) Effect of arsenic–phosphorus interaction oxidative stress in chickpea plants. *Plant Soil* 314:211-220
- Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS, Cambraia J (2011) Nutrição mineral e regulação enzimática ao estresse oxidativo induzido por arsenato e arsenito em plantas de alface. (dissertação)
- Halbach, O (2003) Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide Biology Chemistry* 9: 217-228
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. *Biochemistry Journal* 219: 1-14
- 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
- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84: 450-455
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198
- Huang C, He W, Guo J, Chang X, Su P, Zhang L (2005) Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Journal of Experimental Botany* 56: 3041-3049
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319
- Kertulis GM, Ma LQ, MacDonald GE, Chen R, Winefordner JD, Cai Y (2005) Arsenic speciation and in *Pteris vittata* L. and the effects on phosphorus in the xylem sap. *Environmental and Experimental Botany* 54: 239-247
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry* 70:2446-2454

- Koshiha T (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase 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
- Lee DH, Kim YS, Lee CB (2001) The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* 158:737-745
- Lee SH, Ahsan N, Lee KW, Kim DH, Lee DG, Kwak SS, Kwon SY, Kim TH, Lee BH (2007) Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology* 164:1626-1638
- Maathuis FJM (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12:250-258
- Magalhães JR, Monte DC, Durzan D (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology Molecular Plants* 6:117-127
- Malan C, Gregling MM, Gressel J (1990) Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Science*, 69:157-166
- 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
- Meier S, Madeo L, Ederli L, Donaldson L, Pasqualini S, Gehring C (2009) Deciphering cGMP signatures and cGMP-dependent pathways in plant defence. *Plant Signaling and Behavior* 4:307-309
- Mishra S, Jha AB, Dubey RS (2010) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma* 248 (3): 565- 577
- Misra HP, Fridovich I (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *The Journal of Biological Chemistry* 246:6886-6890
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem FV (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9:490-498
- Mittler, R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410
- Mizuno M, Kamei M, Tsuchida H (1998) Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *Biochemistry Molecular Biology International* 44:717-725

- Mohammadi M, Karr AL (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *Journal of Plant Physiology* 158:1023-1029
- Mulabagal V, Ngouajio M, Nair A, Zhang Y, Gottumukkala AL, Nair MG, (2010) In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chemistry* 118:300-306
- Mur LAJ, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJM, Prats E (2011) Methods of nitric oxide detection in plants: A commentary. *Plant Science* 181: 509– 519
- Murgia I, Pinto MC, Delledonne M, Soavea C, Gara L (2004) Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *Journal of Plant Physiology* 161:777-783
- Nagalakshmi N, Prasad MNV (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science* 160:291-299
- Nagano, T (1999) Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* 14: 283-290
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22:867-880
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5:388-395
- 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
- Peixoto PHP, Pimenta DS, Antunes F. (2005) Efeitos do flúor em folhas de plantas aquáticas de *Salvinia auriculat*. *Pesquisa agropecuária brasileira* 40: 727-734
- Pinheiro R, Belo I, Mota M (2002) Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 842-847
- Prasad KVSK, Sarandhi PP, Sharmila P (1999) Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany* 42:1-10
- Prasad MNV, Rengel Z (1998) Plant acclimation and adaptation to natural and anthropogenic stress. *Annual New York Academy of Science* 851: 216-223
- 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, Kitajima N, Sugawara R, Kondo T, Alam S, Huq SMI, Kawai S(2008a) Critical toxicity level of arsenic and elemental composition of arsenic-induced chlorosis in hydroponic sorghum. *Water, Air and Soil Pollution* 191:279-292

Shaibur MR, Kitajima N, Sugawara R, Kondo T, Huq SMI, Kawai S(2008b) Physiological and mineralogical properties of arsenic-induced chlorosis in barley seedlings grown hydroponically. *Journal of Plant Nutrition* 31:333-353

Shaibur MR, Huq SMI, Kawai S (2008c) Arsenic–iron interaction: Effect of additional iron on arsenic induced chlorosis in hydroponic rice. *Proceedings of the International Conference on Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry*. Sapporo, Japan: Hokkaido University Conference Hall

Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi K, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, RakeshTuli (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1102-1110

Singh HP, Batish DR, Kaur G, Arora K, Kohli RK (2008) Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environmental and Experimental Botany* 63:158-167

Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP, Sharma N, Kohli RK (2009) Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* 20:289-297

Srivalli B, Sharma G, Khanma-Chopra R (2003) Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum* 119:503-512

Sthör C, Stremlau S (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 57(3): 463-470

Stoeva N, Bineva T (2003) Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Journal Plant Physiology* 29:87-95

Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJM (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology* 25:156-165

Tsugane K. et al (1999) A recessive Arabidopsis mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell* 11: 1195-1206

Valentovičová K, Halušková L, Huttová J, Mistrík I, Tamás L (2010) Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips. *Journal of Plant Physiology* 167:10-14

Wang C, Zhang SH, Li W, Wang PF, Li L (2011) Nitric oxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:67-73

Wang H, Huang J, Bi YB (2010) Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Science* 179:281-288

Wang PG, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T, Janczuk AJ (2002) Nitric Oxide Donors: Chemical activities and biological applications. *Chemical Reviews* 102:1091-1134

Wang X, Li J, Liu J, He W, Bi Y (2010) Nitric oxide increases mitochondrial respiration in a cGMP-dependent manner in the callus from *Arabidopsis thaliana*. *Nitric Oxide* 23: 242-250

Wang YS, Yang GM (2005) Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiology* 46: 1915-1923

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

Williams PN, Islam MR, Adomako EE, Raab A, Hossain SA, Zhu YG, Feldmann J, Meharg AA (2006) Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters. *Environmental Science and Technology* 40:4903-4908

Wink DA, Mitchell JB (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 25:434-456

Yao D, Vlessidis AG, Evmiridis NP (2004) Determination of nitric oxide in biological samples. *Microchimica Acta* 147: 1-20

Yu CC, Hung KT, Kao HC (2005) Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH₄⁺ accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology* 162:1319-1330

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* 61:535-559