

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**PAPEL DE DIFERENTES FONTES DE SELÊNIO EM ASPECTOS FISIOLÓGICOS
DE PISTIA STRATIOTES SUBMETIDA A ESTRESSE POR AS**

Pedro Henrique Santos Neves
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

PEDRO HENRIQUE SANTOS NEVES

**PAPEL DE DIFERENTES FONTES DE SELÊNIO EM ASPECTOS FISIOLÓGICOS
DE PISTIA STRATIOTES SUBMETIDA A ESTRESSE POR AS**

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*.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira

Coorientadores: Fernanda D S Farnese
Vinícius Melo da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

N518p
2024

Neves, Pedro Henrique Santos, 1994-
Papel de diferentes fontes de selênio em aspectos
fisiológicos de *Pistia stratiotes* submetida a estresse por arsênio /
Pedro Henrique Santos Neves. – Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (99 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2024.
Referências bibliográficas: f. 90-99.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.804>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Pistia stratiotes* - Fisiologia. 2. Estresse oxidativo.
3. Fitorremediação. 4. *Pistia stratiotes* - Efeito do arsênio.
I. Oliveira, Juraci Alves de, 1965-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 584.64

PEDRO HENRIQUE SANTOS NEVES

**PAPEL DE DIFERENTES FONTES DE SELÊNIO EM ASPECTOS FISIOLÓGICOS
DE PISTIA STRATIOTES SUBMETIDA A ESTRESSE POR AS**

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

APROVADA: 5 de setembro de 2024.

Assentimento:

Pedro Henrique Santos Neves
Autor

Juraci Alves de Oliveira
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pelo autor em 03/12/2024 às 21:47:03 e pelo orientador em 03/12/2024 às 22:14:21. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **VJSK.GTY9.CZC4** e clique no botão 'Validar documento'.

A Valdir Alves das Neves e Palmira Pereira das Neves, pelo amor, carinho e sacrifício em prol do meu sucesso. A Laís Frattini, minha esposa, pelo companheirismo, dedicação e força por toda a caminhada.

Dedico este Trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que nunca me desamparou e, com a fé que deposito nele, concluo essa etapa na minha vida.

Aos meus familiares: tio(a)s, primo(a)s, irmãs, em especial minha avó Palmira, meu avô Valdir, minha mãe Cátia e minha tia Rose, que por muitas vezes abriram mão dos seus sonhos e desejos para que eu pudesse realizar o meu, por isso essa conquista é mais de vocês do que minha. Aos colegas do Laboratório de Biofísica Ambiental: Ana Júlia, Aristides, Daniel, Darlielva, Esneider, Guilherme, Vitor; e a Técnica do Laboratório, Taline, que entraram nessa empreitada comigo e não pouparam esforços para me ajudar.

À minha companheira de vida e esposa Laís Neves Frattini, com quem tive o prazer de dividir o laboratório durante a pesquisa e agora a vida. Nada daria tão certo se não fosse pela sua presença e encorajamento. A partir da sua chegada em minha vida, tudo passou a acontecer da melhor forma possível. Serei eternamente grato pelo seu carinho, amor, compreensão e ajuda.

Ao meu orientador, e padrinho de casamento, Professor Juraci Alves de Oliveira que, desde a minha chegada em Viçosa, fez de tudo para que eu me sentisse em casa.

Ao meu coorientador e amigo, Vinícius Melo, que além de orientar academicamente, sempre me deu bons conselhos.

À UFV, pela infraestrutura física e de pessoal, sem os quais esse trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

Às minhas amigas “Os PAIAS” que, mesmo de longe, sempre torceram por minhas vitórias e constituem parte fundamental para o meu sucesso.

Agradeço aos meus amigos dos grupos: Taça Suco Gummy, NFL do Caos e Tropa do Pé de Pano, pelo apoio e confiança.

Agradeço ao CNPq pela bolsa e fomento à pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

NEVES, Pedro Henrique Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2024. **Papel de diferentes fontes de selênio em aspectos fisiológicos de *Pistia stratiotes* submetida a estresse por As.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientadores: Fernanda Dos Santos Farnese e Vinícius Melo da Silva.

SANTOS-NEVES, Pedro Henrique, Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. Papel de diferentes fontes de selênio em aspectos fisiológicos de *Pistia stratiotes* submetida a estresse por As. Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Embora represente uma operação com grande impacto econômico e social na fabricação de bens de consumo e de geração de emprego, a mineração é a causa de inúmeras contaminações ambientais, seja pela deposição inadequada de resíduos, que podem conter metais pesados e metaloides, como o As, ou até mesmo pelo rompimento de barragens que podem atingir os cursos d'água, vegetações e locais habitados. Uma das alternativas para a redução das concentrações de elementos tóxicos em corpos hídricos contaminados é a fitorremediação, técnica que utiliza plantas tolerantes e/ou acumuladoras para remover o contaminante do local. Trabalhos têm demonstrado a capacidade da macrófita aquática flutuante *Pistia stratiotes* em atuar na redução de resíduos tóxicos em meios aquáticos. Entretanto, a eficiência do processo é limitada pela ação desses poluentes, quando em concentrações elevadas, sobre o metabolismo vegetal. Algumas substâncias podem ser utilizadas para aumentar essa capacidade fitorremediadora, como o selênio (Se), o qual pode atenuar os danos celulares causados pela presença de elementos tóxicos, por meio da redução da absorção e ativação do sistema antioxidante. A indução desses mecanismos de tolerância pode utilizar o processo de rustificação, o qual consiste em manter as plantas, previamente à exposição aos poluentes, em determinadas concentrações do selênio. Embora a maioria dos trabalhos com Se abordem apenas os efeitos benéficos desse elemento, nossos resultados demonstraram que, em concentrações acima das consideradas ótimas e por períodos prolongados de exposição, podem ocorrer danos irreversíveis para as plantas, sendo considerado, nesse caso, um agente promotor de estresse oxidativo. Entretanto, quando em dosagem adequada, o Se foi responsável pela melhoria e aumento da capacidade antioxidante do vegetal, bem como pelo aumento da taxa de crescimento relativo e de pigmentos fotossintéticos. Esses resultados demonstram que plantas tratadas previamente com concentrações adequadas de Se podem ter a sua capacidade fitorremediadora aumentada. Após a definição das

concentrações ótimas e do tempo de exposição adequado ao Se com fontes de selenito e selenato (2 μM por 5 dias), que tiveram como objetivo induzir processo de rustificação das plantas, aperfeiçoando mecanismos de tolerância ao estresse, as plantas foram expostas a concentrações tóxicas de As, por 3 dias. Nossos resultados indicaram que, após o processo de rustificação com Se, plantas de *P. stratiotes* conseguiram tolerar o estresse causado pelo metaloide. O tratamento prévio com Se foi capaz de atenuar a maioria dos danos causados pelo estresse oxidativo desencadeado pela exposição ao As. Entre os principais resultados destacam-se a capacidade antioxidante enzimática que foi aprimorada, além disso, pela afinidade química com o enxofre, o sistema antioxidante não enzimático também foi melhorado, sobretudo o ciclo dos tióis, tudo isso impulsionado pela nutrição mineral mais robusta proporcionada pelo tratamento prévio com Se. Tais melhorias contribuíram para a redução da formação de espécies reativas de oxigênio e dos danos moleculares. Sendo assim, a exposição prévia ao Se, seja na forma de selenato ou selenito, se apresenta como tecnologia promissora a ser empregada em processos de fitorremediação, tornando-a mais eficaz.

Palavras-chave: estresse oxidativo; fitorremediação; rustificação; tolerância

ABSTRACT

NEVES, Pedro Henrique Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2024. **Role of different selenium sources in physiological aspects of Pistia stratiotes maintained arsenic stress.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisers: Fernanda Dos Santos Farnese and Vinícius Melo da Silva.

SANTOS-NEVES, Pedro Henrique, Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. Role of different selenium sources in physiological aspects of Pistia stratiotes maintained arsenic stress. Advisor: Juraci Alves de Oliveira

Although it represents an operation with a great economic and social impact in the manufacture of consumer goods and job creation, mining is the cause of numerous environmental contaminations, whether due to the inadequate disposal of waste, which may contain heavy metals and metalloids, such as arsenic (As), or even by the breaking of dams that can reach the watercourse, vegetation and inhabited places. One of the alternatives for reducing the concentrations of toxic elements in contaminated water bodies is phytoremediation. This technique uses tolerant plants and/or accumulators to remove contaminants from the site. Studies have demonstrated the capacity of the aquatic macrophyte Pistia stratiotes to act in the reduction of toxic residues in aquatic environments. However, the efficiency of the process is limited by the action of these pollutants, when in high concentrations, on plant metabolism. Some substances can increase this phytoremediation capacity, such as selenium (Se), which can attenuate cell damage caused by toxic elements, by reducing absorption and activating the antioxidant system. The induction of these tolerance mechanisms can use the hardening process, which consists of keeping the plants, before exposure to pollutants, at specific selenium concentrations. Although most works with Se only address the beneficial effects of this element, our results demonstrated that, in concentrations above those considered optimal and for prolonged periods of exposure, irreversible damage to plants could occur, being considered, in this case, an agent promoter of oxidative stress. However, when in optimum dosage, Se was responsible for improving and increasing the plant's antioxidant capacity, as well as increasing the relative growth rate and photosynthetic pigments. These results demonstrate that plants previously treated with adequate concentrations of Se can have their phytoremediation capacity increased. After defining the optimal concentrations and adequate exposure time to Se, a source of selenite and selenate (2 μ M for 5 days), which aimed to induce the plant's hardening process, improving stress tolerance mechanisms, the plants were exposed to toxic concentrations of As for 3 days. Our results indicate that, after the

hardening process with Se, *P. stratiotes* plants could tolerate the stress caused by the metalloid. The previous treatment with Se was able to attenuate most of the damage caused by the oxidative stress triggered by exposure to arsenic. Among the main results, the enzymatic antioxidant capacity was enhanced, in addition, due to the chemical affinity with sulfur, the non-enzymatic antioxidant system was also improved, especially the thiol cycle, all of this driven by the more robust mineral nutrition provided by the previous treatment with Se. Such improvements contributed to reducing the concentrations of reactive oxygen species and molecular damage. Therefore, prior exposure to Se, whether in the form of selenate or selenite, appears to be a promising technology for use in phytoremediation processes, making them more effective.

Keywords: oxidative stress; phytoremediation; hardening; tolerance

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	10
Hipótese.....	12
Objetivos.....	12
Geral.....	12
Específicos.....	12
CAPÍTULO I: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DE <i>Pistia stratiotes</i> SUBMETIDAS AO SELÊNIO.....	13
1. Introdução.....	13
2. Material e Métodos.....	14
3. Resultados.....	21
4. Discussão.....	58
5. Conclusão.....	63
CAPÍTULO II: POTENCIAL FITORREMEIADOR DE <i>Pistia stratiotes</i> FORTIFICADAS COM DIFERENTES FONTES DE SELÊNIO E SUBMETIDAS A ESTRESSE POR ARSÊNIO.....	64
1. Introdução.....	64
2. Material e Métodos.....	66
3. Resultados.....	73
4. Discussão.....	83
5. Conclusão.....	89
Referências.....	90

Introdução Geral

A mineração é uma das atividades industriais mais importantes e lucrativas do país, sendo crucial para manter o saldo da balança comercial brasileira positiva. As principais áreas de atuação encontram-se em Minas Gerais, que contribuiu, em 2022, com 40,2% do saldo das atividades mineradoras de todo o país (IBRAM, 2022). Contudo, a exploração minerária gera resíduos tóxicos, constituídos, basicamente, de elementos metálicos. A liberação de compostos de Arsênio (As) para o meio aquático, sobretudo da mineração de ouro, tem se constituído motivo de enorme preocupação, não somente pelo elevado risco toxicológico, mas, também, pela facilidade em atingir os diversos níveis tróficos, num processo de biomagnificação.

O As é naturalmente associado aos solos e rochas, na forma de arsenopiritas, que, por ações antrópicas, é liberado no ambiente e facilmente disperso no sistema aquático (Kumar et al., 2015). Devido à elevada toxicidade, faz-se necessária a remoção do As do ambiente aquático, o que pode ocorrer pela utilização de diversas tecnologias, dentre as quais, a fitorremediação. Neste processo, as espécies de plantas aquáticas empregadas devem ser capazes de acumular e tolerar a presença do poluente, sem significativas alterações no seu metabolismo e sobrevivência. Nesse contexto, a espécie *Pistia stratiotes* apresenta potencial como agente biorremediador de ambientes contaminados com As (Farnese et al., 2014b).

Algumas substâncias atuam como agentes estimulantes das respostas de tolerância das plantas aos estresses abióticos, como o óxido nítrico (Farnese et al., 2014a), o jasmonato (Coelho et al., 2020) e o silício (Santos-Neves et al. 2020, dados não publicados), que podem atuar em associação aos mecanismos existentes para mitigar os danos tóxicos causados pelos poluentes. Nesse grupo de agentes indutores inclui-se o selênio (Se), o qual está sendo estudado como possível agente atenuador de estresse por induzir alterações morfofisiológicas em plantas que, em último nível, elevam a tolerância a estresses abióticos (Feng et al., 2021; Hasanuzzaman et al., 2020; Pandey e Gupta, 2018).

Os efeitos benéficos do Se na redução do estresse, e dos possíveis danos oxidativos, são conhecidos em diversas espécies vegetais, mas, em espécies aquáticas os estudos são, ainda, incipientes. A suplementação mineral com Se é capaz de reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio por meio do estímulo e aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante (Han et al., 2015; Hasanuzzaman et al., 2020; Pilon-Smits, 2015; Pilon-Smits e Quinn, 2010; Rizwan et al., 2020; Schiavon e Pilon-Smits, 2017).

O Se é um análogo do enxofre, o qual pode ser substituído para formar grupos -SeH (selenol), ao invés de -SH (tiol). O grupo selenol tem afinidade maior com alguns elementos metálicos, como o cádmio (Cd), formando complexos de Cd-SeH, os quais são armazenados no vacúolo e, assim, reduzem os danos causados às células e tecidos (Feng et al., 2021; Wan et al., 2016).

A compartimentalização dos metais na parede celular e no vacúolo reduzem a toxicidade e fazem parte dos mecanismos de tolerância, reduzindo o estresse oxidativo. Ojeda e colaboradores (2013) demonstraram que a aplicação simultânea de Cd e selenito, resultou em maiores acúmulos de Cd e Se na fração da parede celular. Complementarmente, plantas de arroz expostas ao As e Se aumentaram a síntese de glutathione e de fitoquelatinas, moléculas envolvidas na inativação de metais (Kumar et al., 2016).

Para aumentar a tolerância ao As, o Se pode ser fornecido na forma salina, mais comum, ou em nanopartículas (Se-NPs). A forma de Se-NPs, inclusive, foi objeto de um levantamento feito por Zhou e colaboradores (2021), em que o número de publicações relevantes nos últimos dez anos no banco de dados Web of Science (WoS), com tópicos de “solo contaminado com metais pesados ou estresse por metais pesados ou solo com poluição por metais pesados”, “planta ou botânica” e “nano ou nanomateriais ou nanopartícula ou NP” aumentaram exponencialmente, passando de 2, em 2010, para quase 40, em 2020.

Estudos relacionados à tolerância das plantas às condições de poluentes presentes no meio são determinantes para definir ações de remediação, especialmente quando se trata de poluentes com elevado grau de toxicidade, como o As. A utilização da “rustificação”, técnica que consiste da exposição prévia a determinados tratamentos com intuito de superexpressar características desejáveis, aparece como uma técnica promissora.

Pesquisas sobre a atuação do Se em plantas aquáticas em condições de ambientes contaminados por As tornam-se relevantes, no sentido de elucidar como esse elemento pode atuar na ativação de mecanismos de tolerância das plantas expostas ao As.

Hipótese

O selênio aplicado no processo de rustificação das plantas de *P. stratiotes* induz alterações fisiológicas que resultam no aumento da tolerância ao estresse por As, tornando-as mais eficazes no processo de fitorremediação.

Objetivos**Geral**

Avaliar o papel desempenhado pelo Se nas respostas bioquímicas e fisiológicas da macrófita aquática *P. stratiotes* exposta a diferentes concentrações de As.

Específicos

- Entender como as diferentes formas químicas do Se (selenito e selenato) afetam a fisiologia de *P. stratiotes*;
- Avaliar o papel desempenhado pelo Se na absorção e acúmulo de As em *P. stratiotes*;
- Avaliar as alterações bioquímicas e fisiológicas induzidas por Se que culminem no aumento da tolerância de *P. stratiotes* ao As.

CAPÍTULO I: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DE *PISTIA STRATIOTES* SUBMETIDAS AO SELÊNIO.

1. Introdução

Os teores de selênio (Se) em plantas estão diretamente relacionados com a concentração desse elemento nos solos, refletindo da mesma forma em animais e seres humanos, consumidores de vegetais (Martinez et al., 2009; Steffan et al., 2019). Por se tratar de elemento essencial à saúde humana, tem se tornado comum a suplementação com Se, via adubação no solo ou foliar, para espécies vegetais cultivadas (Boldrin et al., 2012; El-Ramady et al., 2020), conforme relatado em culturas de cereais(), vegetais folhosos() e frutas() (Golubkina et al., 2017; Leija-Martínez et al., 2018; Lyons, 2018; Mimmo et al., 2017).

O Se não é considerado um elemento essencial às plantas, pois não atende aos critérios de essencialidade preconizados por Arnon e Stout (1939). Contudo, para algumas espécies cultivadas, como o arroz, é classificado como elemento benéfico, uma vez que pode compensar o efeito tóxico de outros elementos ou substituir o enxofre (S) em funções menos específicas (Taiz et al., 2017). Assim como o S, o Se apresenta 4 estados de oxidação: seleneto (Se^{-II}), selênio elementar (Se^0), selenito (Se^{IV}) e selenato (Se^{VI}), sendo os dois últimos mais comuns no ambiente.

Após a absorção, o selenato e o selenito, são convertidos em formas orgânicas, como a selenometionina (SeMet), selenocisteína (SeCys) ou metilselenocisteína (MeSeCyz) (Hu et al., 2019; Pilon-Smits, 2015; Pilon-Smits e Quinn, 2010)

Do ponto de vista vegetal, a suplementação de Se, em baixas concentrações, favorece o crescimento, ganho de biomassa, além de contribuir para mitigar estresses abióticos, modulando alterações morfofisiológicas na planta (Feng et al., 2021; Hasanuzzaman et al., 2020; Pilon-Smits, 2015). Essas alterações envolvem a regulação na produção de hormônio, como auxina e etileno, de modo a remodelar a arquitetura das raízes e limitar a absorção de metais pesados (Feng et al., 2021; Qin et al., 2018; Wu et al., 2017; Zhao et al., 2019). Isso ocorre devido às alterações nas propriedades da parede celular, com maior produção de celulose, hemicelulose e lignina, aumentando a espessura da parede celular e dificultando a passagem dos metais pesados para o interior celular (Ding et al., 2015; Zakir Hossain et al., 2006).

A participação do Se como agente atenuador de estresses abióticos envolve a indução de enzimas do sistema antioxidante, as quais atuam removendo espécies reativas de oxigênio; a síntese de fitoquelatinas, importante molécula para quelação e imobilização de metais pesados (Cao et al., 2013; Liu et al., 2014; Morales-Espinoza et al., 2019; Rizwan et al., 2020)

e, por ser análogo ao S, induz a formação de compostos –SeH, que complexam e inativam metais pesados (Feng et al., 2021; Wan et al., 2016).

Embora seja bastante empregado como agente benéfico a fim de aumentar a capacidade antioxidante, quando em concentrações supra ótimas, o Se pode atuar como fonte de estresse para o vegetal, resultando em desequilíbrio na geração de espécies reativas de oxigênio, o que ocasiona danos em membranas, proteínas e organelas que, em última instância, podem levar o vegetal à morte. A selenose, ou toxicidade por selênio, pode ser expressa por dois mecanismos bem distintos: 1) malformação de selenoproteínas; 2) indução de estresse oxidativo (Germ et al., 2007; Gupta e Gupta, 2017; Hasanuzzaman et al., 2020; Lv et al., 2021; Pilon-Smits, 2015).

Sendo assim, este trabalho tem por objetivo, elucidar o conhecimento sobre as concentrações adequadas de suplementação de Se e demonstrar como ela é determinante para que uma espécie vegetal possa expressar a sua capacidade de tolerância a agentes estressores do ambiente e, dessa forma, potencializar a sua participação em processos de fitorremediação.

2. Material e Métodos

Obtenção do material vegetal e aclimação

Espécimes de *P. stratiotes* (Araceae) foram coletadas no lago do horto botânico da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil), desinfetadas com hipoclorito de sódio 1% (v/v) durante 1 min, lavadas em água corrente e transferidas para solução nutritiva de Clark (1975), ½ força iônica, pH 6,5, onde permaneceram em sala de crescimento de plantas, com intensidade luminosa, temperatura e fotoperíodo controlados ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 ± 2 °C, 12/12 h claro/escuro), por 5 dias, para aclimação às condições experimentais.

Aclimação e aplicação dos tratamentos

Após o período de aclimação, as plantas foram transferidas para recipientes contendo 0,5 L de solução nutritiva de Clark, nas mesmas condições descritas anteriormente, com os tratamentos (selenito de sódio e selenato de sódio) representados na Figura 1.

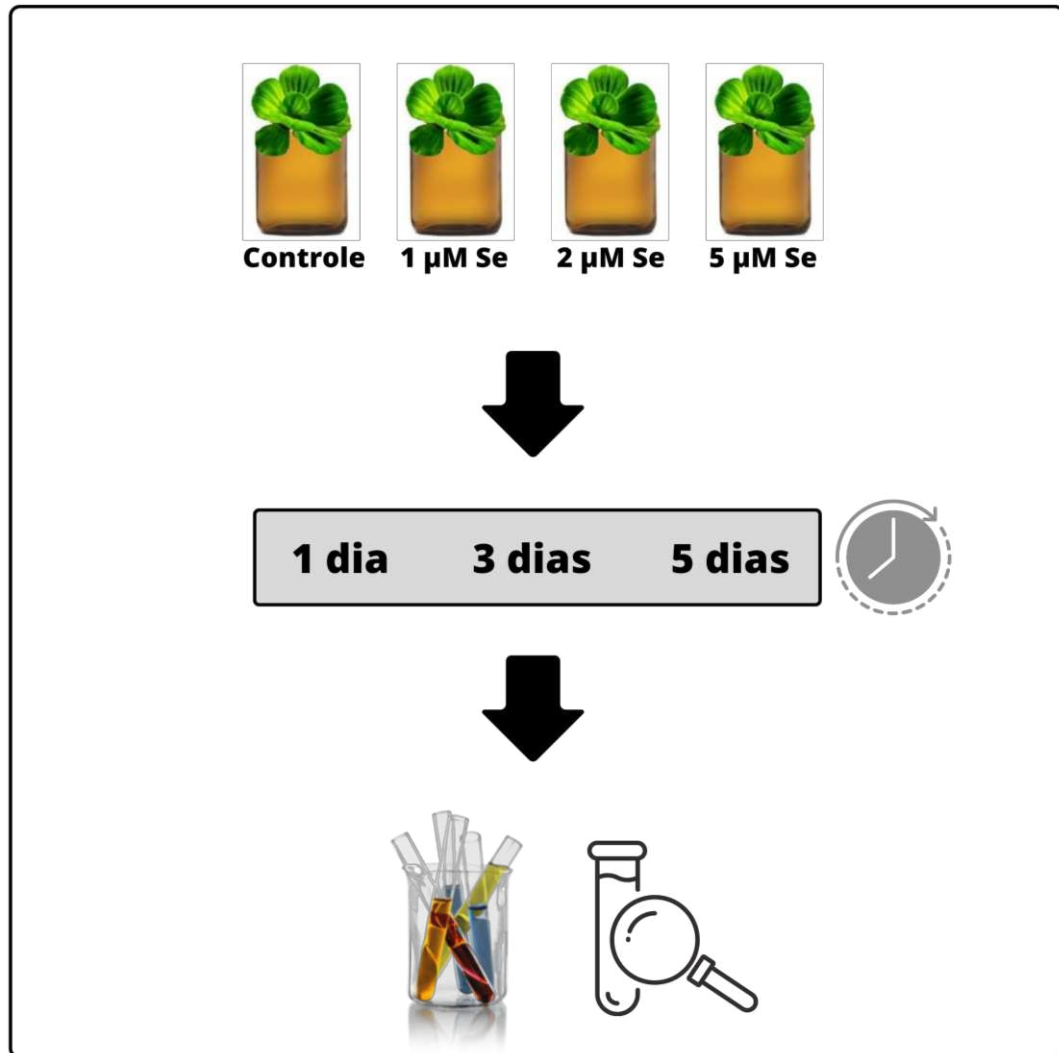


Figura 1. Distribuição dos tratamentos experimentais: concentrações e tempo de exposição de *Pistia stratiotes* a fontes distintas de selênio.

Ao final dos períodos de exposição, amostras frescas de folhas (terço médio e totalmente expandidas) e de raízes foram coletadas e mantidas em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até realização das análises de MDA, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e pigmentos fotossintéticos. Para as demais análises, o material vegetal foi liofilizado, por 96 h até obtenção de peso constante, utilizando o equipamento VirTis® Benchtop 4KBTXL.

Desenho experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo fatorial 3×4 onde representam, respectivamente os dias de exposição ao Se (1, 3 e 5 dias) e as concentrações de Se (0 -controle, 1, 2, 5 μM – Selenito e Selenato) com 4 repetições e cada unidade experimental constituída de 1 planta/repetição. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a

5% de probabilidade, por meio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2014) com auxílio do pacote ExpDes.pt.

Os resultados descritos foram avaliados do ponto de vista da análise fatorial, onde foi verificado a existência de interação entre os tratamentos doses de selênio e o tempo de exposição da planta ao elemento. Quando foi verificado estatisticamente a interação dos tratamentos, o efeito da dose em cada tempo, e o efeito do tempo em cada dose foram avaliados em conjunto. Não havendo interação entre os tratamentos, o efeito da dose de selênio e do tempo de exposição, foram avaliados separadamente.

Determinação da concentração dos elementos minerais

Amostras frescas de raízes e folhas foram coletadas, lavadas em água destilada e mantidas em estufa, a 80 °C, até obtenção de massa seca constante. O material seco foi, então, mineralizado em mistura de ácido nítrico e perclórico (2:1) (Marin et al., 1993) e os teores de Se e S, nos extratos minerais foram determinados por espectrofotometria de emissão atômica, com plasma indutivamente acoplado (ICP - PerkinElmer® modelo Optima 8300), para os tratamentos contendo 2 e 5 µM, com 1 e 5 dias de exposição, a fim de avaliar a dinâmica de absorção e distribuição desses minerais.

Sintomatologia Visual

Após aplicação e exposição aos tratamentos, com auxílio de uma prancha com material escuro, fotos dos vegetais foram tiradas para visualização e comparação dos efeitos dos tratamentos em folhas e raízes.

Ganho relativo de biomassa fresca

Após o período de aclimação e de tratamento, as plantas foram secas em papel absorvente e pesadas em balança analítica para obtenção do peso fresco inicial e peso fresco final. A partir desses dados, o ganho relativo de biomassa fresca de cada planta, em seus respectivos tratamentos, foi calculado através da equação:

$$GRBF = (\ln_{m1} - \ln_{m0} / t_1 - t_0) \times 1000$$

Em que:

GRBF = ganho relativo de biomassa fresca no período (mg g⁻¹ MF dia⁻¹);

ln_{m1} e ln_{m0} representam o logaritmo neperiano da massa fresca (g) no final e no início do experimento, respectivamente;

t₁ e t₀ representa a duração do experimento, em dias.

Pigmentos Fotossintéticos

A extração dos pigmentos fotossintéticos foi feita a partir de três discos foliares de 1 cm de diâmetro, obtidos da folha mais jovem completamente expandida, e incubados em 5 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO - saturado por carbonato de cálcio), em tubos do tipo “penicilina”, devidamente tampados e revestidos com papel alumínio, onde ficaram por 24 horas para, em seguida, serem levados ao banho-maria a 65 °C por 45 minutos, para solubilização dos pigmentos. Após esse período, procedeu-se as leituras da absorbância nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm. As leituras obtidas foram utilizadas para a estimativa dos teores de clorofila *a*, *b* e de carotenoides totais (Wellburn, 1994), e os resultados expressos em mg g⁻¹ MF.

$$\text{Clorofila } a = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649})$$

$$\text{Clorofila } b = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665})$$

$$\text{Carotenoides} = [(1000 \times A_{480}) - (1,29 \times Ca) - (53,78 \times Cb)]/220$$

Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido

A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi estimada utilizando-se amostras de 200 mg de folhas e raízes, homogeneizadas em meio de extração (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM) e centrifugadas a 10.000 xg, por 15 minutos, a 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo FeNH₄SO₄ 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000) e mantidas no escuro por 30 minutos. As concentrações de H₂O₂, estimadas com base em curva analítica e leitura de absorbância a 560 nm, foram expressas em µmol de H₂O₂ g⁻¹ MF.

Para determinação da concentração de ânion superóxido (O₂⁻), amostras de 50 mg de folhas e raízes foram incubadas em meio de reação constituído de sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100 µM, NADH 20 µM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). A reação se iniciou com a adição de 100 µL epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 min, seguido de leitura da absorbância a 480 nm, durante 5 minutos. A quantificação da concentração de O₂⁻ utilizou-se o coeficiente de absorvidade molar de 4,0 x 10³ M⁻¹ cm⁻¹, sendo expressas em nmol de O₂⁻ g⁻¹ MF (Boveris et al., 2002).

Determinação do acúmulo de MDA via TBARS

Na avaliação da peroxidação lipídica, por meio da concentração de malondialdeído (MDA), amostras de 150 mg de folhas e raízes foram maceradas em 2 mL de etanol 80% e

centrifugadas a 10.000 xg, por 10 minutos. Ao sobrenadante, seguiu-se adição de solução com ácido tiobarbitúrico 0,65% (p/v) em TCA 20% (p/v) e de solução contendo apenas TCA 20 % (p/v), seguindo de incubação a 95°C, por 30 minutos, e banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura das absorvâncias a 440, 532 e 600 nm. A concentração de MDA-TBA, expressa em $\mu\text{mol de MDA g}^{-1} \text{ MF}$ (Hodges et al., 1999), foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$1) [(A_{532+\text{TBA}}) - (A_{600+\text{TBA}}) - (A_{532-\text{TBA}} - A_{600-\text{TBA}})] = X$$

$$2) [(A_{440+\text{TBA}} - A_{600+\text{TBA}}) 0,0571] = Y$$

$$3) \text{MDA (nmol mL}^{-1}\text{)} = (X - Y/157.000) \times 10^6.$$

Avaliação de enzimas do sistema antioxidante

Para determinação das atividades enzimáticas, amostras de 0,03 g folhas e raízes foram maceradas em moinho de bolas e homogeneizadas nos seguintes meios de extração:

- **(SOD)** dismutases do superóxido, **(POX)** peroxidases e **(CAT)** catalases: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (Peixoto et al., 1999);
- **(APX)** peroxidases do ascorbato: tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1,0 mM, ácido ascórbico (AA) 1,0 mM, PMSF 1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM e PVPP 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999).

Após centrifugação a 12.000 xg, por 15 min, a 4°C, os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto e as atividades enzimáticas foram determinadas pela adição do extrato aos seguintes meios de reação:

- SOD: tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM (Giannopolitis e Ries, 1977; Peixoto et al., 1999);
- POX: tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol mM e H_2O_2 2 mM (Peixoto et al., 1999);
- CAT: tampão fosfato de potássio 50 mM, H_2O_2 12,5 mM (Peixoto et al., 1999);
- APX: tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H_2O_2 1 mM (Peixoto et al., 1999).

Para a determinação da atividade da SOD, as amostras foram mantidas em câmara com iluminação artificial, por 5 minutos, e a absorvância determinada a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a

fotorredução do NBT, sendo expresso em U SOD $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína (Giannopolitis e Ries, 1977).

A atividade da POX foi estimada pela leitura da absorbância a 420 nm, durante cinco minutos de reação, utilizando o coeficiente de extinção molar $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Peixoto et al., 1999), sendo expressa em μmol purpurogalina $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da CAT foi estimada pela leitura da absorbância a 240 nm, durante cinco minutos de reação, utilizando o coeficiente de extinção molar $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Peixoto et al., 1999), sendo expressa em $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da APX foi estimada pela leitura da absorbância a 290 nm, durante cinco minutos de reação, utilizando o coeficiente de extinção molar $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Peixoto et al., 1999), e expressa em $\mu\text{mol AsA min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas, para expressão das atividades enzimáticas específicas, seguiu-se o método proposto por Bradford (1976). Em 100 μL do extrato enzimático bruto, adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford e, após 15 min de reação no escuro, procedeu-se a leitura da absorbância a 595 nm. A concentração de proteínas foi estimada com base em curva analítica preparada com padrões autênticos de BSA.

Avaliação de componentes do sistema antioxidante não-enzimático

Compostos tiolados totais (SHT) e não proteicos (SHNP)

Amostras de 15 mg de folhas e raízes foram maceradas, com adição de 2 mL meio de extração constituído de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 1 mM e ácido ascórbico 1% (p/v), seguido de centrifugação a 10000 xg, por 15 minutos, a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para determinação de tióis totais e não proteicos.

Para determinação dos tióis totais, alíquotas de 0,2 mL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação composto por 0,3 mL de tampão Tris-HCl (0,2M e pH 9,2), 0,2 mL do reagente de Ellman [ácido 5,5' – ditio-bis (2-nitrobenzóico)] 0,02 M e 1,48 mL de metanol (Sedlak e Lindsay, 1968). A reação foi encubada por 15 minutos em temperatura ambiente e leitura feita a 412 nm (Sedlak e Lindsay, 1968).

Para determinação dos tióis não-proteicos, alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionados a 0,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) e 0,8 mL de H₂O desionizada, com agitação a cada 5 minutos durante 15 minutos. Em seguida, foram centrifugados a 3000 xg, durante 15 min. Em seguida, alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 1 mL de tampão Tris-HCl (0,4 M e pH 8,8) e 0,25 mL de reagente

de Ellman 0,02 M. A reação foi encubada por 5 minutos em temperatura ambiente e leitura feita a 412 nm (Sedlak e Lindsay, 1968).

Utilizando o coeficiente de extinção molar $13.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para ambos os casos, os teores de tióis foram estimados e os resultados expressos em $\text{nmol SH g}^{-1} \text{ MS}$.

Ascorbato total (AsA-T), Ascorbato reduzido (AsA-R) e Dehidroascorbato (DHA)

A determinação da concentração de ascorbato foi realizada através da maceração de 30 mg de folhas e raízes, seguido de homogeneização em 2 mL de TCA 5% (p/v), e centrifugação a 12000 xg por 15 minutos, à 4 °C.

Para determinação da concentração de AsA-T, ao sobrenadante se adicionou meio de reação contendo DTT (10 mM) e tampão fosfato de potássio (0,2 M e pH 7,4), seguido de agitação por um minuto e incubação a 42 °C por 15 minutos. Em seguida, se adicionou N-etilmaleimida (NEM) 0,5 %, com agitação por 1 minuto em temperatura ambiente e adição de TCA 10 % (p/v), ácido fosfórico a 42% (v/v), 2,2' biperidil 4 % (p/v) e FeCl_3 3% (p/v), seguido de agitação por um minuto e incubação por 40 minutos a 42 °C, seguido de leituras a 525 nm.

Para determinação da concentração de AsA-R, ao sobrenadante se adicionou meio de reação contendo tampão fosfato de potássio (0,2 M e pH 7,4) água deionizada, TCA 10 % (p/v), ácido fosfórico a 42% (v/v), 2,2' biperidil 4 % (p/v) e FeCl_3 3% (p/v), seguido de agitação por 1 minuto e incubação a 42 °C por 40 minutos e leitura a 525 nm. A concentração de DHA foi obtida subtraindo-se o valor de AsA do T-AsA.

Os teores de ascorbato total, reduzido e dehidroascorbato foram estimados com base em curva analítica com padrões autênticos de ascorbato, sendo os resultados expressos em $\text{nmol AsA g}^{-1} \text{ MS}$ (Kampfenkel et al., 1995).

3. Resultados

Sintomatologia visual de toxidez de Se e concentração de Se e S em folhas e raízes de P. stratiotes

Ao observarmos a sintomatologia visual das plantas (Figura 2), podemos perceber, pela indicação feita por setas em vermelho, o aparecimento de clorose foliar em plantas expostas aos tratamentos contendo 5 μM de selenito e selenato de sódio, assim como o escurecimento e morte de parte das raízes. Em concentrações supra ótimas, as cloroses evoluem para necroses por toda a folha. As setas em azul, nos tratamentos com 1 e 2 μM de Se, indicam a emissão, desenvolvimento e crescimento de novas raízes, que se destacam por apresentarem coloração verde claro.

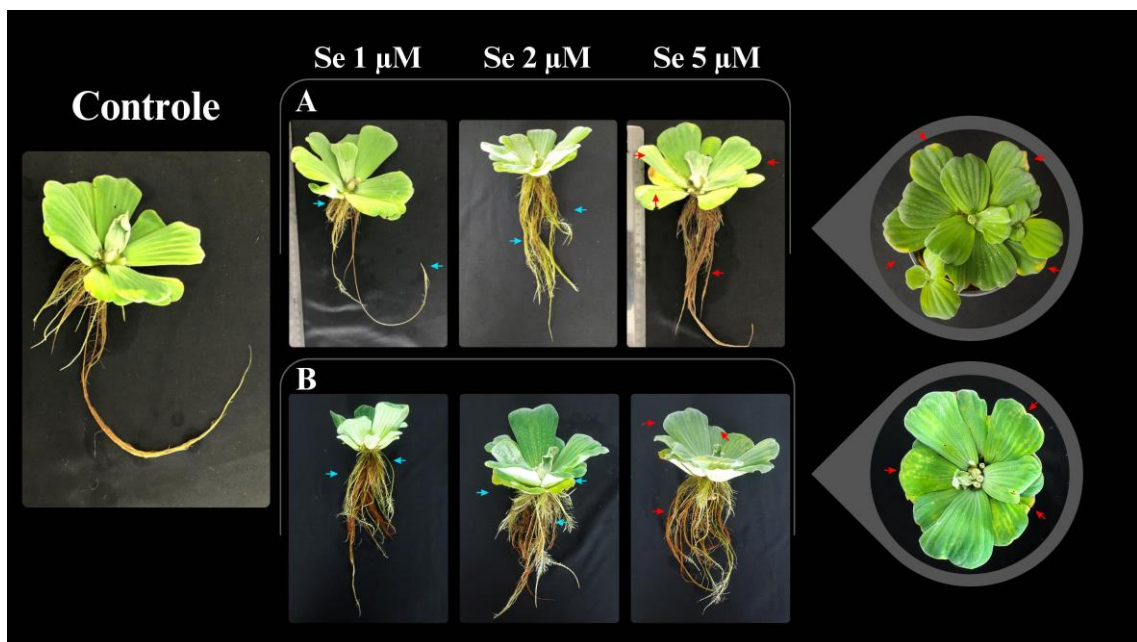


Figura 2. Aspecto visual de folhas e raízes de *Pistia stratiotes* expostas a diferentes concentrações de selenito (A) e selenato (B), após 5 dias de exposição.

Nos tratamentos com selenito, não foi possível quantificar a presença de Se nas folhas (Figura 3 A), o qual ficou retido basicamente nas raízes, especialmente na maior concentração utilizada (5 μM). Observou-se um efeito evidente dos fatores concentração e tempo de exposição no acúmulo de Se nas raízes das plantas, em que as concentrações de 5 μM de selenito, por 1 dia, e de 2 μM de selenito, por 5 dias, não diferiram entre si.

A concentração de enxofre nas folhas, conforme apresentado na Figura 3 B, não variou entre os tratamentos, enquanto, nas raízes, as plantas expostas ao Se por 5 dias, independente da concentração, indicaram maiores concentrações de enxofre.

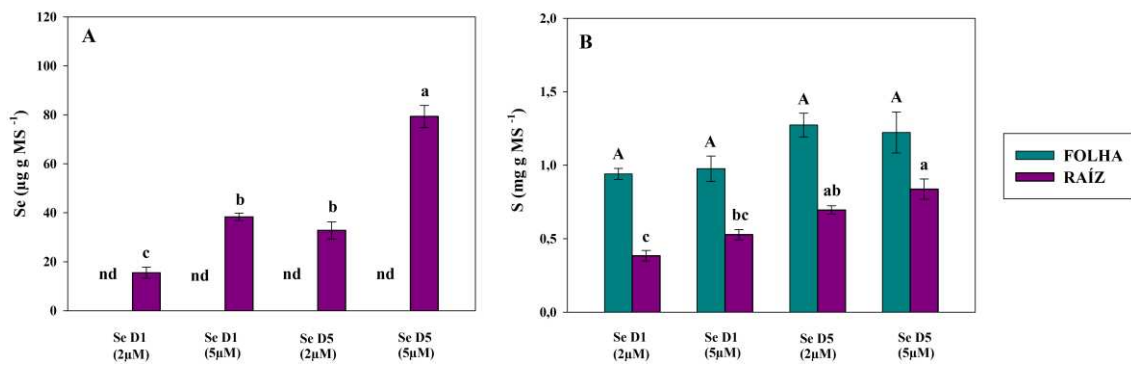


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de selenito de sódio sobre os teores de Se (A) e S (B) em *P. stratiotes* expostas por diferentes períodos de tempo. Médias acompanhadas da mesma letra, maiúsculas para folhas e minúsculas para raízes, não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Nos tratamentos suplementados com selenato, a concentração de selênio nas folhas e raízes apresentaram incrementos dependentes da concentração do elemento utilizado e do tempo de exposição, com concentrações significativamente maiores no tratamento com 5 µM de selenato, por 5 dias (Figura 4 A).

A concentração de S nas folhas mostrou dependência da concentração de Se utilizado, não apresentando diferenças entre os tempos de exposição, tanto no tratamento com 2 quanto com 5 µM de Selenato. Nas raízes, por sua vez, o efeito de tratamento com concentrações de Se foi observado apenas para exposição de um dia, enquanto o incremento na concentração de S apresentou diferença apenas na concentração de 2 µM de Se (Figura 4 B).

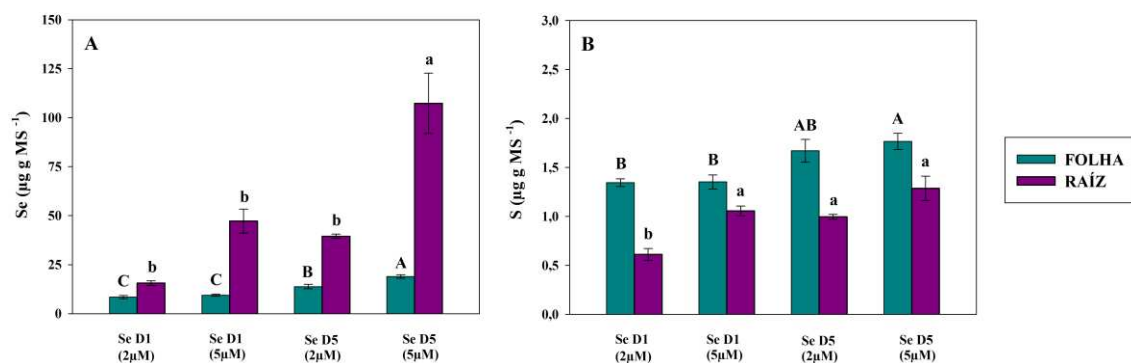


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de selenato de sódio sobre os teores de Se (A) e S (B) em *P. stratiotes* expostas por diferentes períodos de tempo. Médias acompanhadas da mesma letra, maiúsculas para folhas e minúsculas para raízes, não diferem estatisticamente de

acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Ganho relativo de biomassa fresca

Em relação ao ganho relativo de biomassa fresca, o tempo de exposição ao selenito afetou o desenvolvimento do vegetal, sendo que plantas submetidas aos tratamentos controle, 1 e 2 μM de Se apresentaram incremento no ganho de biomassa até concentrações próximas a 2 μM de Se, correspondendo ao tratamento com maior ganho. Por outro lado, concentrações acima causaram toxidez no vegetal, notada pela perda de biomassa (Figura 5).

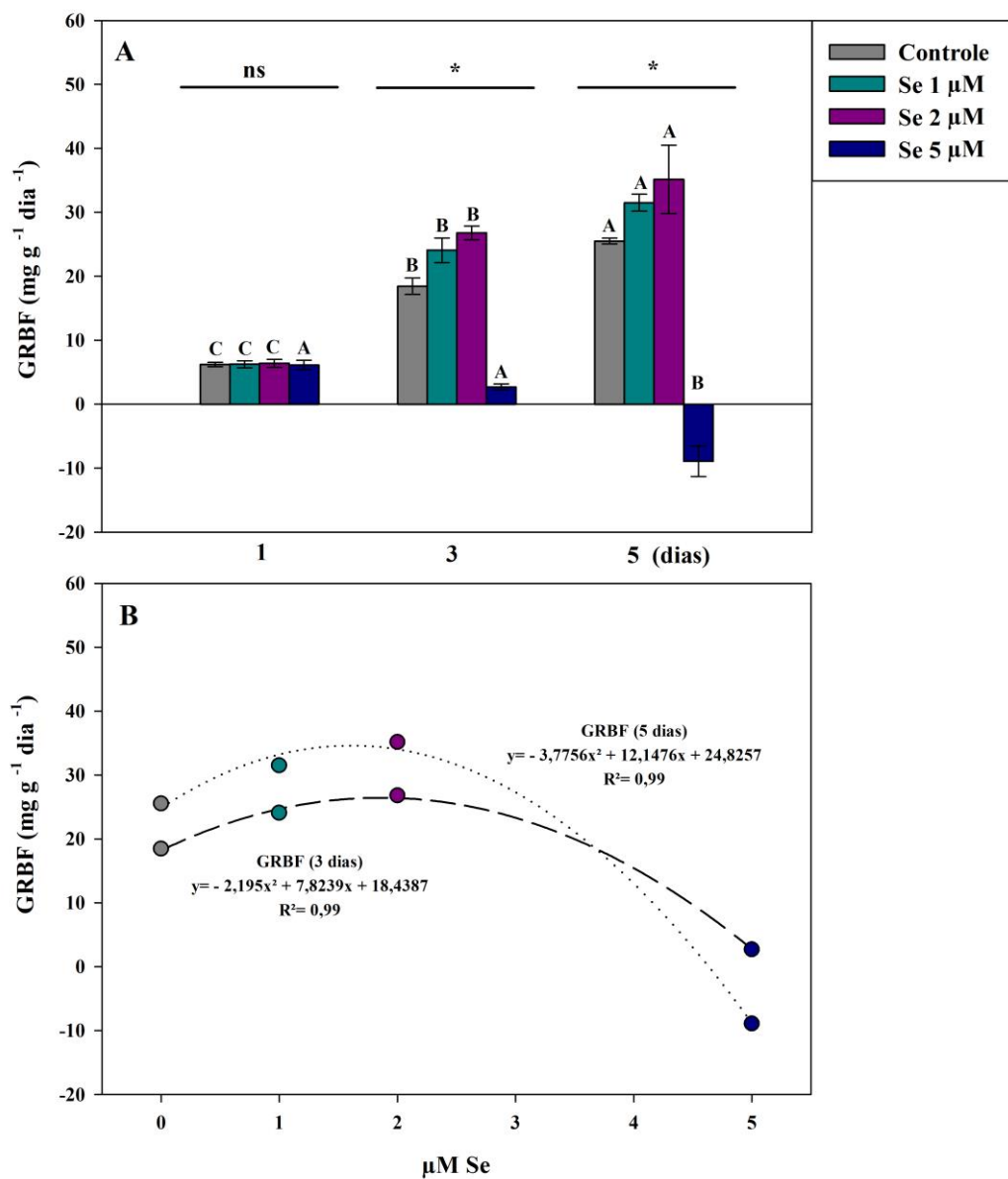


Figura 5. Efeitos de diferentes concentrações de selenito de sódio sobre o ganho relativo de biomassa fresca – GRBF (A, B) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para a mesma concentração de Se em diferentes tempos de exposição, e pela mesma letra minúscula, para efeito simples do fator tempo, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Para o selenato de sódio o fator tempo também interferiu no desenvolvimento dos vegetais sendo que, plantas expostas aos tratamentos controle, 1 e 2 μM de Se em solução exibiram incrementos no acúmulo de biomassa após o terceiro dia de exposição, tendo seu máximo de acúmulo no quinto dia, enquanto naquelas tratadas com 5 μM de Se não se observaram diferenças entre os tempos (Figura 6 A). Em relação ao fator concentração, notamos diferenças significativas entre os tratamentos nos tempos 3 e 5 dias de exposição. Como é possível observar nas curvas de regressão, o GRBF demonstrou tendência de aumento até alcançar a concentração 2 μM , tratamento que proporcionou maior acúmulo de biomassa, com posterior redução em maiores concentrações, demonstrando toxidez para o vegetal (Figura 6 B).

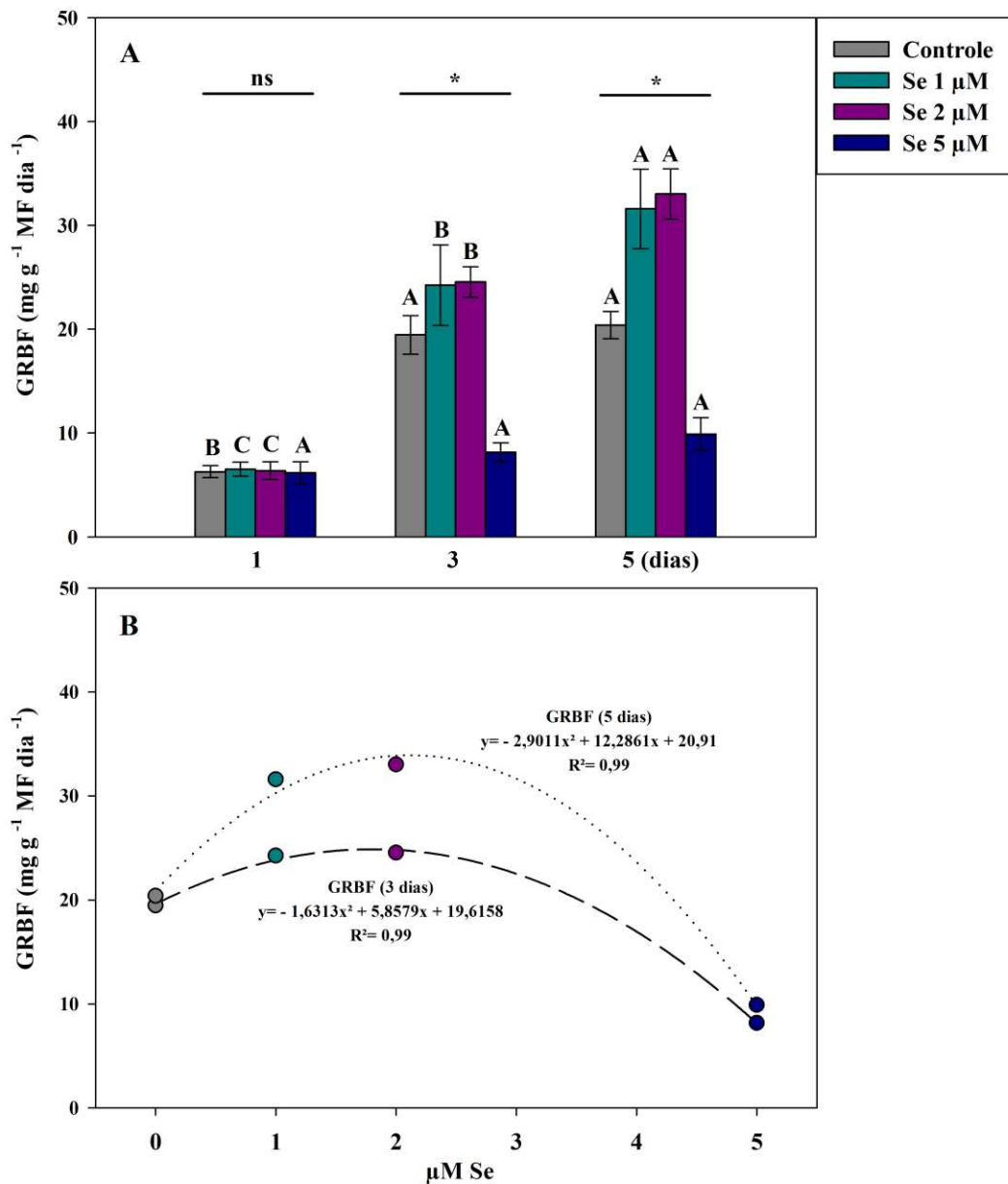


Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de selenato de sódio sobre o ganho relativo de biomassa fresca - GRBF (A, B) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para a mesma concentração de Se em diferentes tempos de exposição, e pela mesma letra minúscula, para efeito simples do fator tempo, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Pigmentos fotossintéticos

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, observou-se, considerando o fator tempo, que plantas expostas ao selenito de sódio mostraram diminuição significativa apenas para a concentração da clorofila a, com redução de aproximadamente 40% no quinto dia, nas plantas submetidas à concentração 5 µM. Quando foi examinado o fator concentração, as plantas expostas por 3 e 5 dias ao tratamento contendo 5 µM de selenito de sódio apresentaram

diferença significativa, também, apenas para o pigmento clorofila *a*. De modo geral, todos os pigmentos apresentaram incrementos até a concentração de 2 μM , seguido de decréscimo nas demais concentrações (Figura 7).

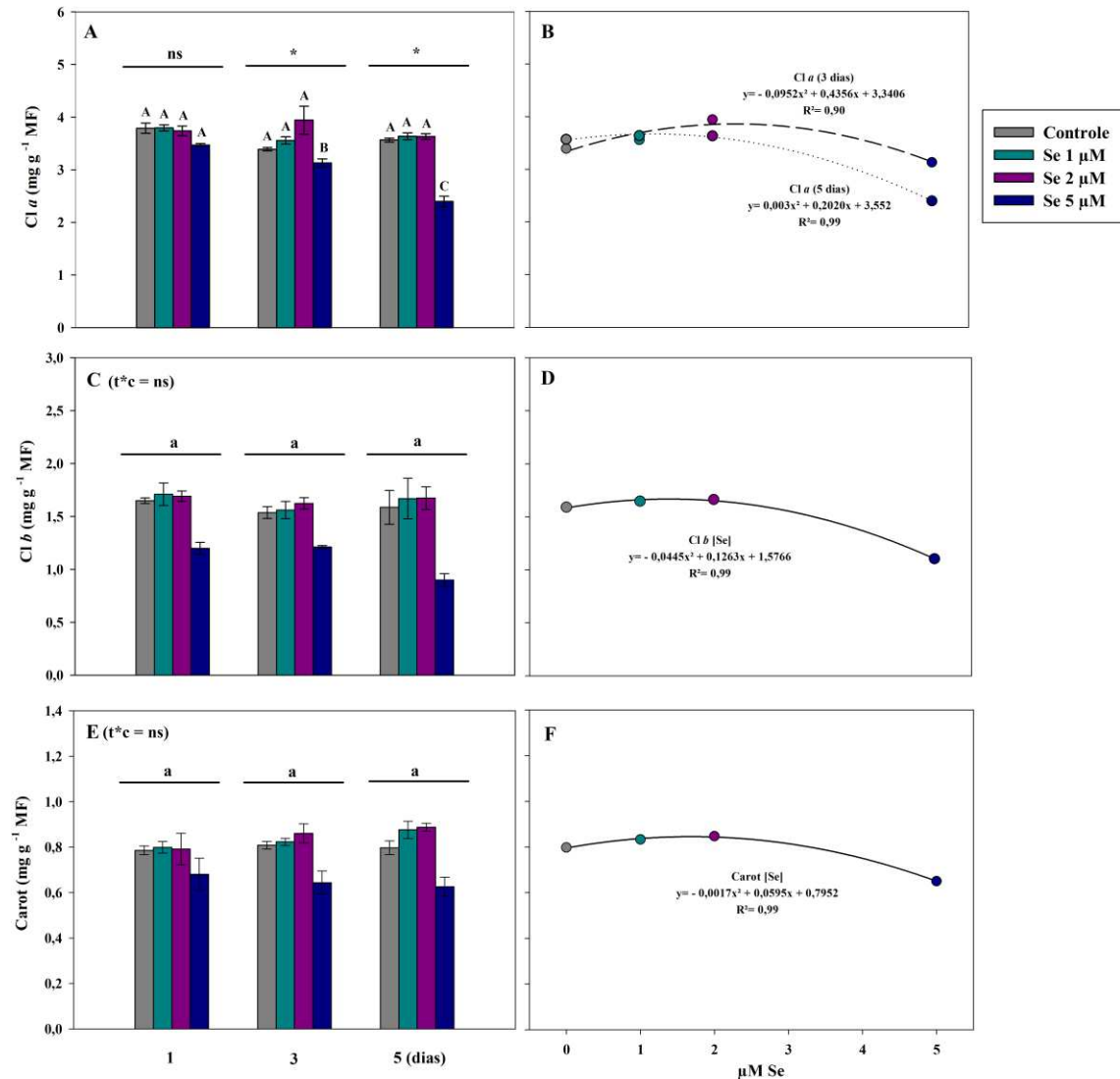


Figura 7. Efeitos de diferentes concentrações de selenito de sódio sobre os teores de clorofila *a* (A), clorofila *b* (C) e carotenoides (E) em *P. stratiotes* expostas por diferentes períodos. Na interação de fatores (A, B), médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si, entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio. t*c= ns, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os

ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Para o selenato de sódio, considerando os intervalos de avaliação (2 ou 5 dias) ao determinarmos os teores de clorofila *a*, percebeu-se ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 8 A), enquanto para clorofila *b* (Figura 8 C) e para os teores de carotenoides (Figura 8 F), nos tratamentos com 1 e 2 μM de Se, incrementos foram observados, ambos na ordem de 30%, no quinto dia de exposição.

Na análise dos efeitos da concentração, as curvas de regressão indicaram aumento nos teores de clorofila *a*, atingindo o pico em plantas expostas ao tratamento contendo de 2 μM de Se, com posterior redução em maiores concentrações (Figura 8 B), da mesma forma que para a clorofila *b* e os carotenoides, embora, nesses casos, independentemente do tempo de exposição (Figuras 8 B, D e F).

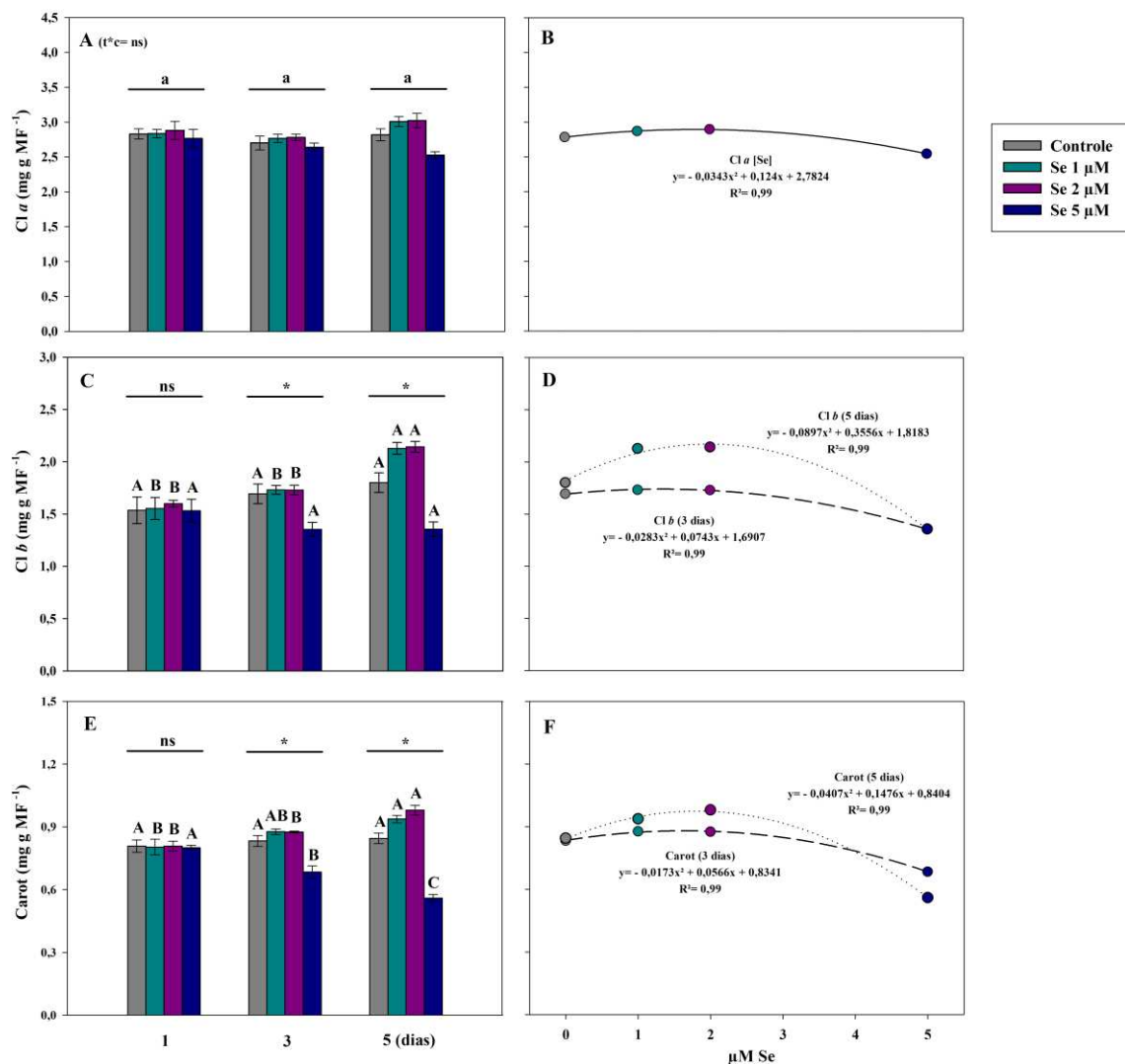


Figura 8. Efeitos de diferentes concentrações de selenato de sódio sobre os teores de clorofila *a* (A), clorofila *b* (C) e carotenoides (E) em *P. stratiotes* expostas por diferentes períodos. Na interação de fatores (A, B), médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si, entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio. t*c= ns, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica

A interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa para os teores de superóxido, tanto para as folhas (9 A), quanto para raízes (9 B). Ao analisarmos nas folhas o fator tempo dentro dos níveis de concentração, percebeu-se, no quinto dia, aumentos dos teores de superóxido para todos os tratamentos. Em relação às raízes, as plantas submetidas aos tratamentos contendo 1 e 2 μM não apresentaram diferenças nos teores de superóxido em relação ao fator tempo; controle e 5 μM de Se tiveram redução no terceiro dia, seguido de aumento no quinto dia de exposição.

Quando foi analisado o fator concentração, dentro de cada um dos tempos de exposição, observou-se que diferenças significativas entre os tratamentos nos tempos 3 e 5, nas folhas, e 1 e 5, para raízes. Para folhas, a curva de regressão mostrou comportamento de redução nos teores de superóxido nas plantas tratadas com 1 e 2 μM de Se, na ordem de 6 e 40 % respectivamente, para o terceiro dia, e 15 e 22 %, respectivamente, para o quinto dia, enquanto naquelas tratadas com 5 μM aumentos de 50 e 20% nas concentrações foram registrados no terceiro e no quinto dia de exposição respectivamente. Nas raízes, o comportamento se repetiu com os tratamentos de 1 e 2 μM de Se demonstrando redução nos teores de superóxido de aproximadamente 50% no primeiro dia e 40% ao quinto dia, enquanto naquelas tratadas com 5 μM de Se os incrementos foram na ordem de 17 e 30 %, respectivamente.

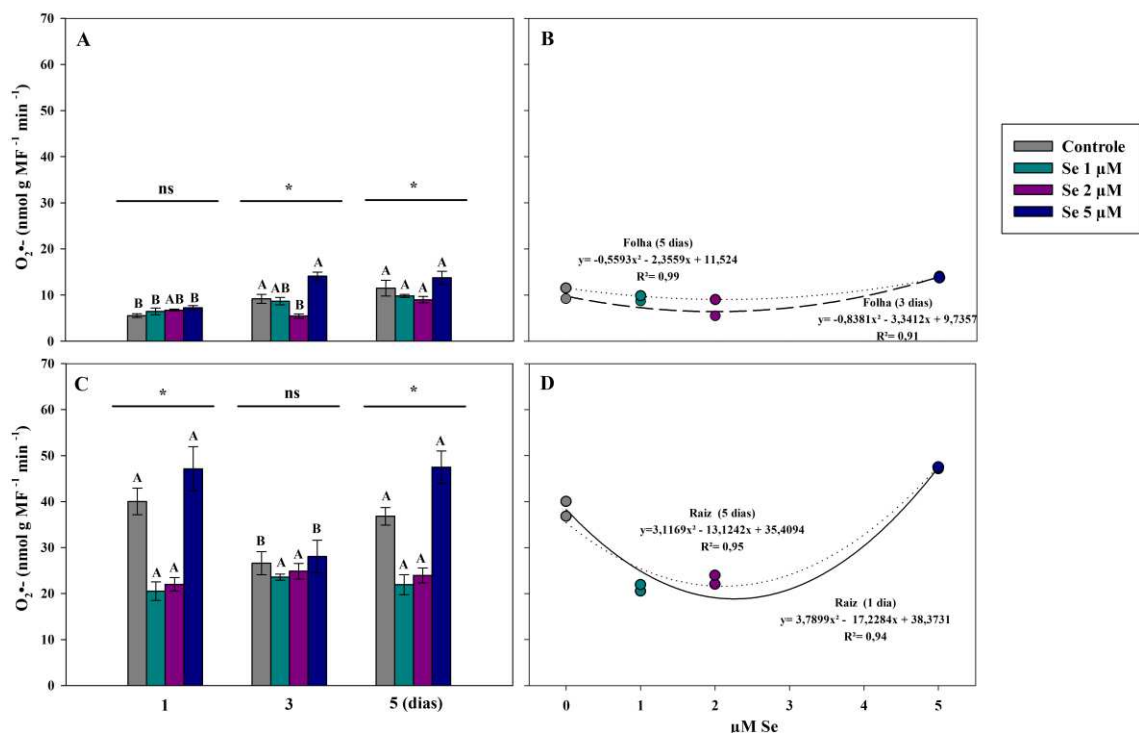


Figura 9. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e dos tempos de exposição sobre os teores do ânion superóxido em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

A formação de ânion superóxido, pelo selenato de sódio (Figura 10), indicou significância na interação entre os fatores tempo*concentração. Ao analisarmos o fator tempo dentro dos níveis de concentração, nota-se que, tanto para folhas (10 A) quanto para raízes (10 C), os tratamentos: controle, 1 e 2 μM de Se não apresentaram diferenças significativas. Contudo, as plantas submetidas ao tratamento contendo 5 μM de Se em solução, apresentou incremento nos teores de superóxido aos cinco dias, na ordem de 130% nas folhas, e 21 e 22% no terceiro e quinto dia, respectivamente, nas raízes.

Considerando o fator concentração dentro dos diferentes tempos de exposição, tanto para folhas quanto para raízes, as diferenças significativas entre os tratamentos se deram aos três e cinco dias de exposição. As curvas de regressão indicam resposta de redução nos teores de superóxido, tanto nas m folhas como nas raízes aos 3 e 5 dias, até 2 μM de Se, com posterior aumento em concentrações maiores (até 5 μM).

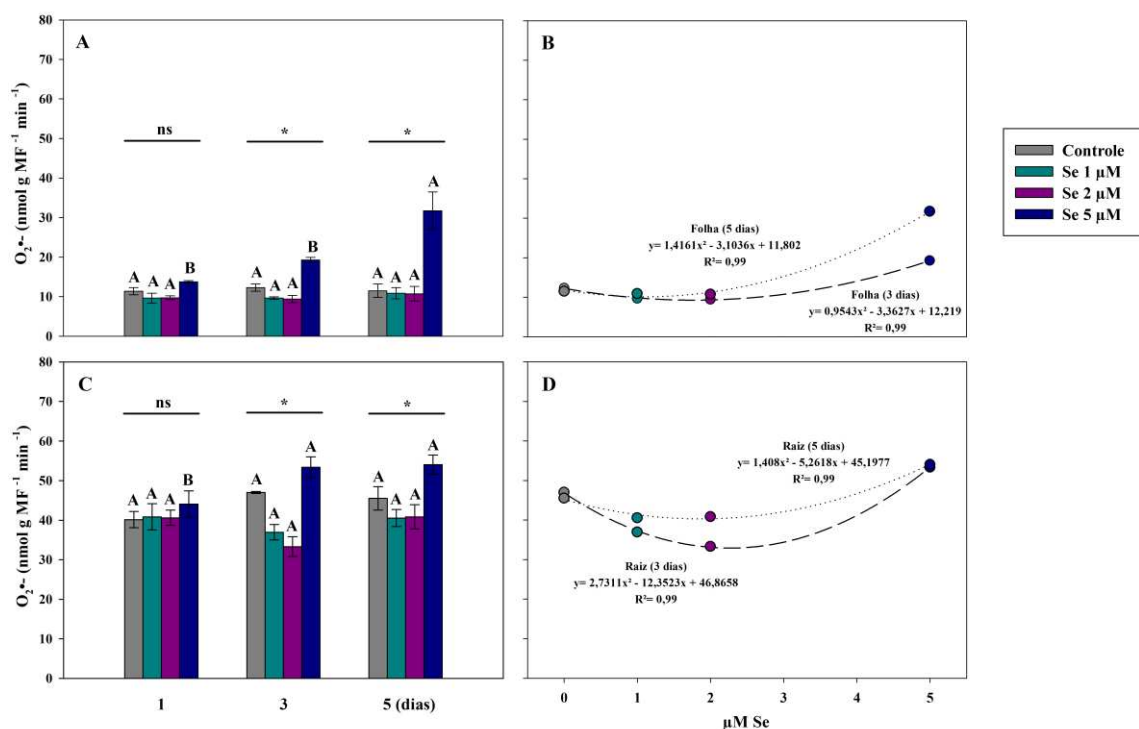


Figura 10. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre os teores do ânion superóxido em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

A formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em resposta ao selenito de sódio também foram avaliadas (Figura 11). Para essa variável, a interação entre tempo*concentração não foi significativa nem para folhas, nem para raízes. Avaliando o efeito simples do fator tempo nos tratamentos, perceberam-se aumentos na concentração de peróxido no terceiro dia para ambos os órgãos. Já dentro do nível de concentração, o gráfico de regressão demonstra um comportamento de leve redução nos teores de H_2O_2 até a concentração de $2 \mu M$ de Se, com posterior incremento, 25% para folhas e 20% para raízes, em plantas expostas a $5 \mu M$ de Se.

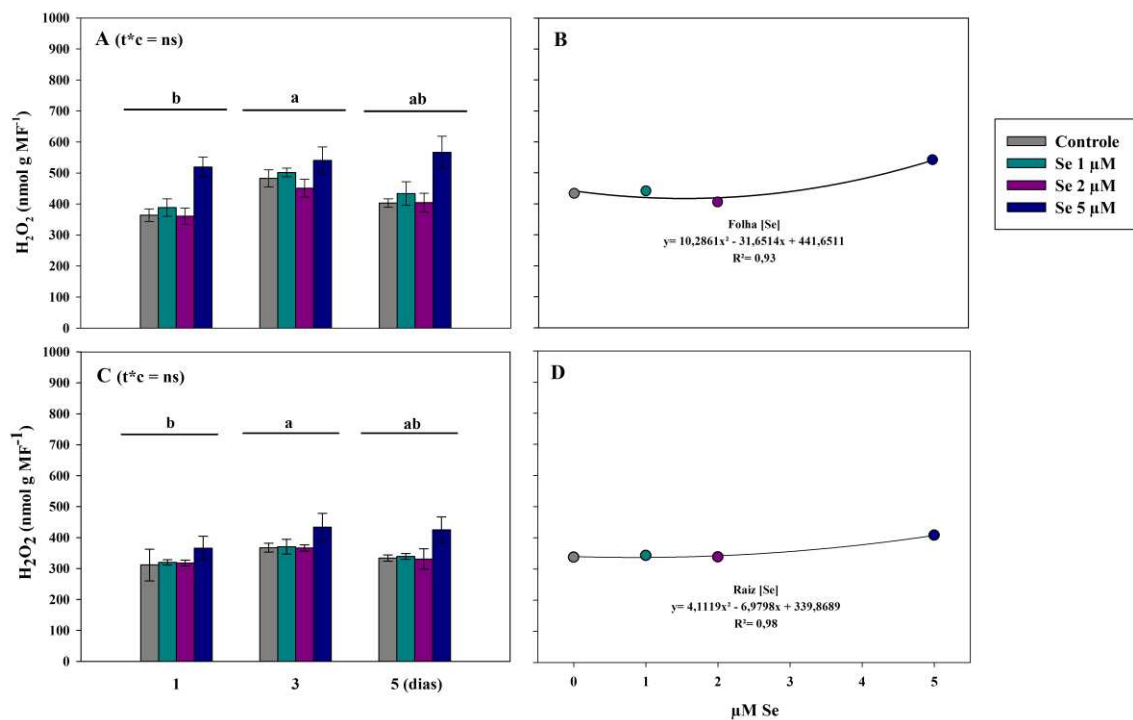


Figura 11. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre os teores de peróxido de hidrogênio em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo

experimental em função da dose de selênio. $t^*c= ns$, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P\leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Ao avaliarmos os teores de peróxido de hidrogênio para selenato de sódio (Figura 12), a interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa. Considerando o fator tempo dentro dos níveis de concentração podemos notar que, nas folhas (12 A), os tratamentos controle e 5 μM de Se apresentaram os maiores incrementos a partir do terceiro dia de exposição, sendo com 5 μM aumentos de 91 e 100% aos 3 e 5 dias de exposição, respectivamente, enquanto o tratamento com 2 μM de Se não gerou diferenças significativas. Para raízes (12 C), apenas o tratamento com 5 μM de Se apresentou diferenças significativas entre os tempos de exposição, com aumentos de 27 e 41% nos teores de peróxido no terceiro e no quinto dia, respectivamente.

Ao desdobrarmos o fator concentração dentro dos diferentes tempos de exposição, diferenças significativas foram detectadas aos três e cinco dias, para folha, e com um, três e cinco dias para raízes. As curvas de regressão evidenciaram redução nos teores de peróxido até a concentração de 2 μM de Se e, em seguida, aumentos até 5 μM de Se em todos os tempos de exposição.

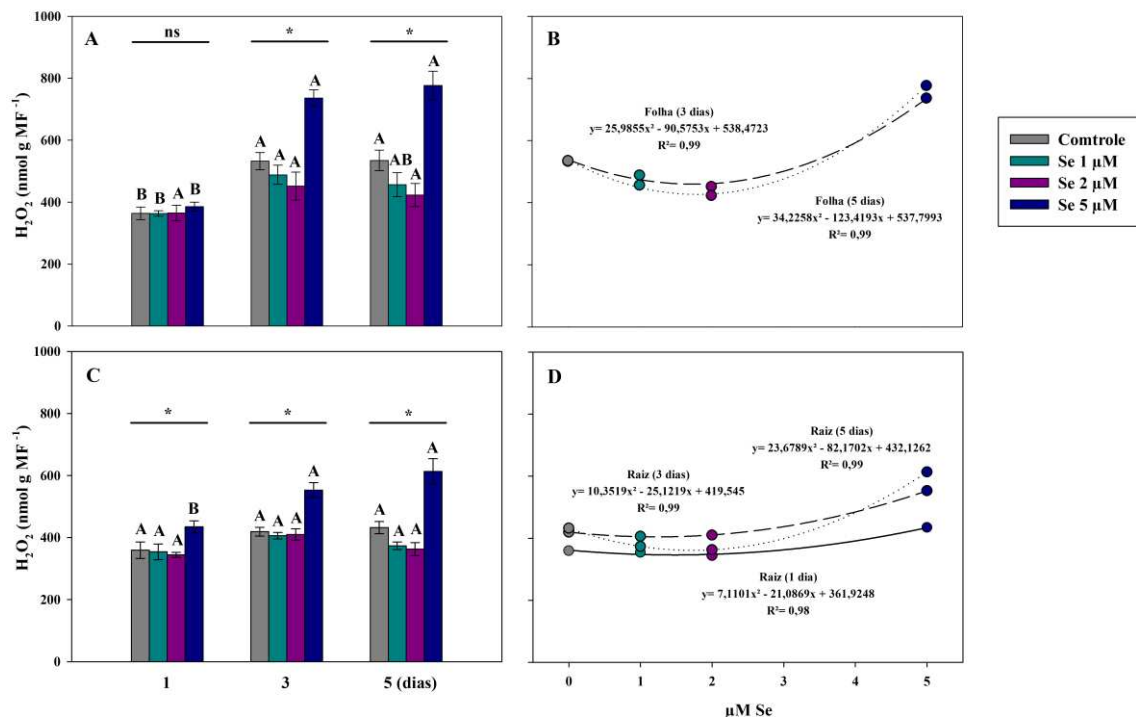


Figura 12. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre os teores de peróxido de hidrogênio em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

Ao avaliarmos a concentração de malonaldeído (MDA) em plantas tratadas com selenito de sódio (Figura 13) notou-se que a interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa. Quando o fator tempo dentro dos níveis de concentração foi avaliado notou-se, em folhas, que as plantas tratadas com 1 e 2 μM de Se apresentaram redução nos teores de MDA na casa de 45% ao quinto dia, enquanto àquelas tratadas com 5 μM de Se indicaram aumentos de 28 e 32% para 3 e 5 dias, respectivamente. Nas raízes, apenas as plantas tratadas com 5 μM de Se demonstraram aumentos nos teores de MDA, na ordem de 45% no quinto dia.

A avaliação do fator concentração dentro dos intervalos de exposição indicou significância entre os tratamentos nos três níveis de tempo, tanto para as folhas quanto para as raízes. As curvas de regressão das concentrações em cada um dos tempos indicaram que o comportamento dessa variável se assemelha às demais. Em folhas, houve tendência de redução dos teores de MDA na ordem de 19, 35 e 50% para 1 μM , 30, 41 e 55% para 2 μM de Se com 1, 3 e 5 dias de exposição, respectivamente. Em paralelo, o aumento das concentrações de Se, fez aumentar as concentrações de MDA em 46, 96 e 123% em 1, 3 e 5 dias, respectivamente. Nas raízes, o comportamento se repetiu, com redução de 63, 21 e 67 % para 1 μM , 70, 25 e 70 % para 2 μM em 1, 3 e 5 dias, respectivamente, enquanto as plantas tratadas com 5 μM de Se apresentaram aumentos de 40, 87 e 119 %.

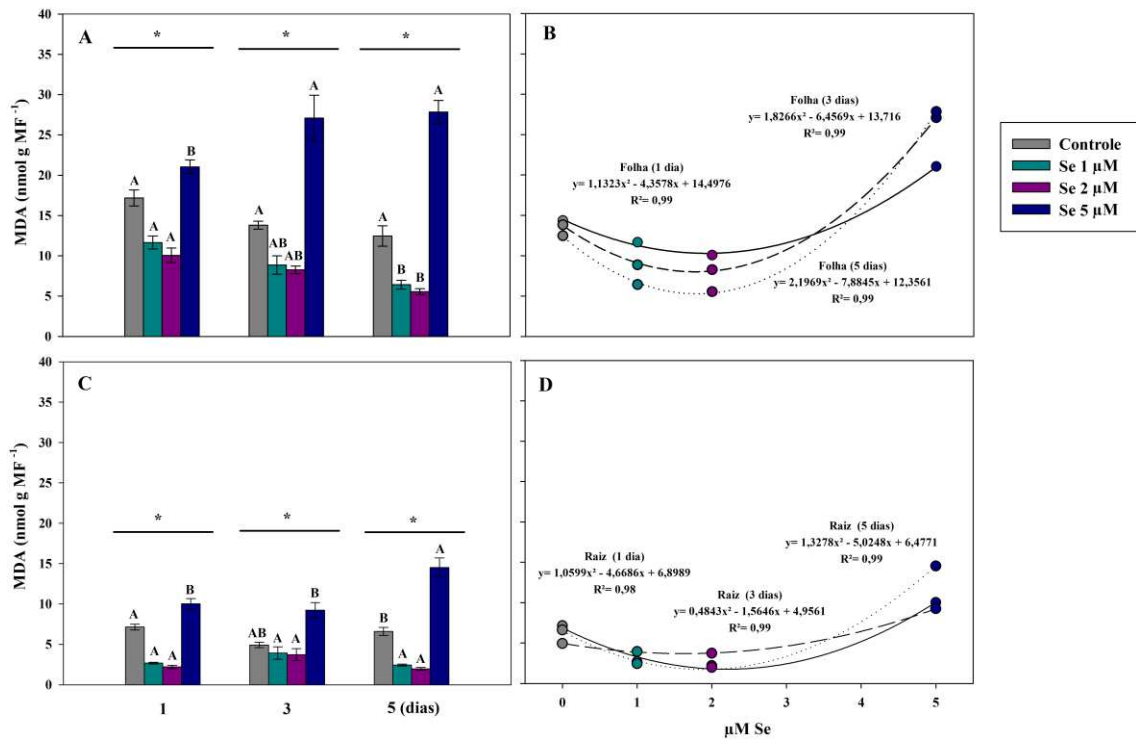


Figura 13. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre os teores de malonaldeído (MDA) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

Ao avaliarmos a formação e concentração de malonaldeído (MDA) nas plantas expostas à selenato de sódio, – Figura 14, notou-se que a interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa. Quando consideramos o fator tempo dentro dos níveis de concentração, em folhas (14 A), o tratamento controle resultou em redução no conteúdo de MDA em 28% no quinto dia; tratamentos contendo 1 e 2 μM de Se não apresentaram diferenças estatísticas, enquanto as plantas expostas a 5 μM de Se indicaram aumentos de 25% nos teores de MDA no quinto dia de exposição. Para as raízes (14 C), as plantas expostas aos tratamentos controle, 1 e 2 μM de Se não diferiram estatisticamente, enquanto àquelas expostas ao tratamento com 5 μM de Se apresentaram incrementos de 33% no quinto dia.

Considerando o fator concentração dentro dos diferentes níveis de tempo, houve significância entre os tratamentos nos dias um, três e cinco em folhas, e nos dias três e cinco, para as raízes. Os gráficos de regressão apontaram comportamento de redução nos conteúdos

de MDA em concentrações de até 2 μM de Se, mas, em seguida, aumentos nas concentrações maiores até 5 μM . Nas folhas, as plantas tratadas com 1 μM de Se apresentaram redução de 19, 28 e 18 % nos 1^o, 3^o e 5^o dias, respectivamente, enquanto naquelas tratadas com 2 μM de Se as reduções foram de 33, 32 e 25 %. Todavia, as plantas expostas à 5 μM de Se apresentaram incrementos na ordem de 49, 70 e 158 % para o mesmo período. Nas raízes, as plantas tratadas com 1 μM de Se reduziram 25 e 10 % os teores de MDA, naquelas tratadas com 2 μM as reduções foram de 22 e 12 %, enquanto as tratadas com 5 μM tiveram incrementos de 22 e 54 % nos 3^o e 5^o dias de exposição, respectivamente.

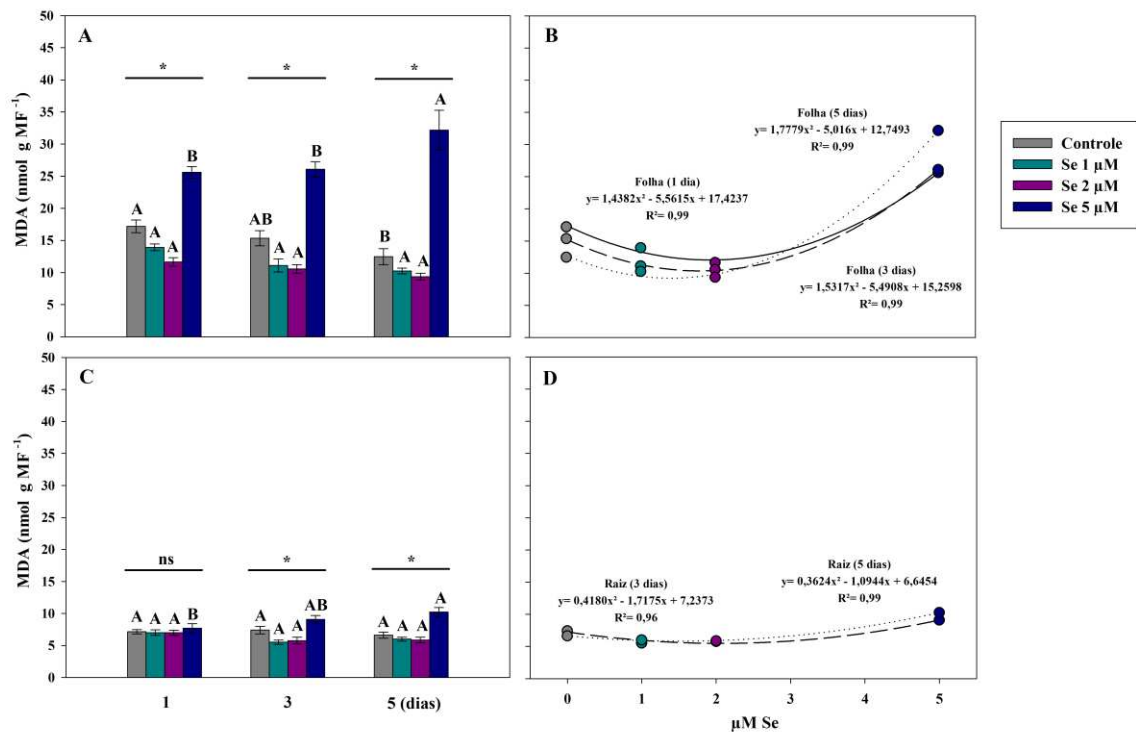


Figura 14. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre os teores de malonaldeído (MDA) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

Sistema antioxidante enzimático

Ao avaliarmos a atividade da superóxido dismutase (SOD) – Figura 15, em plantas expostas à selenito de sódio, a interação tempo*concentração foi significativa apenas nas folhas. Logo, ao se observar o efeito do fator tempo dentro dos níveis de concentração, notou-

se que o tratamento controle apresentou redução de 30% na atividade dessa enzima no quinto dia de exposição. Plantas sujeitas aos tratamentos contendo 1 e 2 μM de Se em solução não apresentaram diferenças na atividade enzimática entre os dias, enquanto àquelas expostas a 5 μM tiveram aumentos no terceiro dia, mas reduções no quinto. Ao investigarmos o fator concentração dentro de cada um dos tempos de exposição, notou-se interação significativa para 1 e 5 dias de tratamento. As curvas de regressão referentes às concentrações nos diferentes dias de exposição indicaram aumentos na atividade enzimática na ordem de 20 e 42 % nas plantas tratadas com 1 e 2 μM , respectivamente, no primeiro dia, mas redução de 10 % naquelas submetidas a 5 μM . No quinto dia de exposição, as plantas expostas a 1 e 2 μM tiveram incremento de 40 e 108 %, respectivamente, na atividade enzimática.

Para as raízes, avaliando os efeitos simples dos parâmetros, o fator tempo indicou redução na atividade enzimática de 18 % no quinto dia de exposição. Levando em consideração o efeito das concentrações de Se, o gráfico de regressão indicou aumentos da atividade enzimática na ordem de 2 % em plantas expostas a 1 μM de Se, 15 % naquelas tratadas com 2 μM e reduções de 5 % na atividade enzimática quando expostas a 5 μM de Se.

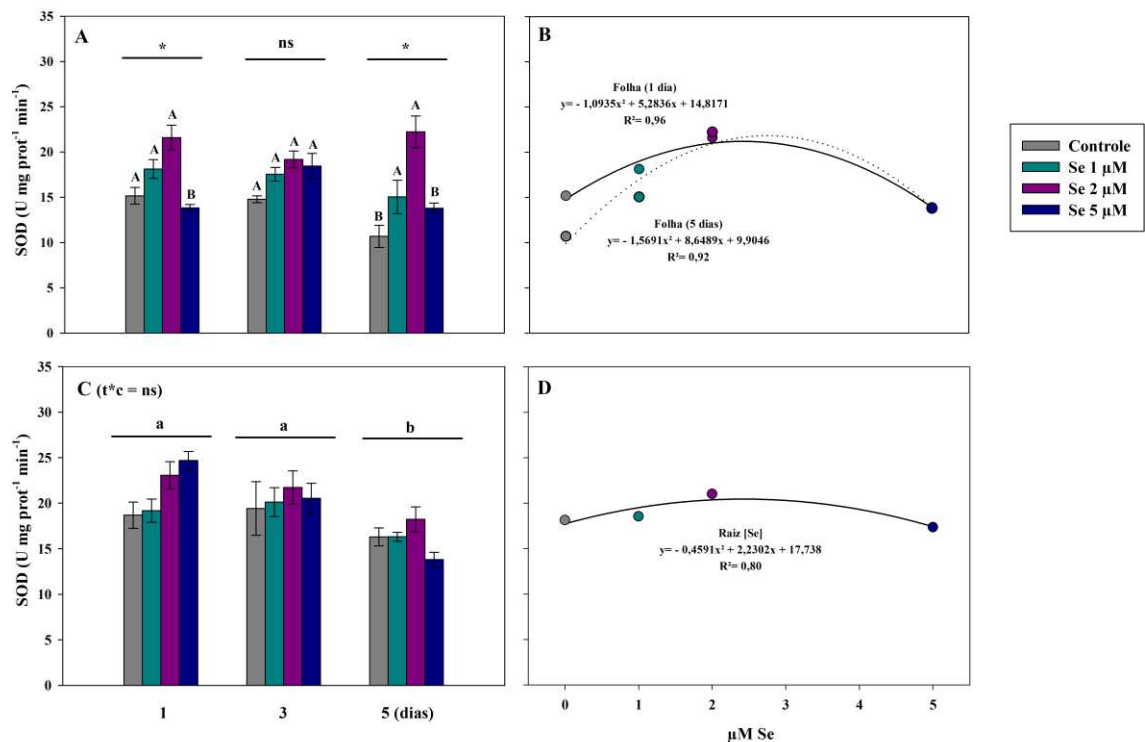


Figura 15. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste

Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. t*c= ns, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Quando submetidas ao selenato de sódio, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) – Figura 16 – revelou que a interação entre os fatores tempo e concentração foi significativa apenas nas folhas. Considerando o fator tempo dentro dos níveis de concentrações nas folhas, notou-se que os tratamentos contendo 1 e 2 μM de Se resultaram em incrementos de 38 e 31 %, respectivamente, na atividade enzimática da SOD no quinto dia de exposição, enquanto as plantas submetidas à 5 μM de Se sofreram redução de 42 % na atividade da SOD a partir do terceiro dia. Quando avaliamos o fator concentração dentro dos níveis de tempo, houve diferenças significativas aos três e cinco dias de exposição. Os gráficos de regressão indicaram aumentos da atividade enzimática até 2 μM de Se. Acima dessa concentração, a tendência foi de redução na atividade dessa enzima, alcançando o menor patamar em 5 μM de Se em solução.

Nas raízes, avaliando o efeito simples dos fatores, foi possível verificar que o fator tempo não apresentou diferenças estatísticas. Já para concentração, o efeito foi significativo e as curvas de regressão apontaram aumento na atividade enzimática nas raízes até 2 μM , com posterior redução em 5 μM de Se em solução.

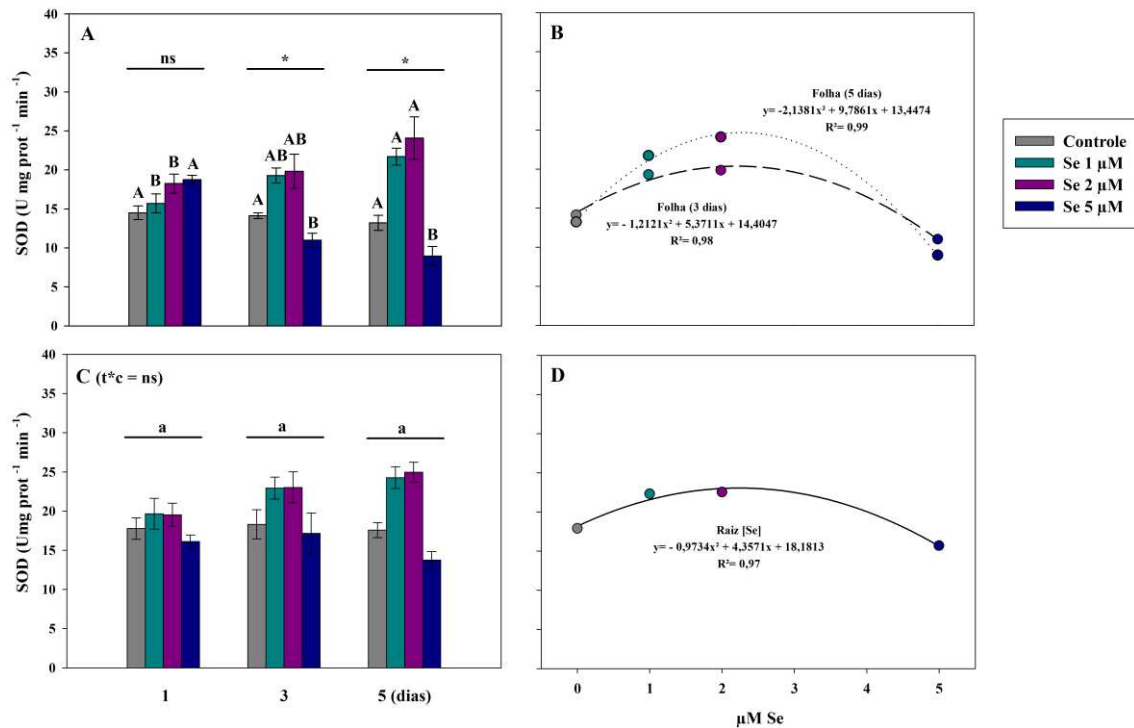


Figura 16. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. $t^*c = ns$, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

A avaliação da atividade da catalase (CAT), para selenito de sódio, – Figura 17, não indicou interação entre os fatores tempo*concentração. Em folhas, avaliando o efeito simples do fator tempo, observou-se redução de 16 % na atividade enzimática no terceiro dia, enquanto o efeito simples do fator concentração não foi significativo. Em raízes, o efeito simples do fator tempo indicou aumento de 26 % na atividade da enzima no terceiro dia. Para o efeito simples das concentrações, a curva de regressão indicou tendência de aumento da atividade da catalase em plantas expostas até 2 μM de Se, e redução naquelas expostas a 5 μM de Se.

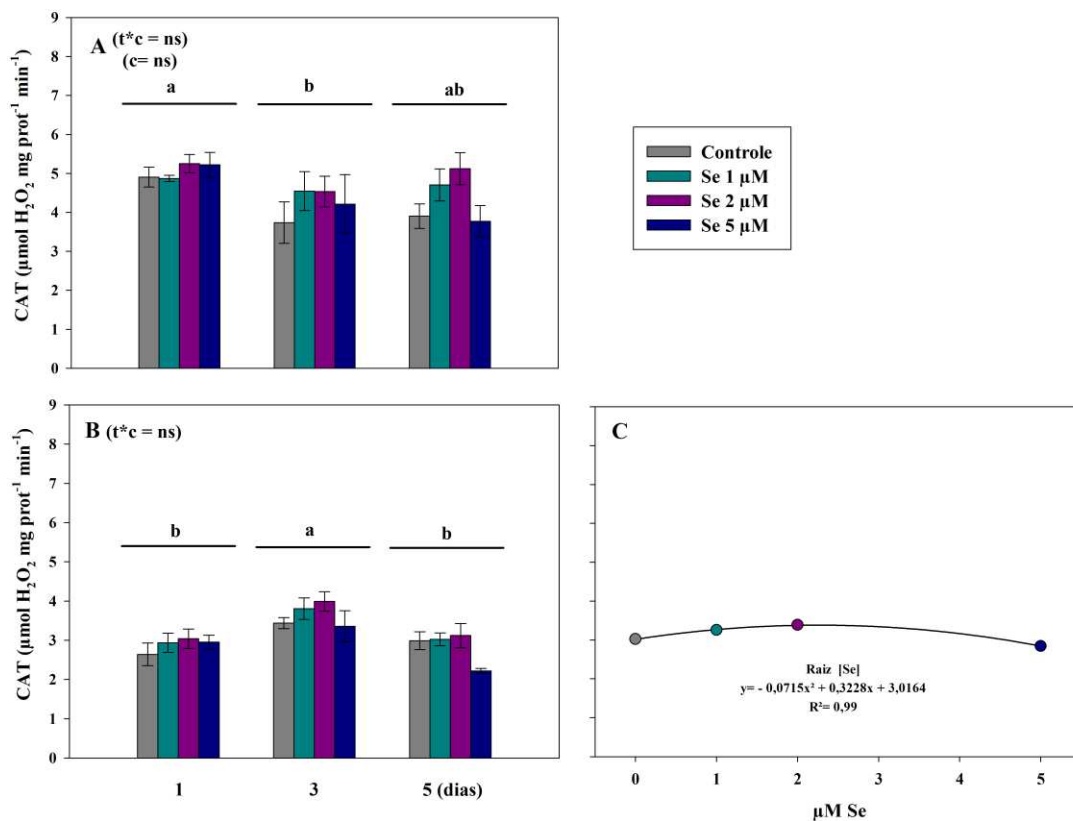


Figura 17. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. $t^*c = ns$, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$), $c = ns$ indica que não houve diferença significativa no efeito simples do fator concentração, e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Quanto à atividade da enzima catalase (CAT), em plantas expostas ao selenato de sódio, – Figura 18, a interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa. Avaliando o desdobramento do fator tempo dentro dos níveis de concentração, tanto para folhas, quanto para raízes, plantas expostas aos tratamentos controle e 5 μM de Se não apresentaram alterações na atividade dessa enzima, enquanto as plantas expostas à 1 e 2 μM de Se indicaram aumento de 58 e 60% nas folhas e 77 e 87 % nas raízes, respectivamente, no quinto dia de exposição ao selenato de sódio.

. Ao avaliarmos o fator concentração dentro dos tempos de exposição em tecidos das folhas, a significância estatística se deu no quinto dia de exposição, já para raízes a diferença estatística se deu nos dias três e cinco de exposição. Os gráficos de regressão indicaram

aumentos nas taxas de atividade enzimática da CAT em plantas expostas a concentrações de até 2 μM de Se e, em seguida, reduções em concentrações maiores até alcançar em seu menor patamar em 5 μM .

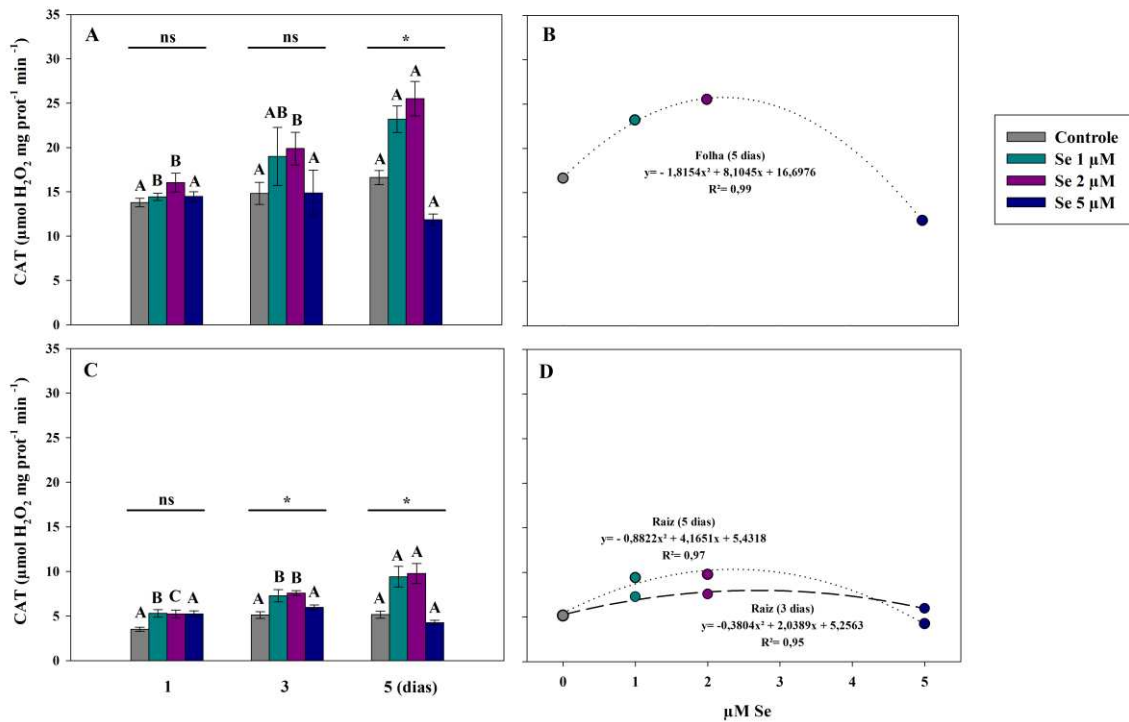


Figura 18. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

Para atividade das peroxidases (POX) em plantas submetidas ao selenito de sódio – Figura 19, a interação entre os fatores tempo*concentração não foi significativa. Avaliando os efeitos simples dos fatores, a maior atividade dessa enzima foi registrada no terceiro dia, para as folhas, e nos dias três e cinco, para as raízes. Ao avaliarmos o efeito simples do fator concentração, notou-se, tanto nas folhas quanto nas raízes, aumentos na atividade enzimática nas plantas expostas a concentrações de até 2 μM , com redução em concentrações mais elevadas.

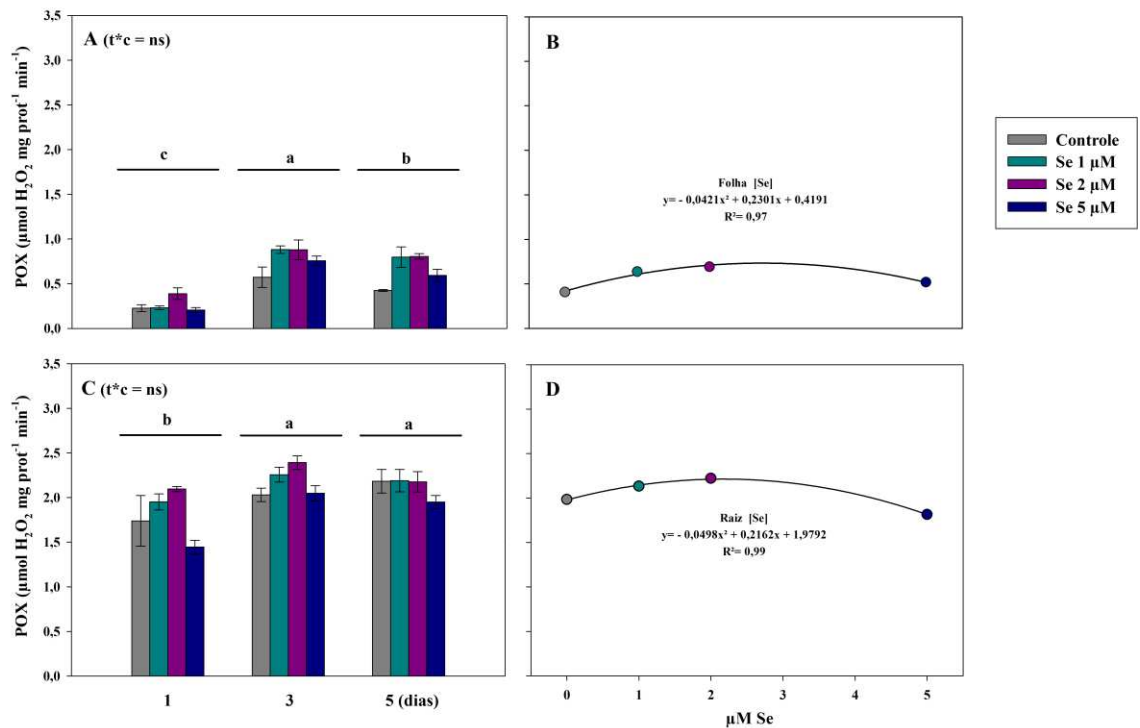


Figura 19. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre a atividade da enzima peroxidase (CAT) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. $t^*c = ns$ indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Em relação à atividade da peroxidase (POX), para as plantas tratadas com selenato de sódio – Figura 20, houve interação significativa entre os fatores tempo*concentração apenas nas raízes. Avaliando os efeitos simples dos fatores nas folhas, observou-se que não houve diferenças significativas em relação o fator tempo. Já para o fator concentração, as diferenças foram consideradas significativas e as curvas de regressão indicam aumentos na atividade da peroxidase até 2 µM de Se em solução. A partir dessa concentração, a regressão indica queda na atividade da POX. Nas raízes, quando o fator tempo de exposição dentro dos níveis de concentração foi desdobrado, observou-se que todos os tratamentos exibiram aumentos na atividade enzimática no quinto dia de exposição, na ordem de 161% para controle, 141 % para 1 µM, 106 % para 2 µM e 63 % para 5 µM de Se em solução. Ao julgar o efeito do fator concentração dentro dos níveis de tempo, observou-se diferenças significativas aos três e cinco dias de tratamento. Os gráficos de regressão indicaram aumentos na atividade da POX nas plantas expostas a 1 e 2 µM e redução da mesma em concentrações superiores.

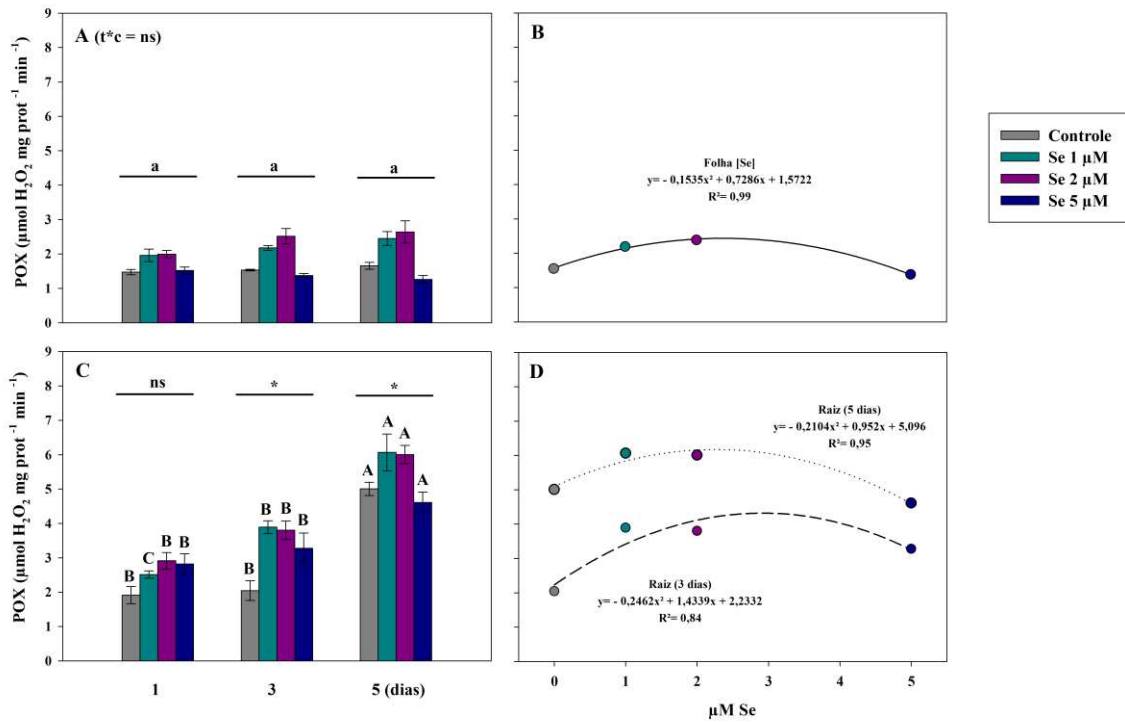


Figura 20. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre a atividade da enzima peroxidase (POX) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. $t^*c = ns$, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

A atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) em resposta ao para selenito de sódio – Figura 21, apresentou interação significativa entre os fatores tempo*concentração. Ao avaliarmos o fator tempo dentro dos níveis de concentração nas folhas, plantas expostas os tratamentos 1 e 2 μM de Se apresentaram aumentos de 40 e 44 %, respectivamente, na atividade enzimática no quinto dia de exposição, enquanto àquelas do controle e as tratadas com 5 μM não indicaram diferenças significativas. Para as raízes, os incrementos na atividade enzimática foram de 20, 49 e 59 % para os tratamentos controle, 1 e 2 μM de Se, respectivamente, no quinto dia de exposição, enquanto as tratadas com 5 μM apresentaram redução de 21 % nessa mesma análise.

Quando o fator concentração dentro dos diferentes níveis de tempo foi investigado, as folhas exibiram diferenças significativas em todos os tempos, enquanto raízes apenas nos tempos 3 e 5 de exposição. As curvas de regressão, para folhas e raízes evidenciaram comportamento similar às das demais enzimas, mostrando aumentos na atividade enzimática associados às concentrações até 2 μM de Se, com posterior redução com o aumento das concentrações de Se em solução.

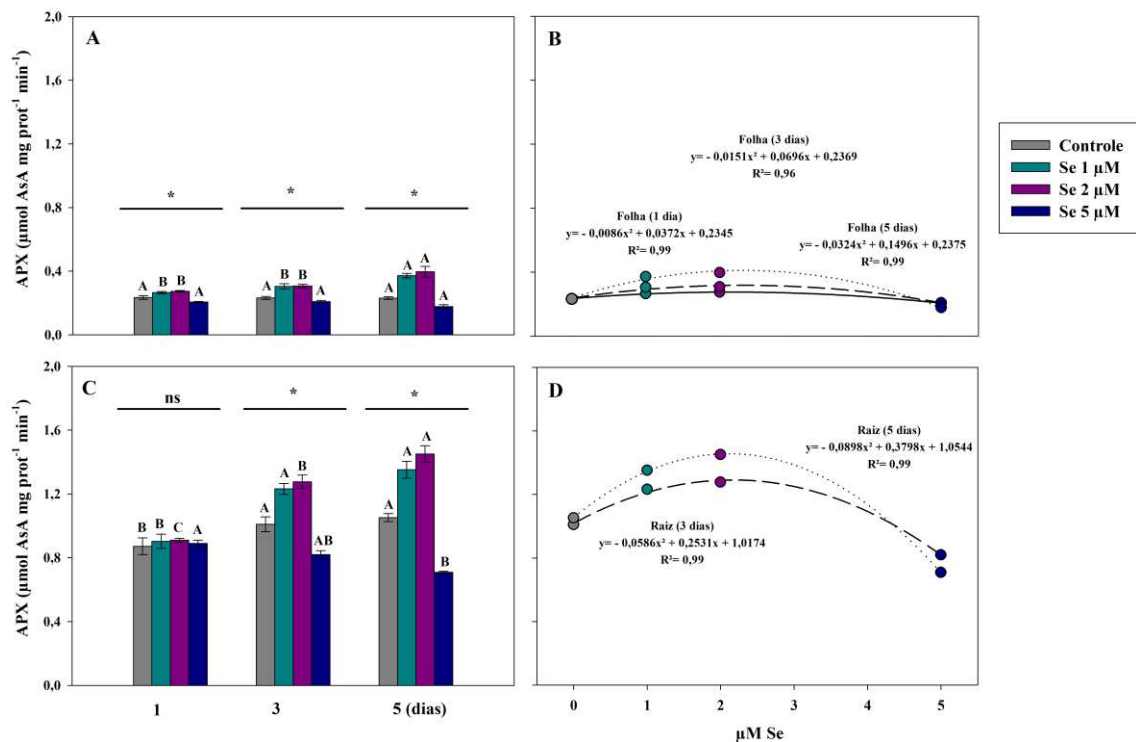


Figura 21. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre a atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

Para a atividade da peroxidase do ascorbato em plantas expostas ao selenato de sódio – Figura 22, a interação entre os fatores tempo*concentração só foi significativa nas raízes. Ao avaliarmos os efeitos simples dos tratamentos nas folhas, notou-se que não houve diferenças estatísticas quando avaliamos o fator tempo. Para o fator concentração, as diferenças foram significativas, como aponta as curvas de regressão, indicando aumentos na atividade da APX

até concentrações próximas a 2 μM de Se e reduções em concentrações mais elevadas, atingindo as menores taxas em 5 μM de Se em solução.

Nas raízes, ao desdobrarmos o fator tempo dentro dos níveis de concentração, podemos observar que as plantas submetidas aos tratamentos controle e 5 μM de Se não apresentaram diferenças significativas, enquanto àquelas submetidas a 1 e 2 μM indicaram aumentos de 40 e 49 %, respectivamente, na atividade da APX no quinto dia de exposição. Ao avaliarmos o fator concentração dentro dos tempos de exposição, verificaram-se diferenças significativas nos tempos três e cinco dias. Os gráficos de regressão apontam tendência de aumento da atividade dessa enzima nas raízes até concentrações próximas a 2 μM e, a partir dela, a propensão foi de redução na atividade enzimática.

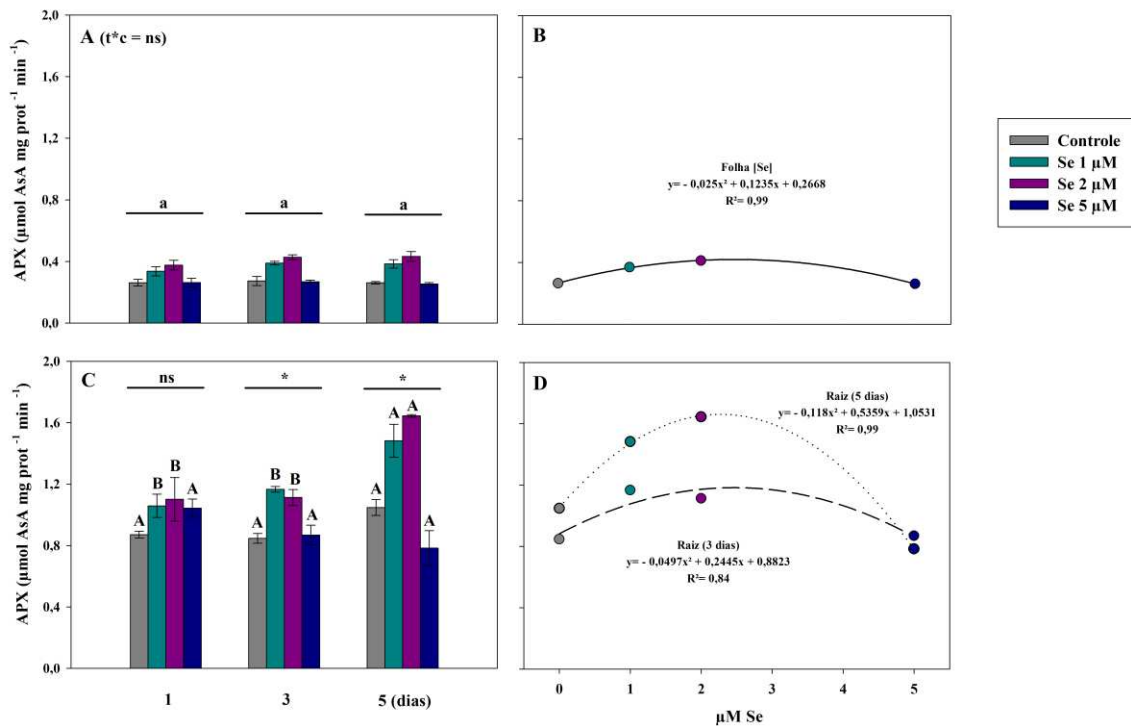


Figura 22. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre a atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. $t^*c = ns$, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das

regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Sistema antioxidante não enzimático

Ao investigarmos os teores de ácido ascórbico total (AsA-T) para selenito de sódio (Figura 23), a interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa. Levando-se em conta o fator tempo dentro dos níveis de concentração, as folhas das plantas submetidas aos tratamentos com 1 e 2 μM de Se (23 A) apresentaram incrementos de 8 e 10 %, respectivamente, nos teores de AsA-T a partir do terceiro dia, enquanto àquelas nos tratamentos controle e 5 μM não sofreram alterações. Para raízes (23 C), os tratamentos controle, 1 e 2 μM de Se apresentaram incrementos 10, 13 e 13 %, respectivamente, nos teores de AsA-T a partir do terceiro dia, enquanto as plantas na presença de Se 5 μM não exibiram diferenças significativas.

Ao se investigar as concentrações de selenito de sódio dentro dos tempos de exposição, diferenças significativas, tanto nas folhas como nas raízes, se deram nos dias 3 e 5 de tratamento. As curvas de regressão mostraram tendências de aumentos nos teores de AsA-T nas folhas das plantas submetidas aos tratamentos até 2 μM de Se. A partir desse ponto, os aumentos nas concentrações de Se resultaram em reduções nos teores de AsA-T, independentemente do órgão da planta ou do tempo de exposição (23 B e 23 D).

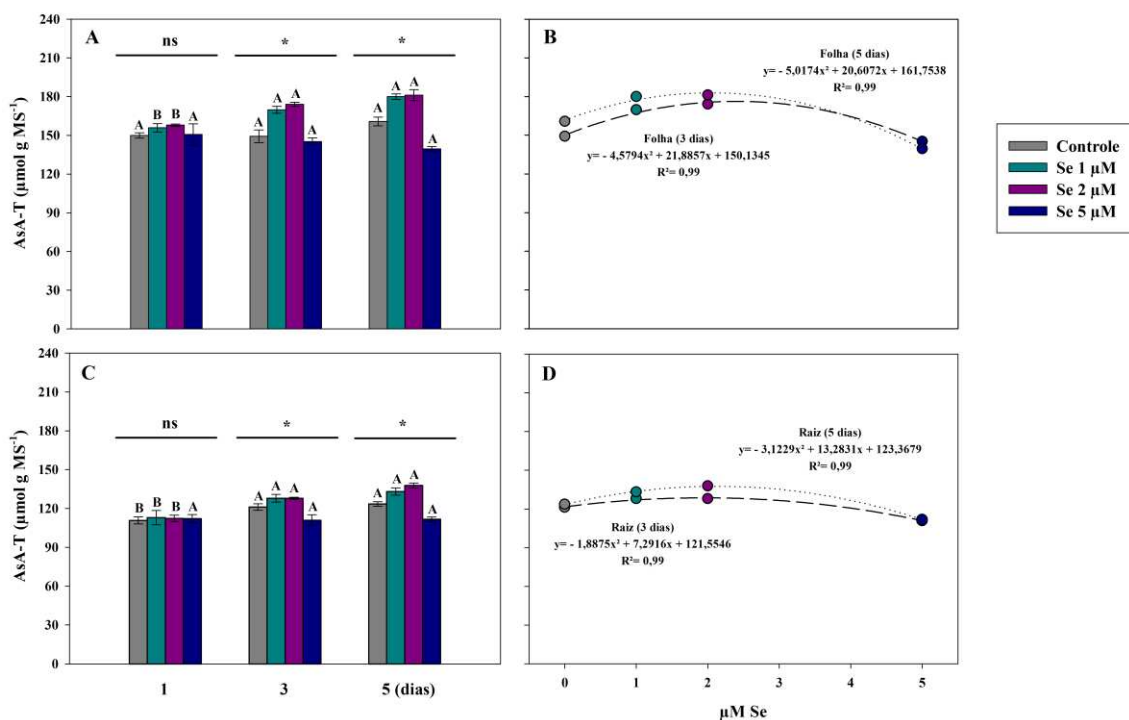


Figura 23. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre os teores de ascorbato total (AsA-T) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

Em referência aos teores de ascorbato total (AsA-T) para plantas tratadas com selenito de sódio (Figura 24), a interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa. Ao analisarmos o fator tempo em diferentes níveis de concentração, tanto para folhas (Figura 24 A) quanto para raízes (Figura 24 C), apenas as plantas expostas a 5 μM de selenito de sódio apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Especificamente, observou-se uma redução de 14% nos teores de ácido ascórbico total (AsA-T) nas folhas e de 21% nas raízes no quinto dia de exposição. Avaliando os desdobramentos do fator concentração dentro dos tempos de exposição, tanto nas folhas quanto nas raízes, diferenças significativas foram detectadas apenas no quinto dia de exposição. Os gráficos de regressão (24 B) revelaram aumentos nos teores de AsA-T em paralelo ao aumento das concentrações de Se até 2 μM , com posterior redução em concentrações mais elevadas.

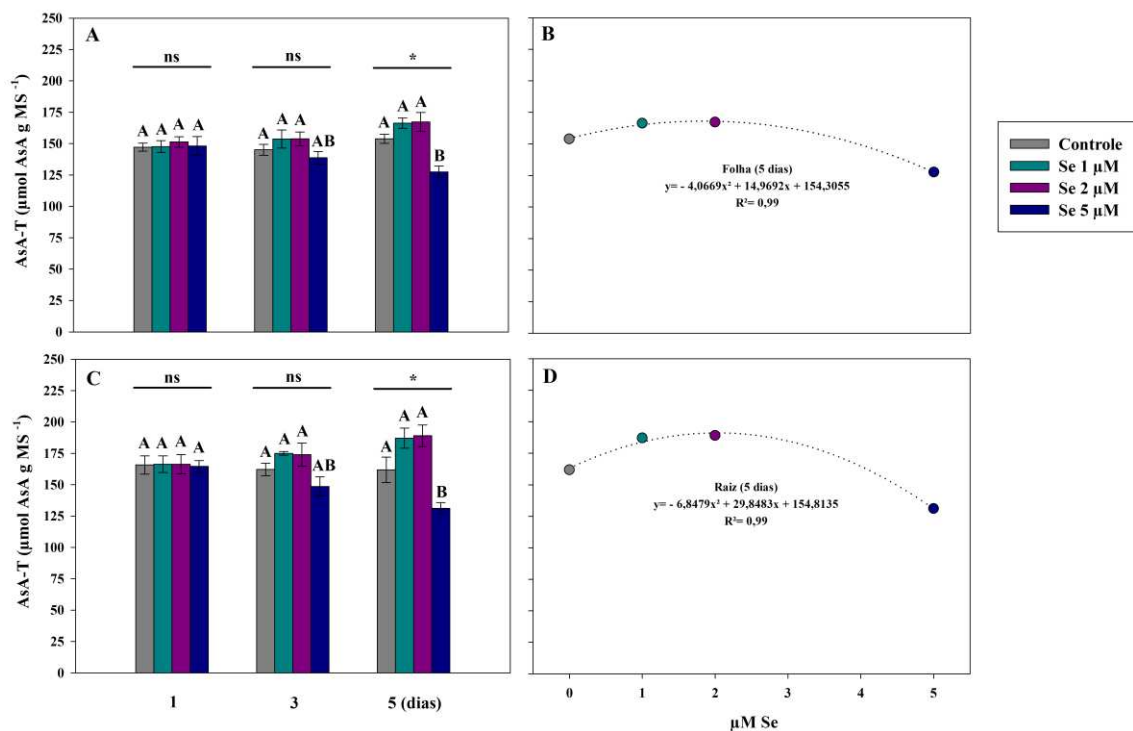


Figura 24. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre os teores de ascorbato total (AsA-T) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

Ao avaliarmos os teores de ácido ascórbico reduzido (AsA-R) nas plantas tratadas com selenito de sódio (Figura 25), observou-se interação significativa entre os fatores tempo*concentração apenas nas folhas. Considerando-se o fator tempo dentro dos níveis de concentração, houve incremento nos níveis de AsA-R nas folhas das plantas expostas aos tratamentos contendo 1 e 2 μM de Se ao quinto dia na ordem de 15 e 13 %, respectivamente (25 A). Quando consideramos o fator concentração dentro dos níveis de tempo, as diferenças foram significativas no 1º e 5º dias de exposição. As curvas de regressão para o primeiro dia (25 B) exibiram tendências de aumento das concentrações de AsA-R em resposta ao aumento das concentrações de Se. Já no quinto dia de exposição, esse comportamento se modificou, com as curvas apresentando tendências de redução dos teores em resposta ao aumento das concentrações de Se nos tratamentos.

Para as raízes (25 C), ao avaliarmos os efeitos simples do fator tempo sobre os tratamentos, observamos incrementos dos teores de AsA-R com o passar dos dias, atingindo seu maior valor no quinto dia. Os efeitos simples das concentrações de Se não foram significativos.

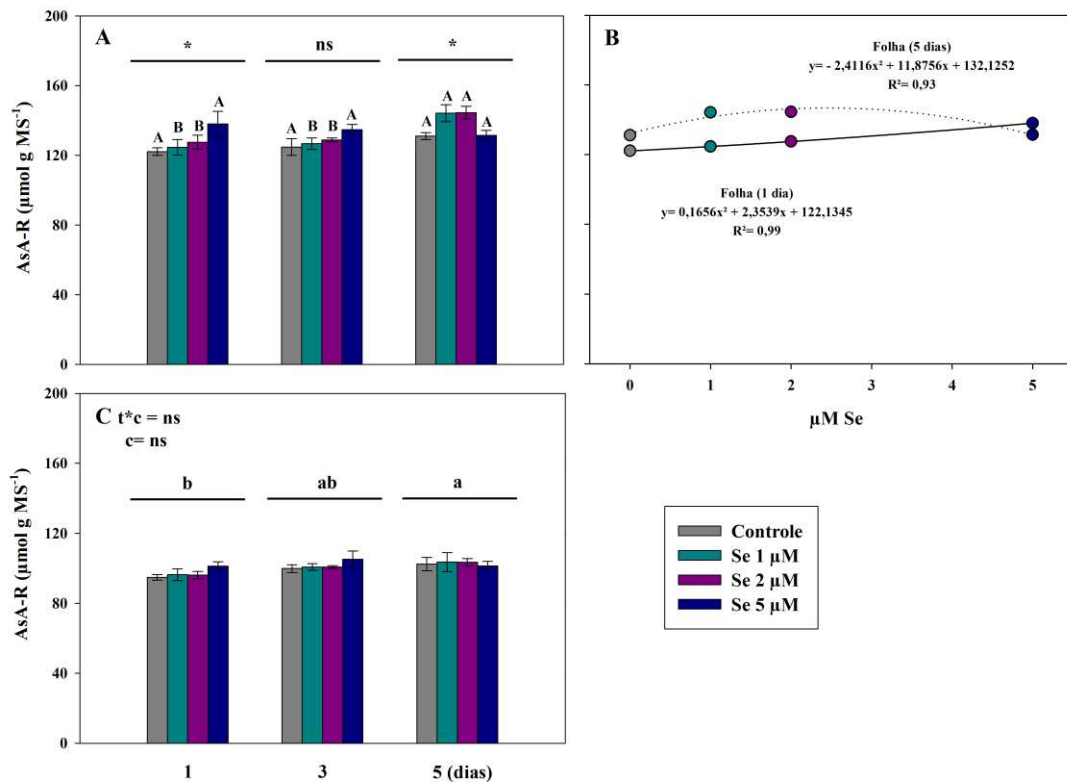


Figura 25. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre os teores de ácido ascórbico reduzido (AsA-R) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. $t^*c = ns$, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$), $c = ns$, indica que não houve diferença significativa no efeito simples do fator concentração, e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Ao avaliarmos os teores de ascorbato reduzido (AsA-R) para as plantas tratadas com selenato de sódio (Figura 26), não observamos interação significativa entre os fatores tempo*concentração. Para as folhas (24A), ao analisarmos os efeitos simples dos fatores, não se verificou diferenças significativas entre os tratamentos em nenhum dos dois fatores (tempo ou concentração). Nas raízes (26 B), apenas o fator concentração diferiu significativamente entre os tratamentos, e o gráfico de regressão (26 C) indicou tendência de redução dos teores

de AsA-R em resposta ao aumento da concentração de Se até 2 μM , mas, a partir desse ponto, aumentos até se alcançar 5 μM .

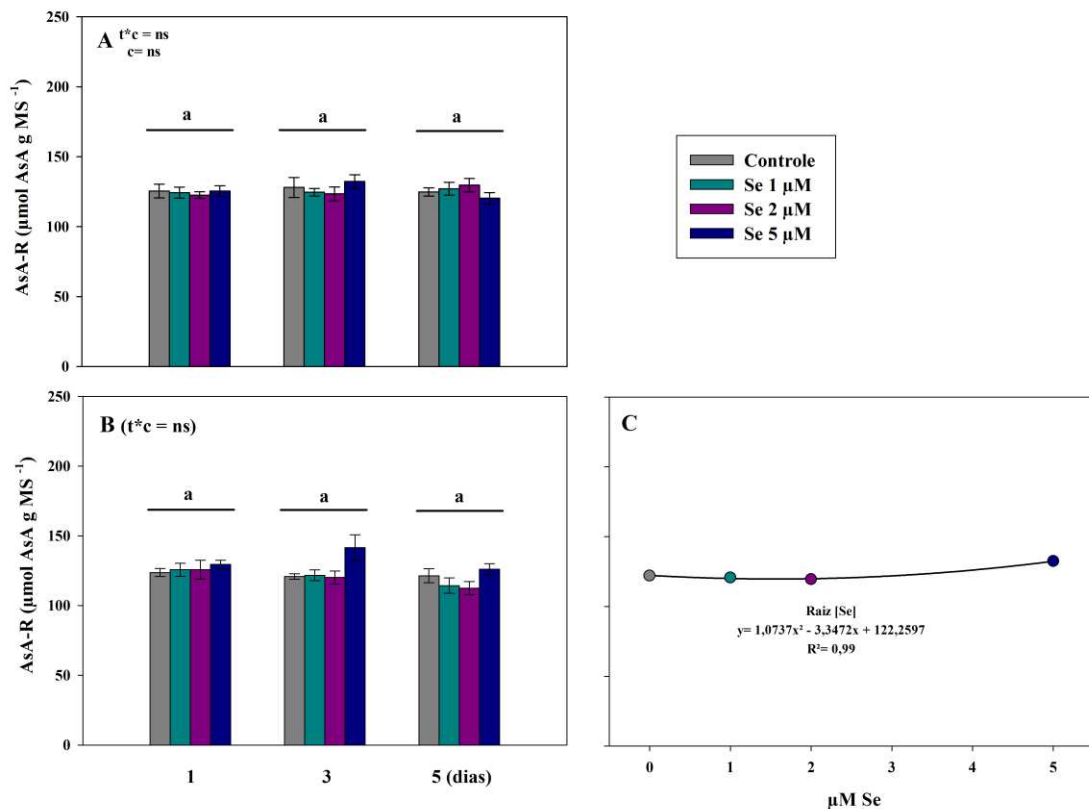


Figura 26. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre os teores de ácido ascórbico reduzido (AsA-R) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. $t^*c = ns$, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$), $c = ns$, indica que não houve diferença significativa no efeito simples do fator concentração, e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Os teores de dehidroascorbato (DHA) em resposta ao selenito de sódio podem ser observados na Figura 27. Considerando os conteúdos de DHA, observou-se que a interação tempo*concentração foi significativa, tanto nas folhas (27 A) quanto nas raízes (27 C). Ao avaliarmos o fator tempo dentro das diferentes concentrações, notamos que, tanto para folhas quanto para raízes, plantas expostas aos tratamentos controle e 5 μM de Se não apresentaram diferenças significativas, enquanto àquelas expostas aos tratamentos 1 e 2 μM de Se em solução tiveram os teores de DHA aumentados, respectivamente, em 37 e 49 % para folhas, 63 e 67 % para raízes, a partir do terceiro dia de exposição.

Ao se avaliar o fator concentração dentro de cada um dos tempos de exposição, verificou-se interação significativa nos 3 tempos de análise, para folhas, e aos três e cinco dias para as raízes. As curvas de regressão (27 B e D) mostraram, independente do órgão e do período de exposição, tendências de aumentos nos teores de DHA até a concentração de 2 μM de Se, seguido de reduções associadas ao aumento das concentrações de Se nas soluções.

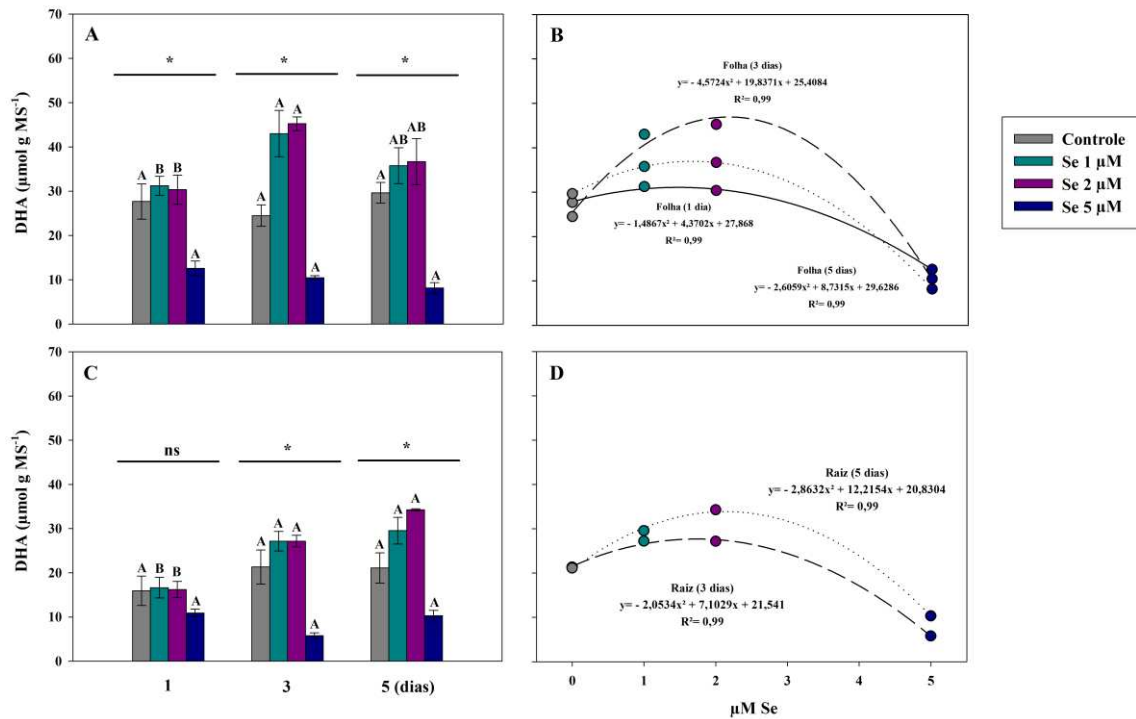


Figura 27. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre os teores de dehidroascorbato (DHA) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. Os ajustes polinomiais de regressão, representam a resposta de cada tempo experimental em função da dose de selênio.

Considerando os teores de dehidroascorbato (DHA) em plantas tratadas com selenito de sódio (Figura 28), apenas as raízes apontaram interação significativa entre tempo*concentração. Nas folhas (28 A), avaliando os efeitos simples do fator tempo, diferenças estatísticas não foram encontradas. No entanto, houve significância estatística quando avaliado o fator concentração, onde as curvas de regressão (28 B) indicam tendência aumentos nos teores de DHA de resposta aos aumentos das concentrações de Se em solução

até 2 μM . A partir desse ponto, os teores começam a diminuir até alcançar o menor patamar em 5 μM .

Para raízes (28 C), avaliando os efeitos do fator tempo dentro dos níveis de concentração, notou-se que as plantas tratadas com 1 e 2 μM de Se apresentaram incremento de 50 e 88 %, respectivamente, na concentração de DHA no quinto dia de exposição, enquanto àquelas tratadas com 5 μM apresentaram redução de mais de 80% a partir do terceiro dia de exposição. Para controle, não foram observadas diferenças significativas. Ao desdobrarmos os efeitos do fator concentração dentro dos tempos de exposição, os efeitos significativos foram observados em três e cinco dias de exposição aos tratamentos. Os gráficos de regressão (28 D) sugerem aumentos na concentração de DHA em raízes em consonância ao incremento na concentração de Se em solução até se alcançar 2 μM . A partir desse ponto, os teores de DHA começaram a cair até chegarem a seu menor estágio em 5 μM .

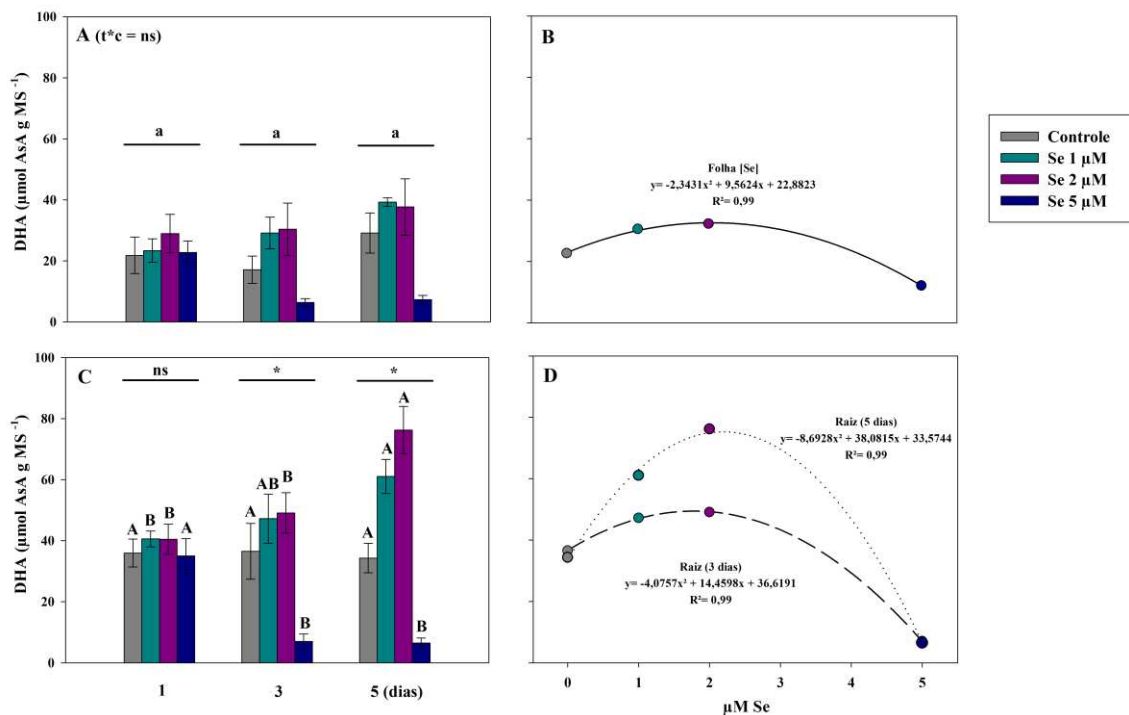


Figura 28. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre os teores de dehidroascorbato (DHA) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. t*c= ns, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula,

não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

Ao avaliarmos a concentração de tióis totais (-SHT) nas plantas tratadas com selenito de sódio (Figura 29), a interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa apenas para raízes. Nas folhas (29 A), avaliando os efeitos simples do fator tempo, foram observados maiores incrementos nos teores de -SHT no terceiro dia e, o menor, no primeiro dia. Para o efeito simples do fator concentração, a regressão polinomial (29 B) indicou tendência de aumento nos teores de -SHT em consonância com aumentos nas concentrações de selênio em solução.

Em raízes (29 C), quando se avaliou o fator tempo dentro das concentrações, plantas expostas aos tratamentos controle, 2 e 5 μM de Se não apresentaram diferenças no quinto dia, enquanto àquelas tratadas com 1 μM sofreram redução de 23 % nos teores de -SHT. Avaliando o fator concentração dentro dos níveis de tempo, houve diferença significativa entre os tratamentos com 1 e 3 dias de exposição. A curva de regressão (29 D) para exposição por 1 dia indicou tendência de aumento nos teores de -SHT em resposta ao aumento das concentrações de Se em solução até 2 μM , seguido de queda em concentrações maiores, enquanto para o 3º dia, a regressão apontou aumentos nesses teores consoante com o aumento de Se na solução.

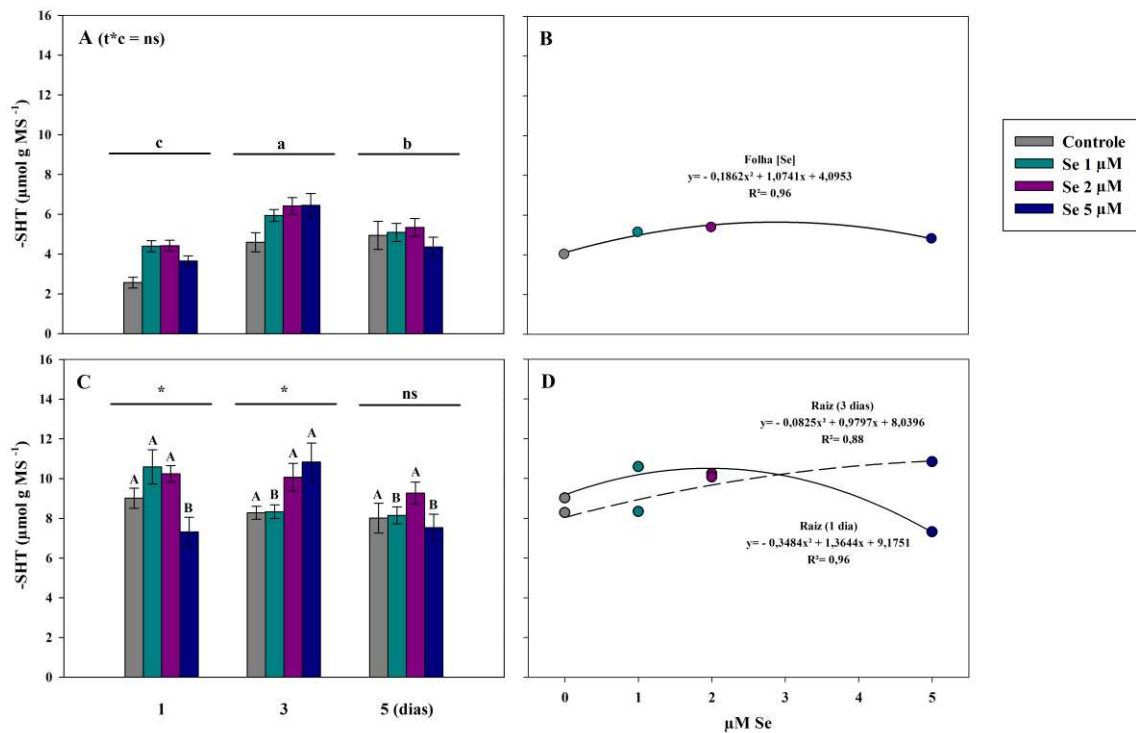


Figura 29. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre os teores de tióis totais (-SHT) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. t*c= ns, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

No que se diz respeito aos teores de tióis totais (-SHT) em resposta ao selenato de sódio, (Figura 30), a interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa apenas para folhas. Desdobrando os efeitos do fator tempo dentro dos níveis de concentração nas folhas (30 A), as plantas submetidas ao tratamento controle não apresentaram diferenças significativas. Aquelas expostas a 1 e 2 μM de Se tiveram aumentos de 34 e 38 %, respectivamente, nos teores de -SHT no quinto dia, enquanto às expostas a 5 μM sofreram redução de 22 %. Quando avaliado o fator concentração dentro dos tempos de exposição, as diferenças significativas foram observadas aos três e cinco dias de submissão. As curvas de regressão (30 B) apontaram tendência de aumentos na concentração dos tióis totais nas folhas até concentrações próximas a 2 μM , mas, a partir dela, a propensão foi de redução até 5 μM de Se.

Para raízes (30 C), analisando os efeitos simples dos fatores, não houve diferença significativa entre os tratamentos quando se avaliou o fator tempo. Já para o fator concentração, a diferença entre os tratamentos foi significativa. As curvas de regressão (30 D) indicaram aumentos na concentração de -SHT até 2 μM de Se em solução, com posterior queda em concentrações maiores.

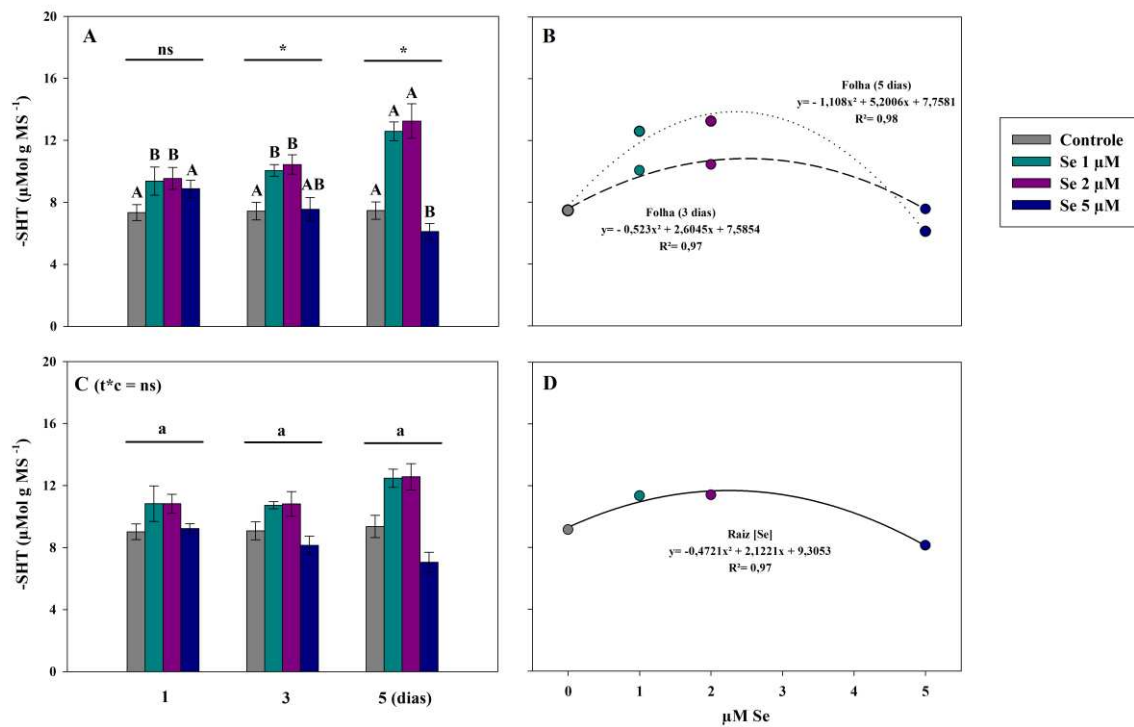


Figura 30. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenato de sódio e tempos de exposição sobre os teores de tióis totais (-SHT) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. t*c= ns, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

A avaliação dos teores de tióis não proteicos (-SHNP) em plantas tratadas com selenito de sódio (Figura 31) encontrou interação significativa entre os fatores tempo*concentração apenas para as raízes. Em folhas (31 A), ao avaliarmos os efeitos simples do fator tempo, os dias 3 e 5 apresentaram os maiores teores de -SHNP, enquanto o efeito simples do fator concentração (31 B) indicou tendência de aumento nos teores desses tióis até a concentração de 2 µM de Se, com subsequente queda em maiores concentrações.

Nas raízes (31 C), ao avaliarmos os efeitos do fator tempo dentro dos níveis de concentração, plantas expostas aos tratamentos controle, 1 e 2 µM de Se não apresentaram diferenças significativas, enquanto as tratadas com 5 µM mostraram aumentos de 40 % nos teores de -SHNP a partir do terceiro dia de exposição. Avaliando o efeito do fator

concentração dentro dos níveis de tempo, houve significância nos três dias de exposição avaliados. As curvas de regressão (31 D), independente do dia avaliado, indicaram aumentos nos teores de -SNHP nas plantas expostas a concentrações de até 2 μM de Se, com posterior queda em concentrações mais elevadas.

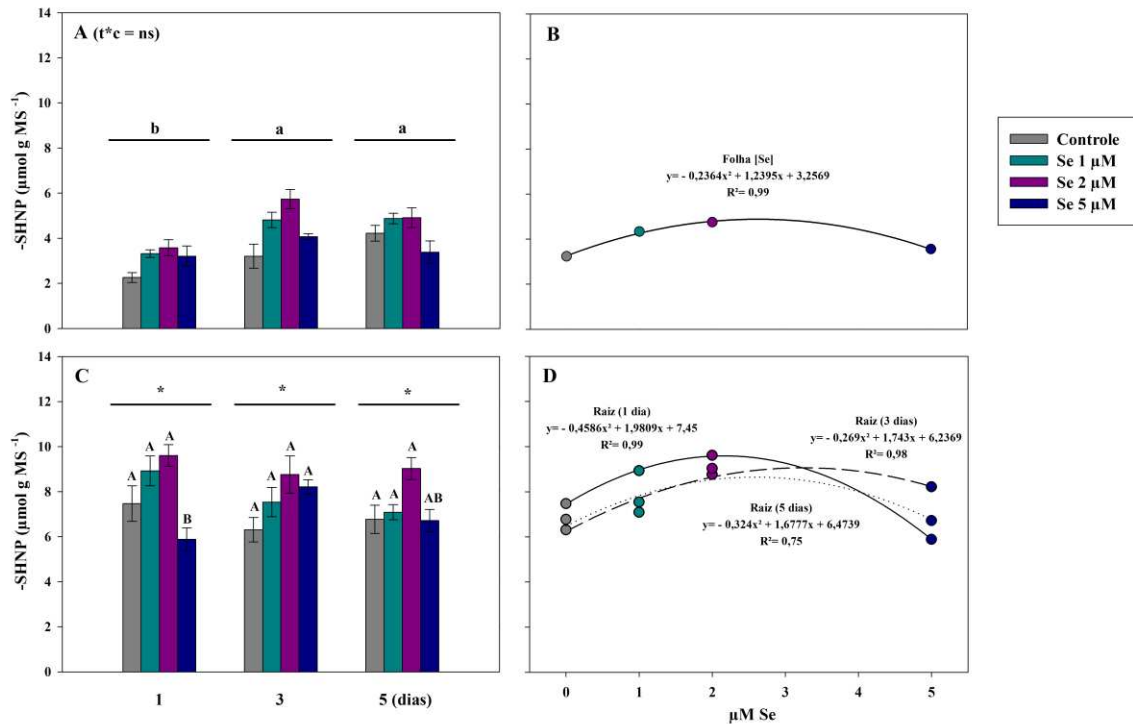


Figura 31. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre os teores de tióis não proteicos (-SHNP) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. $t^*c = ns$, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

No que concerne os teores dos tióis não proteicos (-SHNP) para plantas tratadas com selenato de sódio (Figura 32), a interação entre os fatores tempo*concentração foi significativa apenas para as folhas. Ao desdobrarmos os efeitos do fator tempo dentro dos níveis de concentração em folhas (32 A), as plantas expostas aos tratamentos controle e 5 μM de Se não apresentaram diferenças estatísticas, enquanto àquelas expostas a 1 e 2 μM de Se indicaram aumentos de 44 e 25 %, respectivamente, nos teores de -SHNP no quinto dia de

tratamento. Quando se avaliou os efeitos do fator concentração dentro do tempo, os três níveis apresentaram diferenças significativas. Os gráficos de regressão (32 B), independentemente do tempo de exposição, mostraram tendência de aumento nos teores de -SHNP de acordo com aumento das concentrações de Se até próximo de 2 μM . Acima dessas concentrações, a tendência foi de redução dos teores de -SHNP.

Para as raízes (32 C), ao avaliarmos os efeitos simples dos fatores, diferenças significativas para o fator tempo de exposição não foram observadas. Ao considerarmos o fator concentração, as diferenças entre os tratamentos foram significativas e as curvas de regressão (32 D) apontaram incremento nos teores de -SHNP conforme as concentrações de Se foram aumentadas até 2 μM . Acima dessa concentração, a tendência foi de redução.

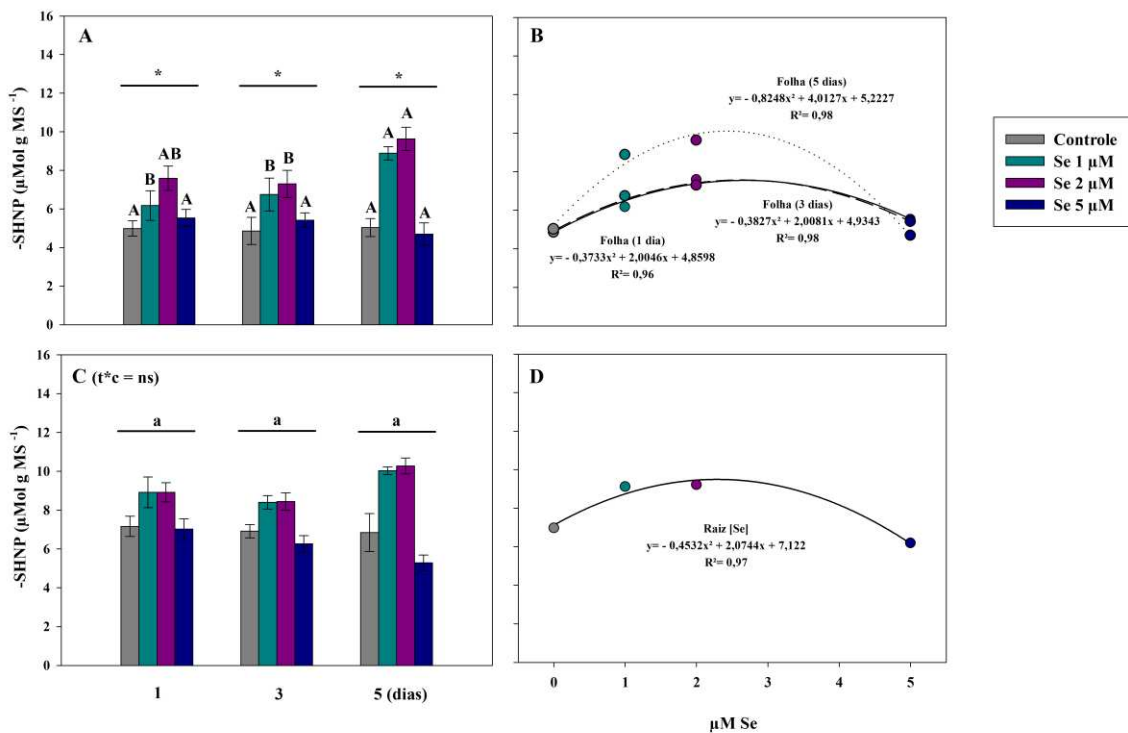


Figura 32. Efeitos da interação de diferentes concentrações de selenito de sódio e tempos de exposição sobre os teores de tióis não proteicos (-SHNP) em folhas (A, B) e raízes (C, D) de *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas comparações entre os tempos experimentais na mesma concentração de selênio pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e (*) representa significância estatística (Tukey, $P \leq 0,05$) das diferentes concentrações de selênio dentro do mesmo tempo. t*c= ns, indica que não houve interação significativa entre os dois fatores, que são avaliados separadamente, onde médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) e os ajustes das regressões polinomiais representam a resposta de todos os tempos experimentais em função da dose de selênio.

4. Discussão

Embora não atenda a todos os princípios estabelecidos por Arnon e Stout (1939) e, portanto, não seja considerado um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, o selênio (Se) pode ser apontado como um elemento benéfico. Em concentrações mais baixas, o Se pode estimular o crescimento (Hawrylak-Nowak et al., 2015; He et al., 2020; Lanza e Reis, 2021), compensar os efeitos tóxicos de outros elementos e/ou simplesmente substituir o S (elemento essencial) em suas funções menos específicas (Taiz et al., 2017). Entretanto, em níveis elevados, o Se pode levar a toxicidade em plantas, alteração metabólica denominada selenose (Gupta e Gupta, 2017; Hawrylak-Nowak et al., 2015; Lv et al., 2021). Em relação à maioria dos vegetais, a janela entre “benéfico x tóxico” para Se é essencialmente pequena, conforme aponta Pilon-Smits (2015), sendo que, plantas capazes de discriminar entre os análogos Se e S, com um metabolismo específico para o Se, possuem uma janela de tolerância maior.

As plantas podem absorver Se tanto na forma de selenito, quanto de selenato. Entretanto, as plantas absorvem mais facilmente Se sob a forma de selenato, uma vez que são espécies químicas mais solúveis; o selenato é absorvido por transportadores de sulfato, que são altamente especializados; além de serem mais móveis nos vegetais que o selenito (Adebayo et al., 2016; Arvy, 1993; Mitra et al., 2023; Zhou et al., 2020).

O enxofre é um elemento que desempenha papel essencial em processos antioxidantes vitais para a defesa contra estresses oxidativos, participando na síntese de tióis, glutatona e fitoquelatinas (Chorianopoulou & Bouranis, 2022; Li et al., 2020; Narayan et al., 2023) e; na composição e ativação de enzimas antioxidantes, como GPX e GR (Li et al., 2020; Narayan et al., 2023). Os nossos resultados sugerem uma estabilidade na absorção e translocação de enxofre para as folhas, enquanto nas raízes o tempo de exposição ao selênio parece influenciar a concentração desse elemento. Abdalla et al., (2022) demonstraram efeitos sinérgicos entre Se e S, indicando que o Se pode induzir a expressão e a atividade dos transportadores de sulfato que podem ser responsáveis pelo aumento da absorção de S pelas plantas (Boldrin et al., 2013; Trippe & Pilon-Smits, 2021).

A dualidade dos efeitos benéficos ou prejudiciais do Se afetou, de forma distinta, diversos fatores das plantas de *P. stratiotes*. Os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) foram incrementados em níveis baixos de Se, até 2 μM , independente da fonte. Silva et al. (2020) demonstraram o papel protetor do Se ao complexo antena melhorando a captação de energia e síntese de pigmentos sendo que, selenito proporcionou maior produção de clorofila *b* e selenato de carotenoides. Além disso, foi demonstrado papel

do selênio na conversão de clorofila *a* em clorofila *b*, com possível participação na estabilização do complexo antena, sendo uma maneira das plantas utilizarem o Se para se adaptar a situações estressantes (Chauhan et al., 2017; Lanza e Reis, 2021; Pilon-Smits, 2015). Por outro lado, em concentrações mais elevadas de Se, os teores de pigmentos foram reduzidos devido à degradação com aparecimento de clorose foliar, denotando efeitos tóxicos desse elemento quando em concentrações acima do ideal (Chauhan et al., 2017; Gouveia et al., 2020; Handa et al., 2019; Silva et al., 2020).

Em concentrações de 1 e 2 μM de Se, independentemente da fonte, os incrementos observados nas taxas de crescimento podem estar associadas ao alongamento e à produção de novas raízes, (Cartes et al., 2010; Haghghi e Silva, 2016; Shekari et al., 2016), ao aumento nos teores de pigmentos e, por consequência, ao estímulo nas taxas fotossintéticas (Lanza e Reis, 2021; Silva et al., 2020; Zhang et al., 2014), levando a condições mais propícias para o crescimento do vegetal. Foi demonstrado que o Se pode atuar como um agente anti senescente e auxiliar na manutenção da integridade celular (Hasanuzzaman et al., 2020; Kaur et al., 2014). Por outro lado, concentrações tóxicas de Se estão associados à redução no crescimento por aumentarem a produção de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, moléculas que contribuem para o aparecimento de cloroses, desagregação celular e perda da capacidade fotossintética, eventos resultantes de danos às proteínas, organelas membranas biológicas, afetando o funcionamento da célula vegetal que, em última instância, podem levar o organismo à morte (Chauhan et al., 2017; Hawrylak-Nowak et al., 2015).

Todavia, independentemente da fonte utilizada, baixas concentrações de Se (até 2 μM) reduziram a concentração de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio), denotando que o sistema antioxidante foi estimulado pelo tratamento. Diversos estudos demonstraram a capacidade do Se em: regular o sistema antioxidante enzimático e não enzimático (Chauhan et al., 2019; Gupta e Gupta, 2017; Handa et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2020; Hernández-Hernández et al., 2019; Silva et al., 2020); estimular a extinção espontânea do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (Chauhan et al., 2019; Silva et al., 2020); e manter a estrutura e função celular (Chauhan et al., 2019; Gupta e Gupta, 2017).

Por outro lado, independentemente da fonte, em concentrações maiores que 5 μM de Se, percebeu-se efeitos deletérios do tratamento com Se pelo aumento das espécies reativas de oxigênio. Diversos estudos elucidaram a toxicidade do Se (Chauhan et al., 2019; Germ et al.,

2007; Gouveia et al., 2020; Gupta e Gupta, 2017; Kolbert et al., 2019; Lv et al., 2021; Pilon-smits, 2015; Pilon-Smits e Quinn, 2010). Esses efeitos ocorrem principalmente porque o Se pode atuar em dois fatores: 1) na malformação de selenoproteínas, devido a incorporação incorreta SeCys/SeMet no lugar de Cys/Met na cadeia proteica. Essa substituição é mais reativa e prejudicial ao funcionamento das proteínas; 2) no estresse oxidativo, uma vez que o Se pode atuar como pró-oxidante e gerar espécies reativas de oxigênio, através da diminuição, por exemplo, dos níveis de glutathiona.

Aumentos nas concentrações das espécies reativas de oxigênio tem efeitos diretos sobre a peroxidação lipídica, que ocorre devido danos às membranas celulares da planta. Tais danos causam perda da integridade celular, extravasamento de substâncias celulares, afetando o crescimento e desenvolvimento do vegetal (Taiz et al., 2017). Com a redução das espécies reativas de oxigênio nas concentrações de até 2 μM de Se, os níveis de MDA, um biomarcador da peroxidação lipídica, também foram reduzidos. Por outro lado, incrementos na concentração de Se aumentaram os níveis de ROS e de MDA nas plantas. Estudos anteriores (Gouveia et al., 2020; Gupta e Gupta, 2017; Hasanuzzaman et al., 2020; Hawrylak-Nowak et al., 2015, 2014; Silva et al., 2020) encontraram diferenças entre os efeitos de concentrações crescentes de Se sob os níveis de MDA em plantas.

Por outro lado, o sistema antioxidante enzimático que compreende enzimas como: a SOD, que atua sobre o radical ânion superóxido catalisando a dismutação em peróxido de hidrogênio e oxigênio, reação essencial para proteger as células dos ataques dos radicais livres; a CAT, enzima responsável por converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, evitando os danos oxidativos; a POX, uma classe de enzimas que atua como agente que catalisa a reação de oxidação de um substrato fenólico utilizando o peróxido de hidrogênio; a APX, uma subclasse das peroxidases, que utiliza o ácido ascórbico (vitamina C) como doador de elétrons, tendo função adicional em sua homeostase, já que se trata de um importante antioxidante não enzimático presente em células vegetais (Elavarthi e Martin, 2010; Giannopolitis e Ries, 1977; Peixoto et al., 1999), foram afetadas de forma diferencial pelos tratamentos.

O estímulo à atividade dessas enzimas foi relacionado diretamente com concentrações mais baixas de Se (>2 μM) demonstrando, mais uma vez, o papel protetor e benéfico desse elemento ao sistema antioxidante quando em baixas concentrações. Diversos autores (Chauhan et al., 2019; Gupta e Gupta, 2017; Handa et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2020, 2014; Hernández-Hernández et al., 2019; Morales-Espinoza et al., 2019; Pilon-Smits, 2015;

Silva et al., 2020) relataram aumentos na atividade enzimática uma vez que o Se é responsável pela estabilização e regulação de enzimas; está diretamente ligado à síntese de aminoácidos que, indiretamente, está relacionada à síntese de novas enzimas; além de poder se ligar a sítios enzimáticos específicos que estimulam a atividade enzimática. Em concentrações mais elevadas de Se ($<5 \mu\text{M}$), a exacerbada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), aparece como fator determinante para redução da atividade enzimática. É sabido que, em concentrações elevadas, as ROS são responsáveis pela degradação de diversos compostos celulares, incluindo as enzimas. Outro ponto que pode ter interferido na ação dessas enzimas é a concentração do Se acima do ótimo, uma vez que esse elemento é responsável pela má formação de enzimas, reduzindo o seu funcionamento (Chauhan et al., 2019; Germ et al., 2007; Gouveia et al., 2020; Gupta e Gupta, 2017; Kolbert et al., 2019; Lv et al., 2021; Pilon-Smits, 2015; Pilon-Smits e Quinn, 2010).

De forma similar ao sistema antioxidante enzimático, o ácido ascórbico é um importante antioxidante não enzimático em plantas, desempenhando papel fundamental na manutenção da homeostase redox do vegetal. Esse agente pode atuar em duas frentes no sistema: - diretamente na neutralização das espécies reativas de oxigênio ou - como substrato de enzimas (APX) que atuam nessa função. Portanto, os níveis de AsA na planta é uma variável importante para aumento da tolerância à estresses oxidativos (Chauhan et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2020, 2019). Além disso, a oxidação dos *pools* de AsA para sua forma oxidada de dehidroascorbato (DHA) está associado com elevado grau de oxidação do interior das células, sendo assim importante marcador celular de estresse (Potters et al., 2002). Portanto, o funcionamento adequado do ciclo entre AsA-R e DHA é uma estratégia importante para manter um *pool* ativo de ascorbato nas células vegetais.

Plantas tratadas com doses mais baixas de Se, seja na forma de selenito ou selenato, tiveram incremento nos níveis de AsA-T, demonstrando o papel do selênio como ativador desse sistema. Já em concentrações mais elevadas, o aumento nas concentrações de AsA-R pode estar relacionado mecanismos metabólicos de ajuste da planta visando lidar com o estresse oxidativo causado pela elevada formação de espécies reativas de oxigênio do tratamento com Se. Em seus estudos, Handa et al. 2019, Hasanuzzaman et al. (2020), He et al. (2020), Hernández-Hernández et al. (2019) e Lanza e Reis (2021) demonstraram o papel do Se sobre o status de ácido ascórbico em vegetais, indicando que o aumento da atividade de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, ao qual o Se está diretamente envolvido, bem como o aumento da síntese de zeaxantina, é essencial para manter o pool de ascorbato na planta.

Outros compostos, como os tióis, moléculas que contém -SH em sua composição, desempenham papel antioxidante importante, seja neutralizando espécies reativas de oxigênio; compondo enzimas do sistema antioxidante; ou formando compostos, como a glutatona e fitoquelatinas, que são responsáveis por proteger as plantas contra danos oxidativos e pela quelação e imobilização de substâncias tóxicas, como os metais pesados. Já os tióis não proteicos, que correspondem àqueles não estão ligados às proteínas, tem como forma mais abundante nas plantas a glutatona, que desempenha papel importante na regulação do equilíbrio redox e no metabolismo celular das plantas (Cui et al., 2020; Droux, 2004; Li et al., 2020; Marinho, 2003). O aumento das concentrações de tióis nas plantas tratadas com concentrações mais baixas de Se pode estar relacionado à sua semelhança química com o enxofre (S), sendo o selênio capaz de substituí-lo em diversas moléculas no vegetal. O grupamento -SH (tiol), pode ter a molécula de S trocada por Se, formando um grupamento -SeH (selenotiol). Esse composto, que não é diferenciado pela maioria dos vegetais, desempenha função semelhante no metabolismo antioxidante do vegetal, sendo responsável pela formação de glutatona e fitoquelatinas e pelo aumento na síntese e atividade de enzimas envolvidas na extinção de espécies reativas de oxigênio (Handa et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2020; Hawrylak-Nowak et al., 2015; Hernández-Hernández et al., 2019; Lanza e Reis, 2021; Pilon-Smits, 2015; Pilon-Smits e Quinn, 2010).

5. Conclusões

A suplementação com selênio, tendo como fonte o selenito ou selenato de sódio, aplicado via solução nutritiva, visando à rustificação de plantas de *P. stratiotes*, é uma alternativa promissora para o aumento da capacidade fitorremediadora dessa espécie, uma vez que, utilizando-se de dosagem e tempo de exposição adequados, foi observado o aumento da atividade antioxidante das plantas, sobretudo por induzir incrementos nas atividades de enzimas responsáveis pela catálise de espécies reativas de oxigênio, bem como aumentos nos teores de compostos antioxidantes não-enzimáticos (ascorbato), que desempenham papéis importantes na manutenção do status redox da planta.

Todavia, o Se, quando aplicado em concentrações elevadas e em exposição por tempo prolongado, pode levar as plantas a um estresse oxidativo e, conseqüentemente, à morte. Por reduzirem o crescimento, os teores de pigmentos, as atividades das enzimas antioxidantes e o sistema antioxidante não enzimático, concentrações de Se superiores a 5 μM e mais do que 3 dias de exposição foram consideradas condições tóxicas e prejudiciais para as plantas. Portanto, recomenda-se a utilização de **2 μM de Se por 5 dias** de exposição para ganho da capacidade antioxidante do vegetal.

CAPÍTULO II: POTENCIAL FITORREMEIADOR DE *Pistia stratiotes* FORTIFICADAS COM DIFERENTES FONTES DE SELÊNIO E SUBMETIDAS A ESTRESSE POR ARSÊNIO

1. Introdução

As atividades de mineração, de modo geral, podem causar diversos impactos ambientais, desde a implantação da unidade, onde se faz necessário a supressão da vegetação nativa e a remoção do solo superficial, até o estabelecimento de barragens e lixiviação de rejeitos, que representam riscos potenciais. O Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais, Brasil, é uma região muito afetada pela intensa atividade de mineração de ferro e, também, pela extração do ouro, com consequente liberação de As no solo e nos cursos d'água (Campolina et al., 2024; Oliveira et al., 2023).

O As encontra-se associado aos minerais do solo, na forma de arsenopiritas, o qual, durante as atividades minerárias, pode ser facilmente disperso no sistema aquático e acumular em organismos vivos, resultando em diversas alterações bioquímicas, morfológicas e fisiológicas (Ganie et al., 2024; Kwon et al., 2010). Nas plantas, o As age interrompendo funções biológicas pela ligação a proteínas, interferindo em suas funções (Verma et al., 2016), na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), inibição da respiração, na indução de recombinação homóloga (Helleday et al., 2000), agindo indiretamente como um mutagênico, interferindo na fosforilação oxidativa e na síntese de ATP durante o metabolismo energético, onde substitui o fosfato, desacoplando a síntese de ATP (Beniwal et al., 2023; Verma et al., 2016).

De forma a reduzir os impactos da contaminação por As, há grande interesse não somente em se detectar possíveis contaminações, como, também, encontrar meios que possibilitem a descontaminação do ambiente, e é nesse cenário onde se insere a fitorremediação, que consiste na utilização de plantas para remoção e diminuição de substâncias químicas em determinados ambientes. Em face a sua elevada toxicidade, faz-se necessário a remoção do As do ambiente aquático, o que pode se dar com a utilização de plantas aquáticas. Farnese et al. (2014) avaliaram o papel biodinador e fitorremediador da macrófita aquática *P. stratiotes* em ambientes contaminados com As. Os autores concluíram que a macrófita é uma boa bioindicadora de ambientes contaminados, entretanto, não foi considerada adequada para processo de fitorremediação por As, uma vez que não suportou o estresse causado por esse poluente. Todavia, recentemente Santos-Neves (2020) - dados ainda não publicados - demonstrou o poder fitorremediador dessa planta submetida ao estresse por As, quando associado ao Si, um elemento considerado benéfico.

Considerando esses resultados promissores, torna-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que possam aumentar o potencial fitorremediador das plantas de *P. stratiotes*. Nesse contexto, se insere o Se um elemento considerado não essencial às plantas, pois não atende aos critérios preconizados por Arnon and Stout (1939). Contudo, o Se é considerado um elemento benéfico, uma vez que pode compensar os efeitos tóxicos de outros elementos, além de substituir o enxofre (elemento essencial) em uma de suas funções menos específicas (Taiz et al., 2017).

Além de contribuir para mitigar estresses abióticos, modulando alterações morfofisiológicas na planta (Feng et al., 2021), a suplementação de Se favorece o crescimento, ganho de biomassa e, por meio da volatilização de selenito de dimetila, proteção contra herbivoria (He et al., 2010). Essas alterações envolvem a regulação da produção de fitormônios, como auxina e etileno, de modo a remodelar a arquitetura radicular e limitar a absorção de metais pesados (Feng et al., 2021; Qin et al., 2018; Wu et al., 2017; Zhao et al., 2019). A participação do Se como agente atenuador de estresse abiótico envolve: a indução de enzimas do sistema antioxidante, as quais atuam removendo espécies reativas de oxigênio; e a síntese de fitoquelatinas, importante molécula para imobilização de metais pesados (Cao et al., 2013; Liu et al., 2014; Morales-Espinoza et al., 2019; Rizwan et al., 2020). Além disso, por ser análogo ao enxofre, faz parte de compostos $-SeH$, que complexam e inativam metais pesados (Feng et al., 2021; Wan et al., 2016).

Dessa forma, o processo de rustificação por tratamento prévio com selênio (Se), que estimula a capacidade antioxidante, se mostra como alternativa promissora para aumentar o potencial de remediação de *P. stratiotes* em ambientes contaminados. Sendo assim, objetiva-se com este estudo, a elucidação dos mecanismos de tolerância ao estresse por As induzidos por tratamentos prévios com fontes distintas de Se.

2. Material e Métodos

Obtenção do material vegetal

Espécimes de *P. stratiotes* (Araceae) foram coletadas no lago do horto botânico da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil), desinfetadas com hipoclorito de sódio 1% (v/v) durante 1 min, lavadas em água corrente, transferidas para solução nutritiva de Clark (1975), ½ força iônica, pH 6,5, e mantidas em sala de crescimento de plantas, com intensidade luminosa, temperatura e fotoperíodo controlados ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 12/12 h claro/escuro), por 5 dias, para aclimação às condições experimentais.

Aclimação e aplicação dos tratamentos

Após aclimação, as plantas foram transferidas para recipientes contendo 0,5 L de solução nutritiva de Clark, como descrito anteriormente, distribuídas entre os tratamentos abaixo, para “endurecimento/rustificação” por 5 dias, antes de serem expostas ao As:

1. *Controle*: solução nutritiva;
2. + Se^{IV} : solução nutritiva + [2 μM] Selenito de Sódio;
3. + Se^{VI} : solução nutritiva + [2 μM] Selenato de Sódio;

Passados os dias de endurecimento, as plantas foram transferidas para recipientes contendo 0,5 L de solução nutritiva de Clark + arsenato de sódio (10 μM), onde permaneceram por 3 dias. Na Figura 1, esquema demonstrativo da aplicação dos tratamentos pode ser observado.

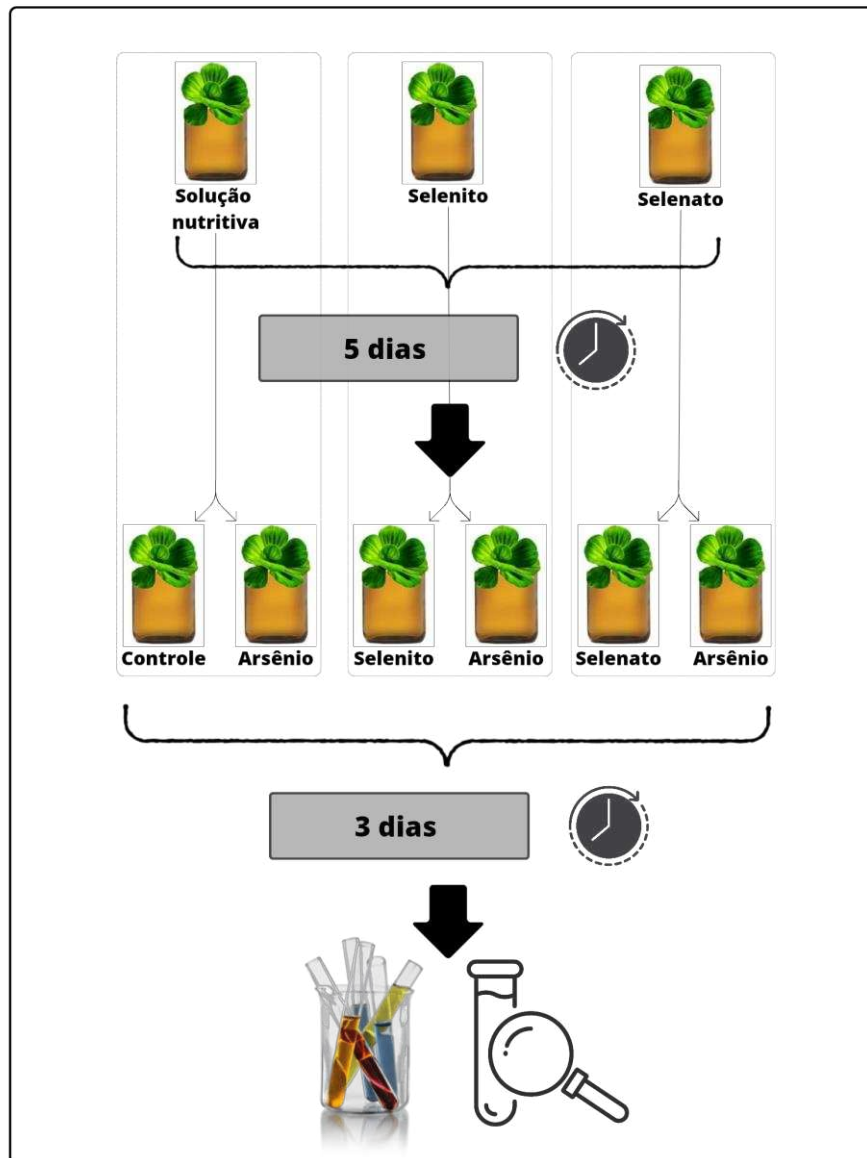


Figura 1. Distribuição dos tratamentos experimentais: concentrações e tempo de exposição de *Pistia stratiotes* a fontes de selênio e arsênio.

Ao final dos períodos de exposição, amostras frescas das folhas (terço médio e totalmente expandidas) e das raízes foram coletadas e mantidas em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises de MDA, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e pigmentos fotossintéticos. Para as demais análises, o material vegetal foi liofilizado, por 96 h até obtenção de peso constante, utilizando o equipamento VirTis® Benchtop 4KBTXL.

Desenho experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 6 tratamentos: Controle, Selenito $2\text{ }\mu\text{M}$, Selenato $2\text{ }\mu\text{M}$, Arsenato $10\text{ }\mu\text{M}$, Selenito-Arsenato, Selenato-Arsenato, com 4 repetições e cada unidade experimental constituída de 1

planta/repetição. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2014) com auxílio do pacote ExpDes.pt.

Determinação da concentração dos elementos minerais

Amostras de raízes e folhas foram coletadas, lavadas em água destilada e mantidas em estufa, a 80 °C, até obtenção de massa seca constante. O material seco foi, então, mineralizado em mistura de ácido nítrico e perclórico (2:1) (Marin et al., 1993) e os teores de Se, S, Fe, Mn, Cu e As nos extratos minerais foram determinados por espectrofotometria de emissão atômica, com plasma indutivamente acoplado (ICP - PerkinElmer® modelo Optima 8300).

Sintomatologia Visual

Após aplicação e exposição aos tratamentos, com auxílio de uma prancha com material escuro, fotos dos vegetais foram tiradas para visualização e comparação dos efeitos dos tratamentos em folhas e raízes.

Ganho relativo de biomassa fresca

Após o período de aclimação e de tratamento, as plantas foram secas em papel absorvente e pesadas em balança analítica para obtenção do peso fresco inicial e peso fresco final. A partir desses dados, o ganho relativo de biomassa fresca de cada planta, em seus respectivos tratamentos, foi calculado através da equação:

$$GRBF = (\ln_{m1} - \ln_{m0} / t_1 - t_0) \times 1000$$

Em que:

GRBF = ganho relativo de biomassa fresca no período ($\text{mg g}^{-1} \text{MF dia}^{-1}$);

\ln_{m1} e \ln_{m0} representam o logaritmo neperiano da massa fresca (g) no final e no início do experimento, respectivamente;

t_1 e t_0 representa a duração do experimento, em dias.

Pigmentos Fotossintéticos

A extração dos pigmentos fotossintéticos foi feita a partir de três discos foliares de 1 cm de diâmetro, obtidos da folha mais jovem completamente expandida, e incubados em 5 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO - saturado por carbonato de cálcio), em tubos do tipo “penicilina”, devidamente tampados e revestidos com papel alumínio, onde ficaram por 24 horas para, em seguida, serem levados ao banho-maria a 65 °C por 45 minutos, para solubilização dos pigmentos. Após esse período, procedeu-se as leituras da absorbância nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm. As leituras obtidas foram utilizadas para a

estimação dos teores de clorofila *a*, *b* e de carotenoides totais (Wellburn, 1994), e os resultados expressos em mg g⁻¹ MF.

$$\text{Clorofila } a = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649})$$

$$\text{Clorofila } b = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665})$$

$$\text{Carotenoides} = [(1000 \times A_{480}) - (1,29 \times Ca) - (53,78 \times Cb)]/220$$

Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido

A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi estimada utilizando-se amostras de 200 mg de folhas e raízes, homogeneizadas em meio de extração (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM) e centrifugadas a 10.000 xg, por 15 minutos, a 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo FeNH₄SO₄ 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000) e mantidas no escuro por 30 minutos. As concentrações de H₂O₂, estimadas com base em curva analítica e leitura de absorvância a 560 nm, foram expressas em µmol de H₂O₂ g⁻¹ MF.

Para determinação da concentração de ânion superóxido (O₂⁻), amostras de 50 mg de folhas e raízes foram incubadas em meio de reação constituído de sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100 µM, NADH 20 µM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). A reação se iniciou com a adição de 100 µL epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 min, seguido de leitura da absorvância a 480 nm, durante 5 minutos. A quantificação da concentração de O₂⁻ utilizou-se o coeficiente de absorvância molar de 4,0 x 10³ M⁻¹ cm⁻¹, sendo expressas em nmol de O₂⁻ g⁻¹ MF (Boveris et al., 2002).

Determinação do acúmulo de MDA via TBARS

Na avaliação da peroxidação lipídica, por meio da concentração de malondialdeído (MDA), amostras de 150 mg de folhas e raízes foram maceradas em 2 mL de etanol 80% e centrifugadas a 10.000 xg, por 10 minutos. Ao sobrenadante, seguiu-se adição de solução com ácido tiobarbitúrico 0,65% (p/v) em TCA 20% (p/v) e de solução contendo apenas TCA 20% (p/v), seguindo de incubação a 95°C, por 30 minutos, e banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura das absorvâncias a 440, 532 e 600 nm. A concentração de MDA-TBA, expressa em µmol de MDA g⁻¹ MF (Hodges et al., 1999), foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$1) [(A_{532+TBA}) - (A_{600+TBA}) - (A_{532-TBA} - A_{600-TBA})] = X$$

$$2) [(A_{440+TBA} - A_{600+TBA}) 0,0571] = Y$$

$$3) \text{MDA (nmol mL}^{-1}\text{)} = (X - Y/157.000) \times 10^6.$$

Avaliação de enzimas do sistema antioxidante

Para determinação das atividades enzimáticas, amostras de 0,03 g folhas e raízes foram maceradas em moinho de bolas e homogeneizadas nos seguintes meios de extração:

- **(SOD)** dismutases do superóxido, **(POX)** peroxidases e **(CAT)** catalases: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (Peixoto et al., 1999);
- **(APX)** peroxidases do ascorbato: tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1,0 mM, ácido ascórbico (AA) 1,0 mM, PMSF 1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM e PVPP 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999).

Após centrifugação a 12.000 xg, por 15 min, a 4°C, os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto e as atividades enzimáticas foram determinadas pela adição do extrato aos seguintes meios de reação:

- SOD: tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Giannopolitis e Ries, 1977; Peixoto et al., 1999);
- POX: tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol mM e H₂O₂ 2 mM (Peixoto et al., 1999);
- CAT: tampão fosfato de potássio 50 mM, H₂O₂ 12,5 mM (Peixoto et al., 1999);
- APX: tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM (Peixoto et al., 1999).

Para determinação da atividade da SOD, as amostras foram mantidas em câmara com iluminação artificial, por 5 minutos, e a absorbância determinada a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a fotorredução do NBT, sendo expresso em U SOD min⁻¹ mg⁻¹ proteína (Giannopolitis e Ries, 1977).

A atividade da POX foi estimada pela leitura da absorbância a 420 nm, durante cinco minutos de reação, utilizando o coeficiente de extinção molar 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Peixoto et al., 1999), sendo expressa em µmol purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da CAT foi estimada pela leitura da absorbância a 240 nm, durante cinco minutos de reação, utilizando o coeficiente de extinção molar 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Peixoto et al., 1999), sendo expressa em mmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da APX foi estimada pela leitura da absorbância a 290 nm, durante cinco minutos de reação, utilizando o coeficiente de extinção molar $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Peixoto et al., 1999), e expressa em $\mu\text{mol AsA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas, para expressão das atividades enzimáticas específicas, seguiu-se o método proposto por Bradford (1976). Em 100 μL do extrato enzimático bruto, adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford e, após 15 min de reação no escuro, procedeu-se a leitura da absorbância a 595 nm. A concentração de proteínas foi estimada com base em curva analítica preparada com padrões autênticos de BSA.

Avaliação de componentes do sistema antioxidante não-enzimático

Compostos tiolados totais (SHT) e não proteicos (SHNP)

Amostras de 15 mg de folhas e raízes foram maceradas, com adição de 2 mL meio de extração constituído de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 1 mM e ácido ascórbico 1% (p/v), seguido de centrifugação a 10000 xg, por 15 minutos, a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para determinação de tióis totais e não proteicos.

Para determinação dos tióis totais, alíquotas de 0,2 mL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação composto por 0,3 mL de tampão Tris-HCl (0,2M e pH 9,2), 0,2 mL do reagente de Ellman [ácido 5,5' – ditio-bis (2-nitrobenzóico)] 0,02 M e 1,48 mL de metanol (Sedlak e Lindsay, 1968). A reação foi encubada por 15 minutos em temperatura ambiente e leitura feita a 412 nm (Sedlak e Lindsay, 1968).

Para determinação dos tióis não-proteicos, alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionados a 0,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) e 0,8 mL de H₂O desionizada, com agitação a cada 5 minutos durante 15 minutos. Em seguida, foram centrifugados a 3000 xg, durante 15 min. Em seguida, alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 1 mL de tampão Tris-HCl (0,4 M e pH 8,8) e 0,25 mL de reagente de Ellman 0,02 M. A reação foi encubada por 5 minutos em temperatura ambiente e leitura feita a 412 nm (Sedlak e Lindsay, 1968).

Utilizando o coeficiente de extinção molar $13.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para ambos os casos, os teores de tióis foram estimados e os resultados expressos em $\text{nmol SH g}^{-1} \text{ MS}$.

Ascorbato total (AsA-T), Ascorbato reduzido (AsA-R) e Dehidroascorbato (DHA)

A determinação da concentração de ascorbato foi realizada através da maceração de 30 mg de folhas e raízes, seguido de homogeneização em 2 mL de TCA 5% (p/v), e centrifugação a 12000 xg por 15 minutos, à 4 °C.

Para determinação da concentração de AsA-T, ao sobrenadante se adicionou meio de reação contendo DTT (10 mM) e tampão fosfato de potássio (0,2 M e pH 7,4), seguido de agitação por um minuto e incubação a 42 °C por 15 minutos. Em seguida, se adicionou N-etilmaleimida (NEM) 0,5 %, com agitação por 1 minuto em temperatura ambiente e adição de TCA 10 % (p/v), ácido fosfórico a 42% (v/v), 2,2' biperidil 4 % (p/v) e FeCl₃ 3% (p/v), seguido de agitação por um minuto e incubação por 40 minutos a 42 °C, seguido de leituras a 525 nm.

Para determinação da concentração de AsA-R, ao sobrenadante se adicionou meio de reação contendo tampão fosfato de potássio (0,2 M e pH 7,4) água deionizada, TCA 10 % (p/v), ácido fosfórico a 42% (v/v), 2,2' biperidil 4 % (p/v) e FeCl₃ 3% (p/v), seguido de agitação por 1 minuto e incubação a 42 °C por 40 minutos e leitura a 525 nm. A concentração de DHA foi obtida subtraindo-se o valor de AsA do T-AsA.

Os teores de ascorbato total, reduzido e dehidroascorbato foram estimados com base em curva analítica com padrões autênticos de ascorbato, sendo os resultados expressos em nmol AsA g⁻¹ MS (Kampfenkel et al., 1995).

3. Resultados

Sintomatologia visual e concentração de Se, As, S, Fe, Mg e Cu nos órgãos vegetais

Após os períodos de aclimação, rustificação e aplicação dos tratamentos, diferenças visuais, sobretudo nas folhas, foram observadas entre os tratamentos. Conforme demonstrado na Figura 1, plantas expostas aos tratamentos controle, selenito (IV) e selenato (VI), não apresentaram nenhum sinal de clorose, necrose ou desestruturação do seu limbo foliar. As setas em azul indicam o aparecimento de novas folhas e coloração verde mais escuro.

Por outro lado, plantas que foram expostas ao As, demonstraram elevado grau de clorose, necrose e desestruturação total do seu limbo foliar, como evidenciado pelas setas vermelhas. Nas plantas que receberam previamente selenito e selenato é notável a manutenção da estrutura celular mais preservada, ainda que alguns sintomas de fitoxidez tenham se tornado evidentes.

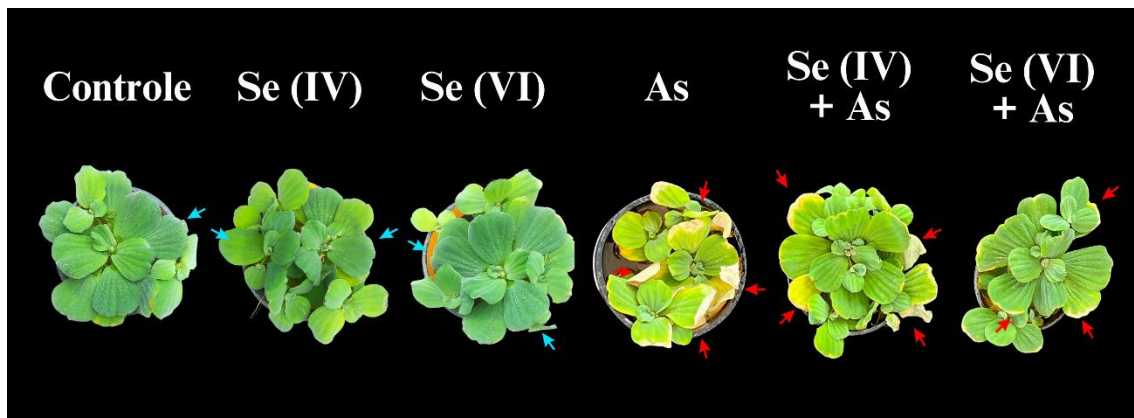


Figura 2. Sintomatologia visual de folhas de *Pistia stratiotes* expostas a tratamentos com Se e As.

Os tratamentos prévios com Se resultaram em significativa redução no acúmulo de As nas plantas, sendo de 35 e 40%, para os tratamentos com selenito e selenato, respectivamente (Figura 3 A). Ao analisarmos as concentrações de Se (Figura 3 B), não foi detectado o mineral nas plantas expostas aos tratamentos controle e com As. Para os demais tratamentos, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas.

Para o conteúdo de S em tecidos vegetais (Figura 3 C), observamos que, nas folhas e nas raízes, as plantas tratadas tanto com selenito, quanto com selenato, apresentaram, em média, um incremento de 25% e 35%, respectivamente, quando comparadas àquelas expostas ao As, seja de forma isolada ou tratada previamente com fontes diversas de Se.

Quanto aos teores de Fe nos tecidos vegetais, observou-se que, tanto em folhas quanto em raízes, as plantas expostas ao As, de forma isolada ou com tratamento prévio com selenito

ou selenato, apresentaram incrementos médios de 40% e 170%, respectivamente, nas folhas e raízes, quando comparadas às plantas dos tratamentos controle, selenito e selenato (Figura 3 D).

Mas folhas, não foram identificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para o conteúdo de Mn. Por outro lado, nas raízes, as plantas expostas ao As, de forma isolada ou com tratamento prévio com selenito ou selenato, apresentaram um incremento médio de 80% na concentração de Mn (Figura 3 E).

Nas folhas, não foram identificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para as concentrações de Cu, mas nas raízes, nas plantas expostas ao tratamento com As apresentaram redução de 48% quando comparados às plantas do grupo controle. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente do grupo controle (Figura 3 F).

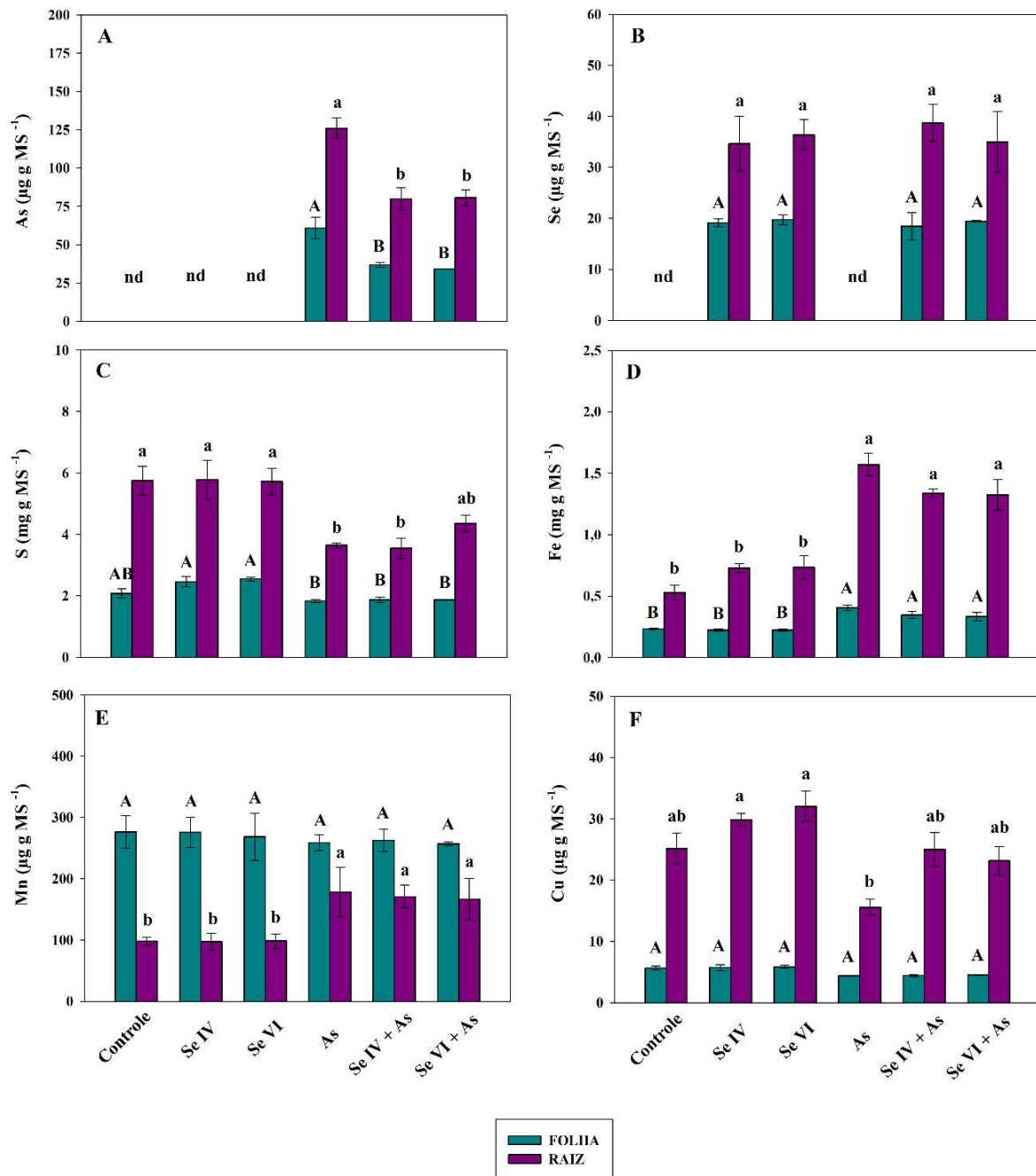


Figura 3. Efeitos dos tratamentos de As e Se sobre as concentrações de As, Se, S, Fe, Mn e Cu em *P. stratiotes*. Médias acompanhadas da mesma letra, maiúsculas para folhas e minúsculas para raízes, não apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Ganho relativo de biomassa fresca

Houve significativo ganho relativo de biomassa fresca (GRBF) nas plantas submetidas aos tratamentos com selenito e selenato, em comparação ao grupo controle, registrando aumentos da ordem de 46% e 56%, respectivamente. Embora não tenham sido evidenciadas

diferenças significativas entre esses dois tratamentos, os resultados apontam para um impacto positivo do Se no crescimento vegetal.

Em contrapartida, as plantas submetidas ao tratamento com As apresentaram significativa perda de biomassa, sendo mais intensa no tratamento com As em comparação com os tratamentos que tiveram exposição prévia ao Se (Figura 4).

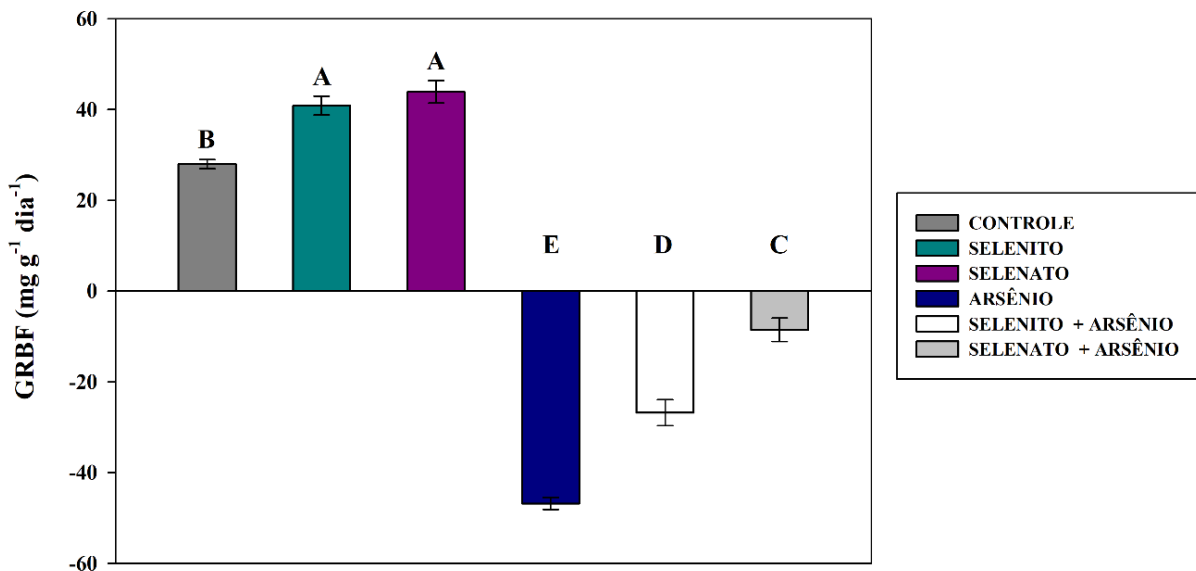


Figura 4. Efeitos dos tratamentos de As e Se no ganho relativo de biomassa fresca (GRBF) em *P. stratiotes*. Médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Pigmentos fotossintéticos

As plantas submetidas aos tratamentos contendo selenito e selenato não exibiram diferenças significativas nas concentrações de clorofila *a*, em relação ao grupo controle. A presença do As nos tratamentos prévios com selenato e selenito causou redução nos teores da clorofila *a*, embora tenham se mantido significativamente superior àqueles observados no tratamento apenas com As (Figura 5). Por outro lado, não se constataram diferenças significativas nos teores de clorofila *b* e de carotenoides entre os tratamentos, à exceção da concentração de carotenoides nas plantas expostas somente ao As que tiveram seus conteúdos significativamente menores que nos demais tratamentos (Figura 5).

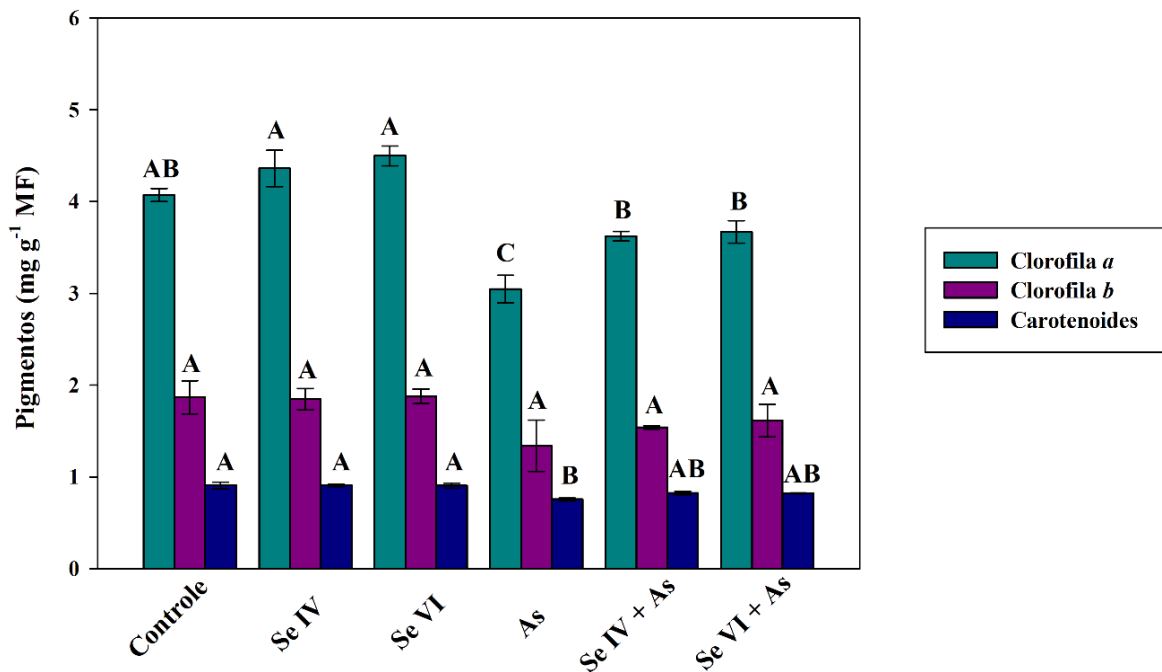


Figura 5. Efeitos de diferentes tratamentos de As e Se nos níveis de clorofila a, clorofila b e carotenoides em *P. stratiotes*. Médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica

Na análise da formação do ânion superóxido, tanto as folhas quanto as raízes apresentaram comportamentos semelhantes, com aumentos em torno de 140% nas plantas tratadas apenas com As, em comparação com o controle. Nas plantas tratadas previamente com selenito e depois expostas ao As, esse aumento foi em torno de 64%. Em contraste, as plantas tratadas com selenato apresentaram uma redução de 35% na concentração do ânion superóxido. Plantas expostas aos outros tratamentos não mostraram alterações significativas em comparação com o grupo controle (Figura 6 A).

Em relação à geração de peróxido de hidrogênio, os resultados evidenciam que a exposição ao As provocou aumento significativo, tanto nas folhas quanto nas raízes. Nas folhas, quando as plantas foram previamente tratadas com selenito e selenato, antes da exposição ao As, observou-se elevação menos acentuada, em comparação ao tratamento com As isoladamente. Por sua vez, nas raízes, o impacto do As foi ainda mais danoso, ocasionando um aumento de 82% na produção de H_2O_2 em comparação com o grupo controle. O tratamento prévio com selenito e selenato, da mesma forma observada nas folhas, atenuou os

efeitos do As, resultando em aumento de cerca de 45% nas concentrações de peróxido de hidrogênio (Figura 6 B).

Os resultados das quantificações de MDA indicaram que a presença do As na solução aumentou os danos peroxidativos, tanto nas folhas quanto nas raízes, enquanto as plantas tratadas com selenito e selenato antes da exposição ao As, assim como as expostas apenas ao selenito e selenato, não apresentaram diferenças significativas em relação às plantas do grupo controle. Entretanto, quando esses grupos foram comparados isoladamente, as plantas submetidas posteriormente ao As apresentaram aumentos de 50% nos níveis de MDA. Para raízes, apenas as plantas expostas a tratamentos com As evidenciaram aumentos na concentração de MDA, com incrementos da ordem de 110%, enquanto aquelas tratadas previamente com selenito e selenato apresentaram, em média, aumentos de 20% (Figura 6 C).

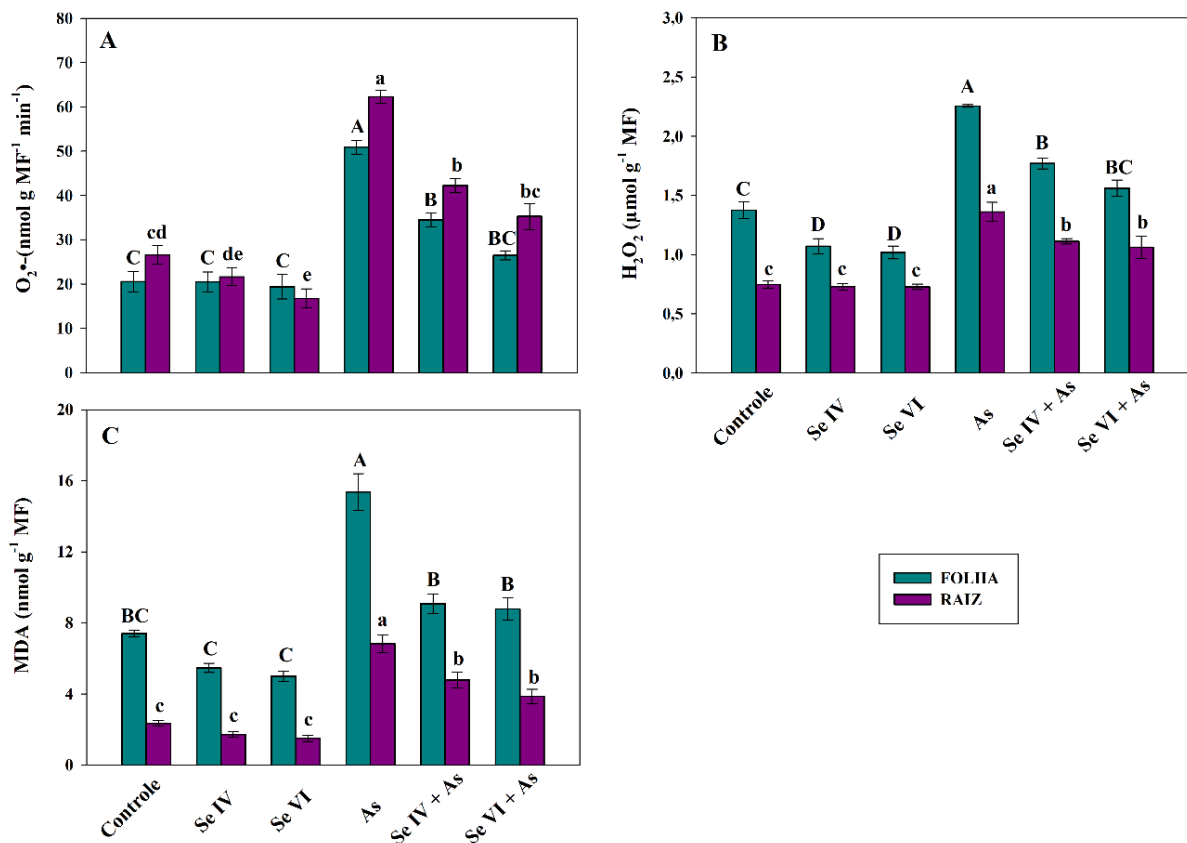


Figura 6. Efeitos de diferentes tratamentos de As e Se nos níveis de ânion superóxido (A), peróxido de hidrogênio (B) e MDA (C) em *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para folhas e minúsculas para raízes, não apresentam diferenças significativas conforme o teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Sistema antioxidante enzimático

Na análise da atividade enzimática da dismutase do superóxido (SOD), conforme mostrado na Figura 7 A, observamos diferentes resultados nas folhas e raízes. Em folhas, a exposição aos tratamentos contendo selenito e selenato resultou em aumentos médios de 22% na atividade da SOD em comparação às plantas do grupo controle. Por outro lado, plantas tratadas previamente com selenito e posteriormente expostas ao As mostraram redução de 25% na atividade enzimática, enquanto aquelas expostas apenas ao As tiveram uma redução drástica de 50%. Nas raízes, os efeitos foram igualmente notáveis. A exposição ao As resultou em uma diminuição de 35% na atividade da SOD. No entanto, plantas que receberam tratamento prévio com selenito, antes da exposição ao As, mostraram uma redução menor na atividade da SOD, de 22%.

Em relação à atividade da catalase, conforme apresentado na Figura 7 B, observamos que as maiores diferenças entre os tratamentos foram identificadas nas raízes. Nas folhas, diferenças significativas foram percebidas apenas entre as plantas tratadas com As e aquelas com selenato, com essas últimas apresentando incrementos na atividade enzimática. A atividade da CAT nas raízes se mostrou, também, pouco dinâmica. Plantas expostas ao tratamento com selenito demonstraram maior atividade em comparação àquelas tratadas apenas com As.

No que concerne à atividade do grupo das peroxidases (POX), conforme exposto na Figura 7 C, não foram identificadas diferenças significativas nas folhas entre os indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos. No entanto, nas raízes, observou-se um incremento na atividade enzimática nas plantas suplementadas com selenito e/ou selenato, comparado àquelas expostas ao As, tanto de forma isolada quanto após tratamento prévio com fontes distintas de selênio.

No que tange à atividade enzimática da peroxidase do ascorbato (APX), conforme demonstrado na Figura 7 D, podemos notar que, nas folhas, plantas tratadas com As apresentaram redução de 35% na atividade enzimática quando comparadas ao grupo controle. Em contraste, plantas tratadas com selenito e selenato apresentaram incremento em suas atividades quando comparadas àquelas expostas ao As, de forma isolada ou após tratamento prévio com fontes de selênio. Nas raízes, plantas expostas ao selenito mostraram incremento de 25% atividade enzimática, quando comparadas as do grupo controle. Por outro lado, plantas expostas ao As de forma isolada apresentaram atividade da APX 27 % menor que as plantas do controle.

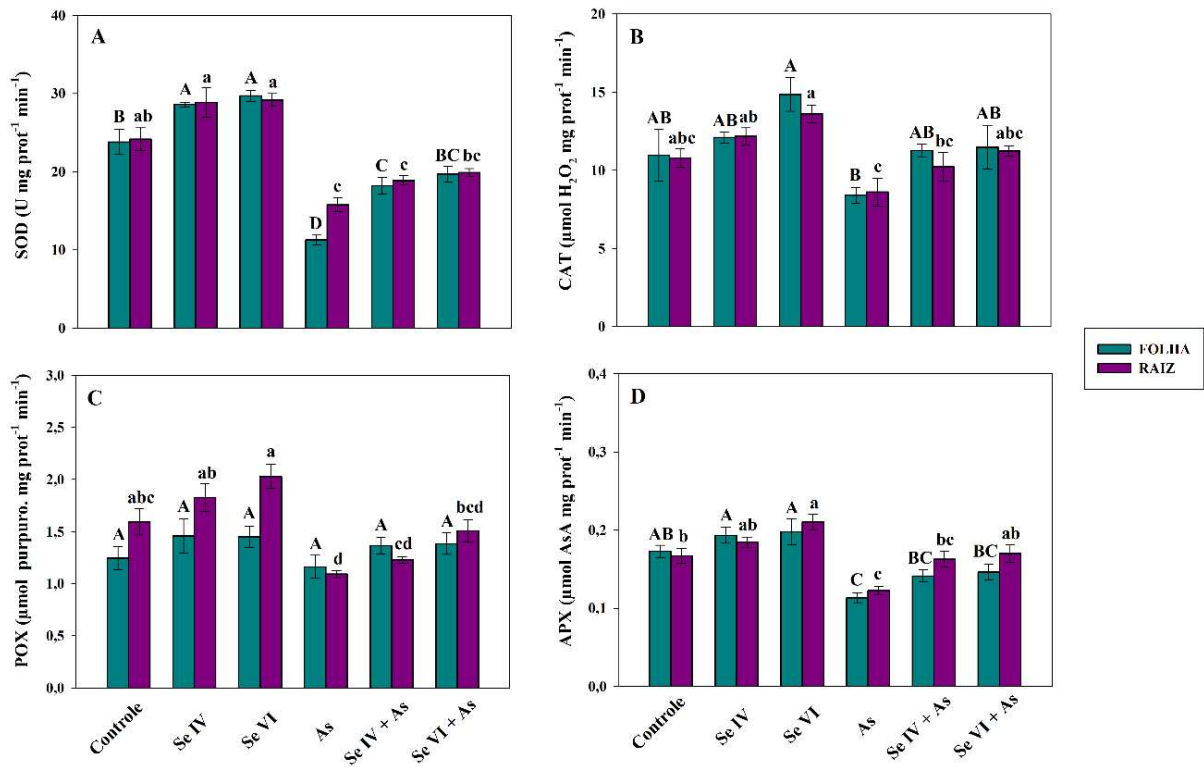


Figura 7. Efeitos de diferentes tratamentos de As e Se sobre as atividades das enzimas SOD (A), CAT (B), POX (C) e APX (D) em *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula para folhas e minúscula para raízes, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Sistema antioxidante não enzimático

A análise da concentração dos compostos tiolados totais e não proteicos, indicou que, nas folhas, plantas expostas ao As tiveram uma redução de, aproximadamente, 50% em comparação ao grupo controle. No entanto, as plantas suplementadas com selenato apresentaram concentrações significativamente maiores de tióis totais do que aquelas expostas ao As, seja de forma isolada ou com tratamento prévio com selenito e selenato. Nas raízes, esse comportamento se manteve, uma vez que as plantas tratadas previamente com selenito e selenato, seguidas de exposição ao As, mostraram teores de tióis totais 85% maiores do que as plantas grupo controle (Figura 8 A e 8 B).

Os teores de tióis não proteicos, como demonstrado na figura 8 B, seguiram os padrões observados para tióis totais. As folhas das plantas que foram expostas ao selenito e ao selenato apresentaram incremento nos teores de tióis não proteicos em comparação às plantas tratadas com arsênio. Nas raízes, por outro lado, a suplementação prévia de plantas com

selenito e selenato, seguida pela exposição ao arsênio, induziu aumentos de 120 % nos teores de tióis não proteicos quando comparados as plantas do grupo controle.

Os teores de ascorbato total, nas folhas, incrementos nos teores AsA-T foram identificados nas plantas expostas aos tratamentos contendo selenito e selenato, quando comparadas àquelas expostas ao As. Nas raízes não foram identificadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 8 C). Quanto aos teores de ascorbato reduzido nas folhas, plantas expostas ao selenato e previamente ao selenato, com posterior exposição ao As, demonstraram incrementos de 20 e 17 %, respectivamente, em comparação ao controle, mas, nas raízes, diferenças estatísticas entre os tratamentos não foram observadas (Figura 8 D). Os teores de dehidroascorbato, nas folhas das plantas tratadas com As, seja de forma isolada ou com exposição prévia à selenito ou selenato, mostraram redução, em média, de 44 % quando comparados àquelas do grupo controle. Essa redução foi de 52% nas raízes das plantas tratadas apenas com As, enquanto as que receberam tratamento prévio com selenito e selenato apresentaram teores, em média, 35% menores que as plantas do grupo controle (Figura 8 E).

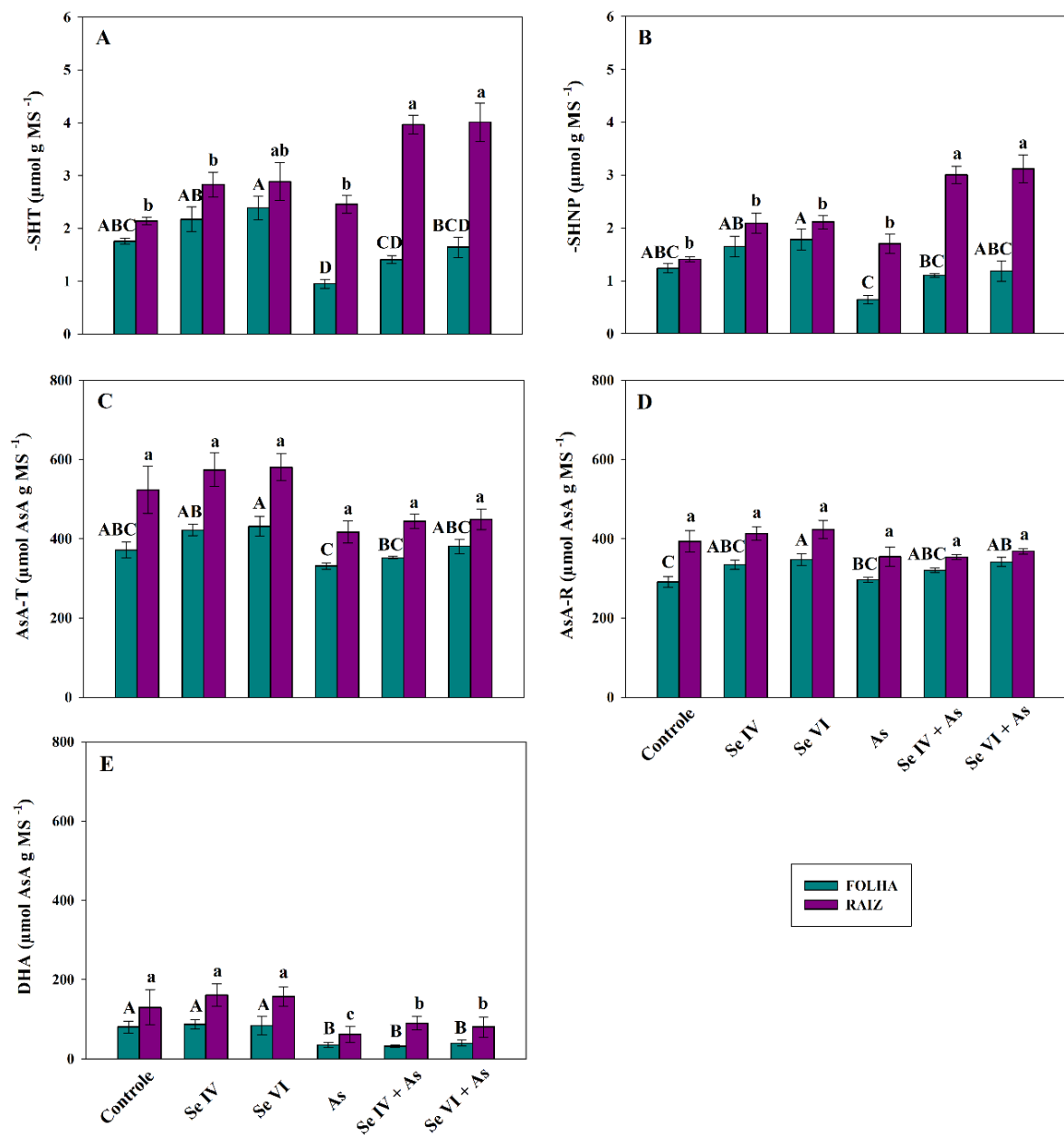


Figura 8. Efeito de diferentes tratamentos de As e Se sobre os teores de tióis totais (A), tióis não proteicos (B), ascorbato total (C), ascorbato reduzido (D) e dehidroascorbato (E) em *P. stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula para folhas e minúscula para raízes, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

4. Discussão

A sintomatologia visual pode ser um fator crucial para o diagnóstico precoce de problemas que podem acometer as plantas, permitindo uma tomada rápida de decisão para atenuar os danos que podem ser causados, além de fornecer informações inestimáveis sobre a saúde geral das plantas e do ambiente em que elas estão inseridas. Os sintomas apresentados pelas plantas expostas ao As resultaram do elevado grau de desestruturação e morte celular, fato que também foi demonstrado para várias espécies vegetais em diferentes estudos (de Freitas-Silva et al., 2016; Martínez-Castillo et al., 2022a; Sinha et al., 2023).

O arsênio (As) é notadamente conhecido como um elemento químico tóxico, com elevado potencial de formar espécies reativas de oxigênio, que acarretam peroxidação lipídica e, em último caso, danos às membranas celulares, comprometendo a integridade e a função celular (Beniwal et al., 2023; de Freitas-Silva et al., 2016; Martínez-Castillo et al., 2022a; Nahar et al., 2022; Sinha et al., 2023). A participação de agentes com função protetora, como o selênio (Se), pode atenuar esses danos. Plantas que foram submetidas ao tratamento prévio com Se, seja na forma de selenito ou selenato, apresentaram estrutura celular mais preservada, mesmo sob a influência do As, demonstrando o efeito protetor desses tratamentos contra os danos induzidos pelo metaloide. Esta observação ressalta a importância dos tratamentos prévios na mitigação dos efeitos adversos do As sobre as plantas (Das et al., 2022; Hasanuzzaman et al., 2022; Kumar et al., 2015).

A adequada nutrição vegetal pode ajudar as plantas a tolerar estresses por meio da ativação e melhoria de mecanismos que as tornam mais resistentes ao estresse por metais pesados, como a indução do sistema antioxidante (Kumari et al., 2022; Singhal et al., 2023), conjugação e inativação do metal (Ali et al., 2013; Feng et al., 2013; Thakur et al., 2022), inibição da absorção, redução na translocação para as folhas (Ali et al., 2013; Thakur et al., 2022) entre outros. Logo, a nutrição adequada pode representar uma estratégia adequada para melhorar a resistência das plantas à agentes poluentes, tornando-as mais eficazes no processo de fitorremediação.

No presente estudo, as maiores concentrações de As foram encontradas nas raízes, o que sugere a existência de mecanismos estratégicos de *P. stratiotes* para reduzir a translocação do metaloide para as folhas, como forma de proteger a sua maquinaria fotossintética (Ali et al., 2013; Yan et al., 2020). Adicionalmente, a suplementação com Se mostrou o papel desse mineral na redução da absorção do metaloide pela planta, indicando papel protetor do Se em plantas expostas ao As. Os estudos realizados por Feng et al. (2013) e

Pokhrel et al. (2020) demonstraram que, tanto selenato quanto selenito, podem reduzir a absorção e translocação de As nas plantas. Em acréscimo, Abedi e Mojiri (2020), Singhal et al. (2023) e Song et al. (2017) indicaram que selenato e arsenato compartilham a mesma via de absorção (transportadores de fosfato), condição que pode resultar em uma competição pelos sítios de absorção. Além disso, devido às alterações nas propriedades da parede celular induzidas pelo Se, com maior produção de celulose, hemicelulose e lignina, aumentando a sua espessura, a passagem e absorção de metais pesados para o interior celular é dificultada (Ding et al., 2015; Zakir Hossain et al., 2006). A presença do As não foi capaz de reduzir os teores de Se nos tecidos vegetais analisados, sugerindo que, apesar da competição potencial, a planta manteve elevada eficiência de absorção de Se.

O enxofre (S) é um macronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, participando de diversos processos bioquímicos como: síntese de aminoácidos e proteínas, constituintes de coenzimas e vitaminas, formação de compostos de defesas como tióis e glutathione e outros (Li et al., 2020; Narayan et al., 2023; Taiz et al., 2017). Estudos indicam que a presença de As pode afetar negativamente a absorção e o metabolismo do S, uma vez que ambos possuem forte interação, sobretudo em ambientes com condições redutoras (Abedi e Mojiri, 2020; Boye et al., 2017). No presente estudo, os efeitos deletérios do As nas células das raízes podem ter reduzido a eficiência de absorção de enxofre pelas plantas de *P. stratiotes*. Portanto, a redução da concentração de S nas plantas expostas ao As parece ser resultado de uma combinação de diversos fatores cuja, interação negativa interfere diretamente no desenvolvimento do vegetal.

A presença de As foi responsável pelo incremento nas concentrações de Fe nas plantas de *P. stratiotes*, fato que deve ser interpretado não como indicação de benefício, mas como uma resposta ao estresse. Além disso, a maior concentração de Fe nas raízes pode se relacionar com a formação de placas de ferro, uma resposta da planta responsável pela redução da absorção de As, sendo crucial para mitigação do estresse oxidativo causado por esse metaloide (Boye et al., 2017; He et al., 2024; L. Hu et al., 2020). O Se é capaz de reduzir a absorção de As através de alterações na morfologia das raízes e pela absorção de Fe do solo, aumentando a placa Fe (Huang et al., 2024).

Assim como o Fe, o aumento da concentração de Mn nas raízes das plantas expostas ao As parece ser uma estratégia de defesa contra os efeitos oxidativos do metaloide, uma vez que esse mineral está diretamente envolvido na ação enzimática, sendo cofator da enzima Mn-SOD (Carvalho et al., 2014; Chauhan et al., 2017). Por sua vez, o cobre (Cu), micronutriente

essencial relacionado à ativação de enzimas antioxidantes, como a SOD, síntese de lignina, e componente chave das plastocianinas (Shabbir et al., 2020; Taiz et al., 2017), teve sua concentração reduzida nas raízes das plantas expostas ao As, assim como demonstrado por Chauhan et al. (2017). Esse efeito pode ocorrer pela competição indireta por transportadores de metal (Gong et al., 2020).

Os achados deste estudo evidenciaram os impactos negativos do As no desenvolvimento das plantas, seja por interromper a produção de energia, interferindo na cadeia transportadora de elétrons, essencial para o desenvolvimento do organismo, ou por desencadear uma cascata de danos oxidativos que danificam as células vegetais e reduzem a capacidade das plantas em se desenvolver (Beniwal et al., 2023; Martínez-Castillo et al., 2022; Nahar et al., 2022; Sinha et al., 2023). Em contrapartida, percebeu-se que a pré-exposição à selenito e selenato pode exercer um efeito atenuante parcial sobre os danos causados pela exposição ao As, através da indução dos sistemas antioxidantes (Das et al., 2022; Hasanuzzaman et al., 2022; Kumar et al., 2024; Lanza e Reis, 2021; Silva et al., 2020), responsáveis pela eliminação de espécies reativas de oxigênio e pela homeostase celular ou, ainda, pela competição pelos sítios de absorção, reduzindo a concentração de As nos tecidos vegetais (Abedi e Mojiri, 2020; Singhal et al., 2023; Song et al., 2017).

Os tratamentos com As reduziram os teores de clorofila *a* e carotenoides, indicando o papel tóxico desse elemento, o que foi observado pelo desenvolvimento de cloroses, resultante dos efeitos inibidores do As na síntese de clorofila *a* (Beniwal et al., 2023; Mishra et al., 2016) e os potenciais danos às membranas dos cloroplastos, devido ao estímulo à geração de espécies reativas (Martínez-Castillo et al., 2022; Sinha et al., 2023). Nas plantas tratadas previamente com Se, embora os teores de clorofila *a* também tenham sido menores, os efeitos foram significativamente menos intensos, mostrando o papel atenuador e protetor do Se, tanto na fonte selenito, quanto selenato, provavelmente pelo estímulo aos sistemas antioxidantes e na redução da geração de espécies reativas de oxigênio (Das et al., 2022; Jiang et al., 2021; Lanza e Reis, 2021).

A exposição das plantas ao As aumentou a concentração das espécies reativas de oxigênio, tanto nas folhas quanto nas raízes, o que, conseqüentemente, promoveu o aumento da peroxidação dos lipídios das membranas, demonstrado pela maior formação de malondialdeído (MDA). A formação de MDA é um bom indicador da resposta ao estresse causado por As em *P. stratiotes*. Os aumentos nos teores de espécies reativas de oxigênio na presença de As podem ocorrer devido ao desacoplamento na produção de ATP, interferindo

na cadeia de transporte de elétrons, deixando elétrons livres para formarem espécies reativas de oxigênio (Beniwal et al., 2023; Y. Hu et al., 2020; Martínez-Castillo et al., 2022). Além da ação nos sítios produtores de ATP, o As atua degradando e reduzindo a ação de enzimas antioxidantes, responsáveis pela transformação de ROS em componentes menos reativos (Beniwal et al., 2023; Martínez-Castillo et al., 2022; Nahar et al., 2022). A presença do Se, como agente protetor, promoveu menor concentração de ROS, seja por induzir o sistema antioxidante ou por reduzir a concentração de As na planta (Das et al., 2022; Feng et al., 2013; Silva et al., 2020; Singhal et al., 2023).

A eliminação das espécies reativas de oxigênio constitui o principal mecanismo de defesa das plantas quando o metaloide se encontra no meio celular. Para tal, os vegetais desfrutam de sistemas antioxidantes enzimáticos, via ação de enzimas como SOD, CAT, POX, APX, GR e outras; e os não enzimáticos, que são formados por compostos de baixo peso molecular que funcionam como antioxidantes, tais como: ácido ascórbico, glutathione, compostos tiolados.

A exposição das plantas ao As resultou em diminuição substancial na atividade da enzima SOD, tanto em folhas quanto em raízes, com um impacto mais severo nas folhas (Kumar et al., 2020). Os tratamentos com selenito e com o selenato desempenharam papel protetor na manutenção da atividade da SOD, tanto nas folhas quanto nas raízes, promovendo aumento na sua atividade quando as plantas foram previamente tratadas com esse elemento. O tratamento prévio com selenito parece mitigar parcialmente a inibição da atividade enzimática causada pelo As, especialmente nas raízes, indicando que selenito e o selenato exercem efeito protetor sobre a atividade da SOD (Chauhan et al., 2019; Ferreira et al., 2022; Gupta e Gupta, 2017; Handa et al., 2019; Singhal et al., 2023).

Os resultados indicaram que a atividade da CAT nas folhas não mostrou grandes variações entre os diferentes tratamentos, contudo, ambas as fontes de Se podem potencializar a atividade enzimática em situações de exposição ao As, (Chauhan et al., 2019; Handa et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2020; Khalofah et al., 2021; Mitra et al., 2023). Nas raízes, a maior dinâmica na atividade da CAT, especialmente em resposta ao tratamento com selenito, reforça a ideia de que compostos de Se podem desempenhar papel crucial na modulação da resposta antioxidante em plantas submetidas a estresse por As.

Nossos resultados sugerem que, enquanto a atividade das peroxidases nas folhas não foi significativamente alterada pelos tratamentos com selenito, selenato ou As, nas raízes, a suplementação com compostos de Se promoveu aumentos na atividade enzimática. Esses

incrementos indicam efeito protetor potencial ou estimulador do selenito e do selenato sobre a atividade das peroxidases em condições de estresse por As (Hasanuzzaman et al., 2022, 2020; Silva et al., 2020; Singhal et al., 2023).

A enzima APX teve significativa inibição da atividade nas folhas das plantas expostas ao As isoladamente. Contudo, os tratamentos prévios com Se tiveram efeitos mitigatório do estresse por As, promovendo um aumento na atividade enzimática (Das et al., 2022; Gupta e Gupta, 2017; Handa et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2022, 2020; Saed-Moucheshi and Mirghaed, 2023). Em raízes, a suplementação com selenito aumentou a atividade da APX, denotando papel promotor na atividade da enzima, contrastando com a redução observada nas plantas tratadas apenas com As (Beniwal et al., 2023; Y. Hu et al., 2020; Sinha et al., 2023).

Diversos outros componentes químicos exercem ação protetora contra a toxidez do As, como os compostos ricos em enxofre, fitoquelatinas, glutathiona e compostos tiolados (Frémont et al., 2024; Morales-Espinoza et al., 2019; Rizwan et al., 2020). Os nossos resultados indicaram que a exposição prévia ao Se tem ação direta no sistema antioxidante não enzimático, com a indução da síntese de tióis totais e tióis não proteicos, tornando um mecanismo importante para aumento da tolerância de *P. stratiotes* ao estresse por As. O Se pode induzir a síntese de glutathiona (o tiol não proteico mais abundante no vegetal) através da substituição do grupamento tiol (-SH) por -SeH (selenotiol) (Feng et al., 2021; Wan et al., 2016), os quais são quimicamente semelhantes, podendo se ligar a metais pesados e metaloides, como o As, formando complexos menos tóxicos, além de servirem como fonte de elétrons para enzimas capazes de reduzir os efeitos das espécies reativas de oxigênio.

O ácido ascórbico é outro importante componente envolvido na resposta antioxidante das plantas, cuja função está associada com a sua capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio, na regulação da atividade de enzimas do sistema antioxidante, sobretudo a APX, que utiliza o ascorbato como doador de elétrons para reduzir peróxido de hidrogênio, além de ser componente essencial no ciclo ascorbato-glutathiona, responsável por eliminar espécies reativas de oxigênio (Hernández-Hernández et al., 2019; Lanza & Reis, 2021; Saed-Moucheshi & Mirghaed, 2023).

Os níveis de ascorbato total e de ascorbato reduzido variaram entre os tratamentos apenas nas folhas, indicando que esse órgão é mais sensível às variações as quais foram submetidas. De maneira geral, os teores de ascorbato reduziram na presença de As, indicando seu consumo metabólico devido ao estresse oxidativo causado pelo metaloide (Handa et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2020; He et al., 2020; Hernández-Hernández et al., 2019; Lanza e

Reis, 2021; Saed-Moucheshi e Mirghaed, 2023). Contudo, essa redução nos níveis de ascorbato, caso ocorra de forma acentuada, pode levar a um comprometimento da capacidade antioxidante geral das plantas.

Devido ao impacto do As no metabolismo das plantas, os teores de dehidroascorbato foram reduzidos nas plantas tratadas com As, tanto isoladamente quanto com exposição prévia a selenito ou selenato,. Em resumo, a redução nos teores de dehidroascorbato nas plantas tratadas com As faz parte da resposta metabólica visando mitigar o estresse oxidativo causado pelo metaloide, sendo que o tratamento prévio com selenito ou selenato contribui na atenuação desse efeito, embora não o elimine completamente (Lanza e Reis, 2021; Saed-Moucheshi e Mirghaed, 2023).

5. Conclusão

O nosso estudo evidenciou os impactos adversos do As sobre o desenvolvimento e a saúde das plantas de *P. stratiotes*, destacando a capacidade desse metaloide de desencadear uma série de respostas de estresse oxidativo que comprometem a estrutura celular, a fotossíntese e o crescimento geral dos vegetais. No entanto, essa pesquisa também demonstrou o papel mitigador do selênio, especialmente na forma de selenito e selenato, na proteção contra esses danos. Os resultados sugerem que o selênio exerce um efeito protetor, melhorando a atividade dos sistemas antioxidantes, reduzindo a absorção do As e atenuando os efeitos tóxicos do estresse oxidativo induzido pelo metaloide. Assim, estratégias que envolvam a suplementação com selênio podem ser consideradas promissoras para aumentar a resistência das plantas a contaminantes ambientais, contribuindo para o sucesso do processo de fitorremediação e para a manutenção da integridade das plantas, em especial *P. stratiotes*, em ambientes contaminados.

Referências

- Abdalla, M.A., Lentz, C., Mühling, K.H., 2022. Crosstalk between selenium and sulfur is associated with changes in primary metabolism in lettuce plants grown under Se and S enrichment. *Plants* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants11070927>
- Abedi, T., Mojiri, A., 2020. Arsenic uptake and accumulation mechanisms in rice species. *Plants* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9020129>
- Adebayo, A.H., Yakubu, O.F., Akpata-Bakare, O., 2016. Uptake, metabolism and toxicity of selenium in tropical plants. *IntechOpen* 1, 1–17. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90295>
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Arnon, D.I., Stout, P.R., 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol.* 14, 371–375. <https://doi.org/10.1104/pp.14.2.371>
- Arvy, M.P., 1993. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J. Exp. Bot.* 44, 1083–1087. <https://doi.org/10.1093/jxb/44.6.1083>
- Beniwal, R., Yadav, R., Ramakrishna, W., 2023. Multifarious effects of arsenic on plants and strategies for mitigation. *Agriculture* 13, 1–15. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020401>
- Boldrin, P.F., Faquin, V., Ramos, S.J., Guilherme, L.R.G., Bastos, C.E.A., Carvalho, G.S., Costa, E.T. de S., 2012. Selenato e selenito na produção e biofortificação agrônômica com selênio em arroz. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 47, 831–837. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000600014>
- Boldrin, P.F., Faquin, V., Ramos, S.J., Boldrin, K.V.F., Ávila, F.W., Guilherme, L.R.G., 2013. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *J. Food Compos. Anal.* 31, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.06.002>
- Boveris, A., Alvarez, S., Bustamante, J., Valdez, L., 2002. Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods Enzymol.* 349, 280–287. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)49342-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)49342-1)
- Boye, K., Lezama-Pacheco, J., Fendorf, S., 2017. Relevance of reactive Fe:S ratios for sulfur impacts on arsenic uptake by rice. *Soils* 1. <https://doi.org/10.3390/soils1010001>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Campolina, D., Ciminelli, V.S.T., Ng, J.C., Campolina, T.A.M., Caldeira, C.L., Gutiérrez-Aviña, X., Islam, M.N., 2024. Speciated and total urinary arsenic levels in Belo Horizonte, the largest brazilian city within the mineral-rich region “iron quadrangle.” *Expo. Heal.* 16, 101–118. <https://doi.org/10.1007/s12403-023-00540-5>
- Cao, F., Wang, N., Zhang, M., Dai, H., Dawood, M., Zhang, G., Wu, F., 2013. Comparative study of alleviating effects of GSH, Se and Zn under combined contamination of cadmium and chromium in rice (*Oryza sativa*). *BioMetals* 26, 297–308.

<https://doi.org/10.1007/s10534-013-9611-9>

- Carvalho, E.R., Oliveira, J.A., Von Pinho, É.V. de R., Neto, J.C., 2014. Enzyme activity in soybean seeds produced under foliar application of manganese. *Cienc. e Agrotecnologia* 38, 317–327. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000400001>
- Chauhan, R., Awasthi, S., Srivastava, S., Dwivedi, S., Pilon-Smits, E.A.H., Dhankher, O.P., Tripathi, R.D., 2019. Understanding selenium metabolism in plants and its role as a beneficial element. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 49, 1937–1958. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1598240>
- Chauhan, R., Awasthi, S., Tripathi, Preeti, Mishra, S., Dwivedi, S., Niranjana, A., Mallick, S., Tripathi, Pratibha, Tripathi, R.D., Chauhan, R., Pande, V., 2017. Selenite modulates the level of phenolics and nutrient element to alleviate the toxicity of arsenite in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 138, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.015>
- Chorianopoulou, S.N., Bouranis, D.L., 2022. The role of sulfur in agronomic biofortification with essential micronutrients. *Plants* 11, 1–24. <https://doi.org/10.3390/plants11151979>
- Cartes, P., Jara, A.A., Pinilla, L., Rosas, A., Mora, M.L., 2010. Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Ann. Appl. Biol.* 156, 297–307. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00387.x>
- Clark, R.B., 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.* 23, 458–460. <https://doi.org/10.1021/jf60199a002>
- Coelho, D.G., de Andrade, H.M., Marinato, C.S., Araujo, S.C., de Matos, L.P., da Silva, V.M., de Oliveira, J.A., 2020. Exogenous jasmonic acid enhances oxidative protection of *Lemna valdiviana* subjected to arsenic. *Acta Physiol. Plant.* 42, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03086-0>
- Cui, W., Yao, P., Pan, J., Dai, C., Cao, H., Chen, Z., Zhang, S., Xu, S., Shen, W., 2020. Transcriptome analysis reveals insight into molecular hydrogen-induced cadmium tolerance in alfalfa: The prominent role of sulfur and (homo)glutathione metabolism. *BMC Plant Biol.* 20, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2272-2>
- Das, S., Majumder, B., Biswas, A.K., 2022. Selenium alleviates arsenic induced stress by modulating growth, oxidative stress, antioxidant defense and thiol metabolism in rice seedlings. *Int. J. Phytoremediation* 24, 763–777. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1975639>
- de Freitas-Silva, L., de Araújo, T.O., da Silva, L.C., de Oliveira, J.A., de Araújo, J.M., 2016. Arsenic accumulation in Brassicaceae seedlings and its effects on growth and plant anatomy. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.028>
- Ding, Y., Wang, R., Guo, J., Wu, F., Xu, Y., Feng, R., 2015. The effect of selenium on the subcellular distribution of antimony to regulate the toxicity of antimony in paddy rice. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5111–5123. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3865-9>
- Droux, M., 2004. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynth. Res.* 79, 331–348. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000017196.95499.11>
- El-Ramady, H., Faizy, S.E.D., Abdalla, N., Taha, H., Domokos-Szabolcsy, É., Fari, M.,

- Elsakhawy, T., Omara, A.E.D., Shalaby, T., Bayoumi, Y., Shehata, S., Geilfus, C.M., Brevik, E.C., 2020. Selenium and nano-selenium biofortification for human health: opportunities and challenges. *Soil Syst.* 4, 1–24. <https://doi.org/10.3390/soilsystems4030057>
- Elavarthi, S., Martin, B., 2010. Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants, in: *Plant Stress Tolerance*. pp. 273–280. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0>
- Farnese, Fernanda S., Oliveira, J.A., Gusman, G.S., Leão, G.A., Silveira, N.M., Silva, P.M., Ribeiro, C., Cambraia, J., 2014. Effects of adding nitroprusside on arsenic stressed response of *Pistia stratiotes* L. under hydroponic conditions. *Int. J. Phytoremediation* 16, 123–137. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.759532>
- Farnese, F.S., Oliveira, J.A., Lima, F.S., Leão, G.A., Gusman, G.S., Silva, L.C., 2014. Evaluation of the potential of *Pistia stratiotes* L. (Water lettuce) for bioindication and phytoremediation of aquatic environments contaminated with arsenic. *Brazilian J. Biol.* 74, 103–112.
- Feng, R., Wei, C., Tu, S., 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ. Exp. Bot.* 87, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.09.002>
- Feng, R.W., Wang, L.Z., Yang, J.G., Zhao, P.P., Zhu, Y.M., Li, Y.P., Yu, Y.S., Liu, H., Rensing, C., Wu, Z.Y., Ni, R.X., Zheng, S.A., 2021. Underlying mechanisms responsible for restriction of uptake and translocation of heavy metals (metalloids) by selenium via root application in plants. *J. Hazard. Mater.* 402, 123570. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123570>
- Ferreira, G. de S., Brito, P.O.B. de, Lima, T. de A., Aderaldo, F.Í.C., Carvalho, G.T. de, Filho, E. do N. de S., Gondim, F.A., 2022. Plant growth and antioxidative enzymes in sunflower supplemented with selenium. *J. Agric. Sci.* 15, 62–69. <https://doi.org/10.5539/jas.v15n1p62>
- Frémont, A., Sas, E., Sarrazin, M., Brisson, J., Pitre, F.E., Breretom, N.J.B., 2024. Arsenic stress triggers active exudation of arsenic-phytochelatin complexes from *Lupinus albus* roots. *J. Exp. Bot.* 272, 1–30. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae272>
- Ganie, S.Y., Javid, D., Hajam, Y.A., Reshi, M.S., 2024. Arsenic toxicity: sources, pathophysiology and mechanism. *Toxicol. Res. (Camb)*. 13. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfad111>
- Gay, C., Gebicki, J.M., 2000. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. *Anal. Biochem.* 284, 217–220. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>
- Germ, M., Stibilj, V., Kreft, I., 2007. Metabolic importance of selenium for plants. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol.* 1 (1), 91–97.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Golubkina, N.A., Kosheleva, O. V., Krivenkov, L. V., Dobrutskaya, H.G., Nadezhkin, S., Caruso, G., 2017. Intersexual differences in plant growth, yield, mineral composition and antioxidants of spinach (*Spinacia oleracea* L.) as affected by selenium form. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 225, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.001>

- Gong, B., He, E., Qiu, H., Van Gestel, C.A.M., Romero-Freire, A., Zhao, L., Xu, X., Cao, X., 2020. Interactions of arsenic, copper, and zinc in soil-plant system: partition, uptake and phytotoxicity. *Sci. Total Environ.* 745, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140926>
- Gouveia, G.C.C., Galindo, F.S., Dantas Bereta Lanza, M.G., Caroline da Rocha Silva, A., Pereira de Brito Mateus, M., Souza da Silva, M., Rimoldi Tavanti, R.F., Tavanti, T.R., Lavres, J., Reis, A.R. dos, 2020. Selenium toxicity stress-induced phenotypical, biochemical and physiological responses in rice plants: characterization of symptoms and plant metabolic adjustment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 202, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110916>
- Gupta, M., Gupta, S., 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Front. Plant Sci.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02074>
- Haghighi, M., Silva, J.A.T., 2016. Influence of selenium on cadmium toxicity in cucumber (*Cucumis sativus* cv. 4200) at an early growth stage in a hydroponic system. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 47, 142–155. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1109650>
- Han, D., Xiong, S., Tu, S., Liu, J., Chen, C., 2015. Interactive effects of selenium and arsenic on growth, antioxidant system, arsenic and selenium species of *Nicotiana tabacum* L. *Environ. Exp. Bot.* 117, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.008>
- Handa, N., Kohli, S.K., Sharma, A., Thukral, A.K., Bhardwaj, R., Abd_Allah, E.F., Alqarawi, A.A., Ahmad, P., 2019. Selenium modulates dynamics of antioxidative defence expression, photosynthetic attributes and secondary metabolites to mitigate chromium toxicity in *Brassica juncea* L. plants. *Environ. Exp. Bot.* 161, 180–192.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.009>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., Fujita, M., 2014. Modulation of antioxidant machinery and the methylglyoxal detoxification system in selenium-supplemented *Brassica napus* seedlings confers tolerance to high temperature stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 161, 297–307. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0120-7>
- Hasanuzzaman, M., Borhannuddin Bhuyan, M.H.M., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Al Mahmud, J., Fujita, M., 2019. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants* 8, 1–50.
<https://doi.org/10.3390/antiox8090384>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Raza, A., Hawrylak-Nowak, B., Matraszek-Gawron, R., Mahmud, J. Al, Nahar, K., Fujita, M., 2020. Selenium in plants: boon or bane? *Environ. Exp. Bot.* 178, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104170>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., García-Caparrós, P., Parvin, K., Zulfiqar, F., Ahmed, N., Fujita, M., 2022. Selenium supplementation and crop plant tolerance to metal/metalloid toxicity. *Front. Plant Sci.* 12, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.792770>
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Wójcik, M., 2014. Selenium affects physiological parameters and phytochelatin accumulation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants grown under cadmium exposure. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 172, 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.040>
- Hawrylak-Nowak, B., Matraszek, R., Pogorzelec, M., 2015. The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients

- accumulation in cucumber plants. *Acta Physiol. Plant.* 37, 1–13.
<https://doi.org/10.1007/s11738-015-1788-9>
- He, R., Gao, M., Shi, R., Song, S., Zhang, Y., Su, W., Liu, H., 2020. The combination of selenium and LED light quality affects growth and nutritional properties of broccoli sprouts. *Molecules* 25, 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules25204788>
- He, Z., Chen, J., Yuan, S., Chen, S., Hu, Y., Zheng, Y., Li, D., 2024. Iron plaque: a shield against soil contamination and key to sustainable agriculture. *Plants* 13, 1–33.
<https://doi.org/10.3390/plants13111476>
- He, Z.L., Shentu, J., Yang, X.E., 2010. Manganese and Selenium, in: Hooda, P.S. (Ed.), *Trace Elements in Soils*. John Wiley and Sons, pp. 481–495.
<https://doi.org/10.1002/9781444319477.ch20>
- Helleday, T., Nilsson, R., Jenssen, D., 2000. Arsenic [III] and heavy metal ions induce intrachromosomal homologous recombination in the hprt gene of V79 Chinese hamster cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 114–122.
- Hernández-Hernández, H., Quiterio-Gutiérrez, T., Cadenas-Pliego, G., Ortega-Ortiz, H., Hernández-Fuentes, A.D., De La Fuente, M.C., Valdés-Reyna, J., Juárez-Maldonado, A., 2019. Impact of selenium and copper nanoparticles on yield, antioxidant system, and fruit quality of tomato plants. *Plants* 8, 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants8100355>
- Hodges, D.M., Delong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 1, 604–611.
<https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Hu, L., Fan, H., Wu, D., Wan, J., Wang, X., Huang, R., Liu, W., Shen, F., 2019. Assessing bioaccessibility of Se and I in dual biofortified radish seedlings using simulated in vitro digestion. *Food Res. Int.* 119, 701–708. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.049>
- Hu, L., Zeng, M., Lei, M., Liao, B., Zhou, H., 2020. Effect of zero-valent iron on arsenic uptake by rice (*Oryza sativa* L.) and its relationship with iron, arsenic, and phosphorus in soil and iron plaque. *Water, Air, Soil Pollut.* 231, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04848-9>
- Hu, Y., Li, J., Lou, B., Wu, R., Wang, G., Lu, C., Wang, H., Pi, J., Xu, Y., 2020. The role of reactive oxygen species in arsenic toxicity. *Biomolecules* 10.
<https://doi.org/10.3390/biom10020240>
- Huang, P., Zou, D., Dong, C., Tang, C., Li, Q., Zhao, P., Zhang, P., Liao, Q., Yang, Z., 2024. Simultaneously inhibit cadmium and arsenic uptake in rice (*Oryza sativa* L.) by selenium enhanced iron plaque: performance and mechanism. *Chemosphere* 363, 1–17.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142903>
- Hunt, R., 1991. *Plant growth curves: The functional approach to plant growth analysis*. Cambridge University Press.
- IBRAM, 2022. *Mineração em números*. Acesso em janeiro de 2022:
<https://ibram.org.br/mineracao-em-numeros/>
- Jiang, H., Lin, W., Jiao, H., Liu, J., Chan, L., Liu, X., Wang, R., Chen, T., 2021. Uptake, transport, and metabolism of selenium and its protective effects against toxic metals in

- plants: a review. *Metallomics* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfab040>
- Kampfenkel, K., Van Montagu, M., Inzé, D., 1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal. Biochem.* 225, 165–167.
- Kaur, N., Sharma, S., Kaur, S., Nayyar, H., 2014. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? *Arch. Agron. Soil Sci.* 60, 1593–1624. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.918258>
- Khalofah, A., Migdadi, H., El-Harty, E., 2021. Antioxidant enzymatic activities and growth response of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) to exogenous selenium application. *Plants* 10, 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10040719>
- Kolbert, Z., Molnár, Feigl, G., Van Hoewyk, D., 2019. Plant selenium toxicity: proteome in the crosshairs. *J. Plant Physiol.* 232, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.11.003>
- Kumar, A., Dixit, G., Singh, A.P., Dwivedi, S., Srivastava, S., Mishra, K., Tripathi, R.D., 2016. Selenate mitigates arsenite toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) by reducing arsenic uptake and ameliorates amino acid content and thiol metabolism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.037>
- Kumar, A., Ansari, M.I., Singh, P.K., Baker, A., Gupta, K., Srivastava, S., 2024. Synergistic effects of selenium and silicon mitigate arsenic toxicity in *Oryza sativa* L. *J. Plant Growth Regul.* 43, 1272–1286. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11182-x>
- Kumar, A., Khushboo, Pandey, R., Sharma, B., 2020. Modulation of superoxide dismutase activity by mercury, lead, and arsenic. *Biol. Trace Elem. Res.* 196, 654–661. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01957-3>
- Kumar, S., Shanker, R., Deo, R., Chakrabarty, D., Kumar, P., 2015. Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: Current updates and prospective. *Environ. Int.* 74, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.019>
- Kumari, V.V., Banerjee, P., Verma, V.C., Sukumaran, S., Chandran, M.A.S., Gopinath, K.A., Venkatesh, G., Yadav, S.K., Singh, V.K., Awasthi, N.K., 2022. Plant nutrition: an effective way to alleviate abiotic stress in agricultural crops. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms23158519>
- Kuo, M.C., Kao, C.H., 2003. Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biol. Plant.* 46, 149–152.
- Kwon, J.S., Yun, S.T., Lee, J.H., Kim, S.O., Jo, H.Y., 2010. Removal of divalent heavy metals (Cd, Cu, Pb, and Zn) and arsenic(III) from aqueous solutions using scoria: Kinetics and equilibria of sorption. *J. Hazard. Mater.* 174, 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.052>
- Lanza, M.G.D.B., Reis, A.R. dos, 2021. Roles of selenium in mineral plant nutrition: ROS scavenging responses against abiotic stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 164, 27–43. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.026>
- Leija-Martínez, P., Benavides-Mendoza, A., Cabrera-De La Fuente, M., Robledo-Olivo, A., Ortega-Ortíz, H., Sandoval-Rangel, A., González-Morales, S., 2018. Lettuce biofortification with selenium in chitosan-polyacrylic acid complexes. *Agronomy* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3390/agronomy8120275>

- Li, Q., Gao, Y., Yang, A., 2020. Sulfur homeostasis in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21238926>
- Liu, W., Shang, S., Feng, X., Zhang, G., Wu, F., 2014. Modulation of exogenous selenium in cadmium-induced changes in antioxidative metabolism, cadmium uptake, and photosynthetic performance in the 2 tobacco genotypes differing in cadmium tolerance. *Environ. Toxicol. Chem.* 9999, 1–8. <https://doi.org/10.1002/etc.2760>
- Lv, Q., Liang, X., Nong, K., Gong, Z., Qin, T., Qin, X., Wang, D., Zhu, Y., 2021. Advances in research on the toxicological effects of selenium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 106, 715–726. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03094-3>
- Lyons, G., 2018. Biofortification of cereals with foliar selenium and iodine could reduce hypothyroidism. *Front. Plant Sci.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00730>
- Marin, A.R., Pezeshki, S.R., Masschelen, P.H., Choi, H.S., 1993. Effect of dimethylarsenic acid (dmaa) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *J. Plant Nutr.* 16, 865–880. <https://doi.org/10.1080/01904169309364580>
- Marinho, H.S., 2003. *Bioquímica do Enxofre*, Associação. ed. 1ª Edição, Lisboa, Abril de 2003, Lisboa.
- Martinez, R.A.S., Rezende, P.M. de, Alvarenga, A.A. de, Andrade, M.J.B. de, Passos, A.M.A. dos, 2009. Doses e formas de aplicação de selênio na cultura da soja. *Ciência e Agrotecnologia* 33, 698–704. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542009000300006>
- Martínez-Castillo, J.I., Saldaña-Robles, A., Ozuna, C., 2022a. Arsenic stress in plants: A metabolomic perspective. *Plant Stress* 3, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100055>
- Mimmo, T., Tiziani, R., Valentinuzzi, F., Lucini, L., Nicoletto, C., Sambo, P., Scampicchio, M., Pii, Y., Cesco, S., 2017. Selenium biofortification in fragaria x ananassa: implications on strawberry fruits quality, content of bioactive health beneficial compounds and metabolomic profile. *Front. Plant Sci.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01887>
- Mishra, S., Alfeld, M., Sobotka, R., Andresen, E., Falkenberg, G., Küpper, H., 2016. Analysis of sublethal arsenic toxicity to *Ceratophyllum demersum*: subcellular distribution of arsenic and inhibition of chlorophyll biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 67, 4639–4646. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw238>
- Mitra, A., Chatterjee, S., Dubchak, S., Mudgal, S., Gaur, A., Srivastava, K., Gupta, D., 2023. Consequences of selenium uptake in plants – a review. *Ecol. Sci.* 47, 178–183. <https://doi.org/10.32846/2306-9716/2023.eco.2-47.29>
- Morales-Espinoza, M.C., Cadenas-Pliego, G., Pérez-Alvarez, M., Hernández-Fuentes, A.D., De La Fuente, M.C., Benavides-Mendoza, A., Valdés-Reyna, J., Juárez-Maldonado, A., 2019. Se nanoparticles induce changes in the growth, antioxidant responses, and fruit quality of tomato developed under NaCl stress. *Molecules* 24, 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules24173030>
- Nahar, K., Rhaman, M.S., Parvin, K., Bardhan, K., Marques, D.N., García-Caparrós, P., Hasanuzzaman, M., 2022. Arsenic-induced oxidative stress and antioxidant defense in plants. *Stresses* 2, 179–209. <https://doi.org/10.3390/stresses2020013>

- Narayan, O.P., Kumar, P., Yadav, B., Dua, M., Johri, A.K., 2023. Sulfur nutrition and its role in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2030082>
- Ojeda, G.A., Wrobel, Katarzyna, Corrales Escobosa, A.R., Wrobel, Kazimierz, Yanez Barrientos, E., 2013. Effect of Cd(II) and Se(IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in *Lepidium sativum*. *Metallomics* 5, 1254–1261. <https://doi.org/10.1039/c3mt00058c>
- Oliveira, E.C.M. de, Pires, L.P., Santos, V.S.V., Caixeta, E.S., Bravo, J.V.M., Pereira, B.B., 2023. Phytoremediation, bioaccessibility and ecotoxicological risk assessment of arsenic in a gold mining area. *Chemosphere* 319, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138030>
- Pandey, C., Gupta, M., 2018. Selenium amelioration of arsenic toxicity in rice shows genotypic variation: A transcriptomic and biochemical analysis. *J. Plant Physiol.* 231, 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.09.013>
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant’anna, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A., 1999. Aluminium effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11, 137–143.
- Pilon-Smits, E.A.H., 2015. Selenium in plants, in: *Progress in Botany*. pp. 93–107. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08807-5_4
- Pilon-Smits, E.A.H., Quinn, C.F., 2010. Selenium metabolism in plants, in: *Cell Biology of Metals and Nutrients*. pp. 225–241. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10613-2_10
- Pokhrel, G.R., Wang, K.T., Zhuang, H.M., Wu, Y.C., Chen, W., Lan, Y., Zhu, X., Li, Z., Fu, F.F., Yang, G. Di, 2020. Effect of selenium in soil on the toxicity and uptake of arsenic in rice plant. *Chemosphere* 239, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124712>
- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., Horemans, N., 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.* 40, 537–548. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01414-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01414-6)
- Qin, X., Nie, Z., Liu, H., Zhao, P., Qin, S., Shi, Z., 2018. Influence of selenium on root morphology and photosynthetic characteristics of winter wheat under cadmium stress. *Environ. Exp. Bot.* 150, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.024>
- R CORE TEAM, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. URL <http://www.r-project.org/>. Acesso em: janeiro de 2023.
- Rizwan, M., Ali, S., Rehman, M.Z. ur, Rinklebe, J., Tsang, D.C.W., Tack, F.M.G., Abbasi, G.H., Hussain, A., Igalavithana, A.D., Lee, B.C., Ok, Y.S., 2020. Effects of selenium on the uptake of toxic trace elements by crop plants: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 1–36. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1796566>
- Saed-Moucheshi, A., Mirghaed, E.R., 2023. A review on selenium function under oxidative stress in plants focusing on ROS production and detoxification. *Phyton-International J. Exp. Bot.* 92, 1921–1941. <https://doi.org/10.32604/phyton.2023.027810>
- Santos-Neves, P.H., 2020. Efeito do silício nos mecanismos de tolerância ao estresse por arsênio em *Pistia stratiotes*. Universidade Federal de Viçosa – Dissertação de Mestrado.

- Schiavon, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2017. The fascinating facets of plant selenium accumulation – biochemistry, physiology, evolution and ecology. *New Phytol.* 213, 1582–1596. <https://doi.org/10.1111/nph.14378>
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Shabbir, Z., Sardar, A., Shabbir, A., Abbas, G., Shamshad, S., Khalid, S., Natasha, Murtaza, G., Dumat, C., Shahid, M., 2020. Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. *Chemosphere* 259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127436>
- Shekari, L., Kamelmanesh, M.M., Mozafarian, M., Sadeghi, F., 2016. Beneficial effects of selenium on some morphological and physiological trait of hot pepper. *J. Hort. Sci.* 29, 594–600.
- Silva, V.M., Rimoldi Tavanti, R.F., Gratão, P.L., Alcock, T.D., Reis, A.R. dos, 2020. Selenate and selenite affect photosynthetic pigments and ROS scavenging through distinct mechanisms in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp) plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 201, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110777>
- Singhal, R.K., Fahad, S., Kumar, P., Choyal, P., Javed, T., Jinger, D., Singh, P., Saha, D., Md, P., Bose, B., Akash, H., Gupta, N.K., Sodani, R., Dev, D., Suthar, D.L., Liu, K., Harrison, M.T., Saud, S., Shah, A.N., Nawaz, T., 2023. Beneficial elements: new players in improving nutrient use efficiency and abiotic stress tolerance. *Plant Growth Regul.* 100, 237–265. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00843-8>
- Sinha, D., Datta, S., Mishra, R., Agarwal, P., Kumari, T., Adeyemi, S.B., Kumar Maurya, A., Ganguly, S., Atique, U., Seal, S., Kumari Gupta, L., Chowdhury, S., Chen, J.T., 2023. Negative impacts of arsenic on plants and mitigation strategies. *Plants* 12, 1–44. <https://doi.org/10.3390/plants12091815>
- Song, Z., Shao, H., Huang, H., Shen, Y., Wang, L., Wu, F., Han, D., Song, J., Jia, H., 2017. Overexpression of the phosphate transporter gene *OsPT8* improves the Pi and selenium contents in *Nicotiana tabacum*. *Environ. Exp. Bot.* 137, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.011>
- Steffan, J.J., Brevik, E.C., Burgess, L.C., Cerdà, A., 2019. The effect of soil on human health: an overview. *Eur. J. Soil Sci.* 69, 159–171. <https://doi.org/doi:10.1111/ejss.12451>
- Taiz, L., Zeiger, E., Muller, I.M., Murphy, A., 2017. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*, 6^a ed. Artmed.
- Thakur, M., Praveen, S., Divte, P.R., Mitra, R., Kumar, M., Gupta, C.K., Kalidindi, U., Bansal, R., Roy, S., Anand, A., Singh, B., 2022. Metal tolerance in plants: molecular and physicochemical interface determines the “not so heavy effect” of heavy metals. *Chemosphere* 287, 131957. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131957>
- Trippe, R.C., Pilon-Smits, E.A.H., 2021. Selenium transport and metabolism in plants: phytoremediation and biofortification implications. *J. Hazard. Mater.* 404. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124178>
- Verma, S., Verma, P.K., Meher, A.K., Dwivedi, S., Bansiwal, A.K., Pande, V., Srivastava, P.K., Verma, P.C., Tripathi, R.D., Chakrabarty, D., 2016. A novel arsenic

- methyltransferase gene of *Westerdykella aurantiaca* isolated from arsenic contaminated soil: phylogenetic, physiological, and biochemical studies and its role in arsenic bioremediation. *Metallomics* 8, 344–353. <https://doi.org/10.1039/C5MT00277J>
- Wan, Y., Yu, Y., Wang, Q., Qiao, Y., Li, H., 2016. Cadmium uptake dynamics and translocation in rice seedling: Influence of different forms of selenium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.001>
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b , as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wu, Q., Feng, R., Guo, J., Wang, R., Xu, Y., Fan, Z., Mo, L., 2017. Interactions between selenite and different forms of antimony and their effects on root morphology of paddy rice. *Plant Soil* 413, 231–242. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3096-6>
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S.N., Mohd Yusof, M.L., Ghosh, S., Chen, Z., 2020. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Front. Plant Sci.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
- Zakir Hossain, A.K.M., Koyama, H., Hara, T., 2006. Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminum stress. *J. Plant Physiol.* 163, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.02.008>
- Zhang, M., Tang, S., Huang, X., Zhang, F., Pang, Y., Huang, Q., Yi, Q., 2014. Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and its influence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Exp. Bot.* 107, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.05.005>
- Zhao, Y., Hu, C., Wang, X., Qing, X., Wang, P., Zhang, Y., Zhang, X., Zhao, X., 2019. Selenium alleviated chromium stress in chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) by regulating root morphology and metal element uptake. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 173, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.090>
- Zhou, P., Adeel, M., Shakoor, N., Guo, M., Hao, Y., Azeem, I., Li, M., Liu, M., Rui, Y., 2021. Application of nanoparticles alleviates heavy metals stress and promotes plant growth: An overview. *Nanomaterials* 11, 1–18. <https://doi.org/10.3390/nano11010026>
- Zhou, X., Yang, J., Kronzucker, H.J., Shi, W., 2020. Selenium biofortification and interaction with other elements in plants: a review. *Front. Plant Sci.* 11, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.586421>