

FERNANDA DOS SANTOS FARNESE

**SINALIZAÇÃO CELULAR EM RESPOSTA AO ARSÊNIO: MECANISMOS DE AÇÃO
DO ÓXIDO NÍTRICO EM NÍVEL MOLECULAR, BIOQUÍMICO, FISIOLÓGICO,
ULTRAESTRUTURAL E IMPLICAÇÕES PARA FITORREMEDIAÇÃO**

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

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F235m
2015 Farnese, Fernanda dos Santos, 1986-
Sinalização celular em resposta ao arsênio : mecanismos de
ação do óxido nítrico em nível molecular, bioquímico,
fisiológico, ultraestrutural e implicações para a fitorremediação /
Fernanda dos Santos Farnese. – Viçosa, MG, 2015.
x, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Pista stratiotes*. 2. Arsênio. 3. Óxido nítrico. 4.
Fitorremediação. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

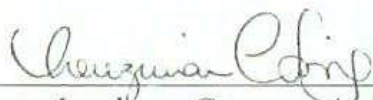
CDD 22 ed. 584.72

FERNANDA DOS SANTOS FARNESE

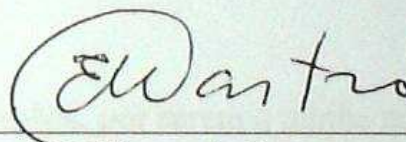
SINALIZAÇÃO CELULAR EM RESPOSTA AO ARSÊNIO: MECANISMOS DE
AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO EM NÍVEL MOLECULAR, BIOQUÍMICO,
FISIOLÓGICO, ULTRAESTRUTURAL E IMPLICAÇÕES PARA
FITORREMEDIAÇÃO

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*.

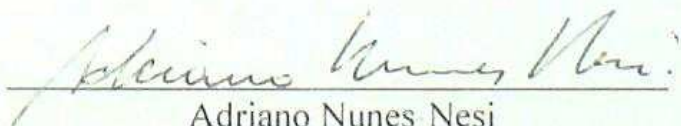
APROVADA: 23 de fevereiro de 2015.



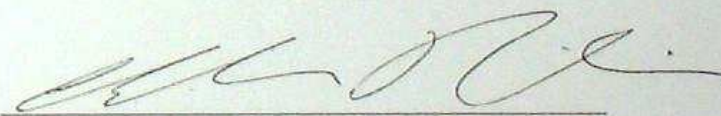
Luzimar Campos da Silva



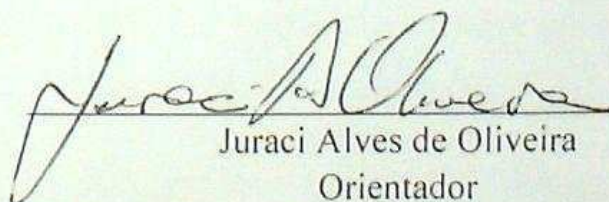
Evaristo Mauro de Castro



Adriano Nunes Nesi
Coorientador



Cléberson Ribeiro
Coorientador



Juraci Alves de Oliveira
Orientador

Aos meus amados pais e irmãos, por serem a minha medida
de amor, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq e à FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Juraci, meu orientador (no estágio, na monografia, na dissertação e, agora, na tese), agradeço por todos os anos de aprendizagem, confiança e amizade.

Aos co-orientadores Adriano Nunes-Nesi, Cléberon Ribeiro e, em especial, ao Élder Antônio Souza e Paiva, pela ajuda ao longo do desenvolvimento do trabalho e pela paciência.

Ao professor Christian Lindermayr, por me receber no instituto HelmHoltz Zentrum Munchem e por ter contribuído de forma tão significativa para minha qualificação profissional.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálises (NMM) e em especial a Karla pela colaboração nas análises.

Aos membros da banca pela disponibilidade em analisar esse material.

Aos meus pais, Edmar e Zélia, aos meus irmãos, Mariana e Lucas e a minha cunhada Amanda, por todo o carinho e compreensão. Por serem sempre o meu porto seguro.

Ao meu querido Paulo, por encher de amor as minhas horas de estudo e trabalho, além da ajuda inestimável em diversas análises.

A todos os colegas que compartilharam o laboratório comigo ao longo de todos esses anos, em especial à Gabi, Grasi, Fernanda e Adinan, pelos trabalhos compartilhados, pela amizade e pelas boas risadas, que deixaram saudade.

Aos meus colegas de trabalho no HelmHoltz Zentrum Munchem, em especial à Caterina e Joy, que pelas incontáveis horas de trabalho e diversão.

À Deus.

BIOGRAFIA

Fernanda dos Santos Farnese, filha de Edmar Farnese e Zélia Santos Farnese, nasceu em 11 de abril de 1986, em Lagoa da Prata, MG.

Em fevereiro de 2009, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Minas Gerais (Funedi/UEMG).

Em março de 2009 iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV) e, em fevereiro de 2011, defendeu a sua dissertação. Iniciou o doutorado, também em Fisiologia Vegetal, nessa mesma universidade em março de 2011 e, em fevereiro de 2015, submeteu-se à defesa de tese.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
Introdução Geral	1
Artigo I	4
1. Introdução	5
2. Materiais e métodos	7
2.1 Cinética de absorção de arsênio	7
2.2 Efeito do NO sobre o metabolismo vegetal	8
2.2.1 Teor de arsênio e fator de translocação	8
2.2.2 Determinação da concentração de espécies reativas de oxigênio	8
2.2.3 Integridade de membrana	9
2.2.4 Sistema antioxidante enzimático	9
2.2.5 Sistema antioxidante não enzimático	10
2.3 Análises estatísticas	11
3. Resultados	11
3.1 Cinética de absorção de arsênio	11
3.2 Teor de arsênio absorvido e fator de translocação	11
3.3 Concentração de espécies reativas de oxigênio	12
3.4 Efeito do arsênio e do SNP na integridade da membrana	14
3.5 Efeito do arsênio e do SNP sobre o sistema antioxidante enzimático	14
3.6 Efeito do arsênio e do SNP na concentração de ascorbato e desidroascorbato	17
4. Discussão	18
5. Referências	21
Artigo II	27
1. Introdução	29
2. Materiais e métodos	31
2.1 Absorção de As, efeitos sobre o crescimento vegetal e nutrição mineral	31

2.1.1	Acúmulo de arsênio e seu efeito sobre o crescimento vegetal	31
2.1.2	Índice de tolerância ao arsênio	32
2.1.3	Determinação da concentração de nutrientes minerais	32
2.2	Avaliação das alterações metabólicas	32
2.2.1	Concentração de espécies reativas de oxigênio	32
2.2.2	Capacidade antioxidante total	33
2.2.3	Concentração dos pigmentos cloroplastídicos	33
2.2.4	Parâmetros de fluorescência	34
2.2.5	Trocas gasosas	34
2.3	Análises estatísticas	34
3.	Resultados	35
3.1	Acúmulo de arsênio e seu efeito sobre o crescimento vegetal	35
3.2	Índice de tolerância ao arsênio	37
3.3	Concentração de nutrientes minerais	37
3.4	Concentração de espécies reativas de oxigênio	38
3.5	Capacidade antioxidante total	39
3.6	Concentração dos pigmentos cloroplastídicos	40
3.7	Efeito do arsênio e do SNP sobre os parâmetros de fluorescência	41
3.8	Efeito do arsênio e do SNP sobre as trocas gasosas	41
4.	Discussão	45
5.	Referências	48
	Conclusões Gerais	54
	Referências	55

RESUMO

FARNESE, Fernanda dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015.

Sinalização celular em resposta ao arsênio: mecanismos de ação do óxido nítrico em nível molecular, bioquímico, fisiológico, ultraestrutural e implicações para fitorremediação. Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientadores: Élder A. S. Paiva, Adriano Nunes Nesi e Cléberon Ribeiro.

O óxido nítrico (NO) é um importante sinalizador celular em condições de estresses bióticos ou abióticos. No presente estudo investigou-se o papel deste sinalizador na resposta de *Pistia stratiotes* ao arsênio (As). As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, ¼ da força iônica, foram expostas a quatro tratamentos, por 24 horas: controle (apenas solução nutritiva); nitroprussiato sódico (SNP – doador de NO) (0,1 mg L⁻¹); As (1,5 mg L⁻¹); As+SNP (1,5 e 0,1 mg L⁻¹, respectivamente). Para análise de crescimento as plantas permaneceram por três dias nas condições supracitadas. O acúmulo de As por *P. stratiotes* aumentou a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que teve efeitos danosos sobre a integridade das membranas celulares e sobre vários processos fisiológicos, como fotossíntese, respiração e fotorrespiração. Em relação à fotossíntese, diversos parâmetros foram alterados, desde a concentração de pigmentos até a fixação de carbono, com conseqüente queda na concentração de sacarose. Comportamento similar foi observado em relação à taxa de fotorrespiração, que também apresentou decréscimos. O processo respiratório, por sua vez, aumentou, provavelmente devido à similaridade química entre arsenato e fosfato, o que comprometeu o status energético da célula. Todos esses efeitos danosos do As se refletiram sobre a estrutura celular de *P. stratiotes*, provocando a desestruturação do sistema de membranas e o colapso do protoplasto, além de queda dos tricomas. Conseqüentemente, observou-se queda do crescimento vegetal e baixo índice de tolerância ao poluente. A adição de SNP, no entanto, foi capaz de atenuar os efeitos tóxicos do As, provavelmente através da S-nitrosilação proteica. A adição de SNP manteve a concentração de ROS em níveis similares ao controle e restaurou a taxa fotossintética, a estrutura celular das plantas e a taxa de crescimento. Esses efeitos benéficos do SNP aparentemente são conseqüências de alterações desencadeadas tanto no metabolismo primário, secundário e antioxidante de *P. stratiotes*. O SNP aumentou o NPQ e a atividade respiratória, além de inibir a fotorrespiração, o que provavelmente está relacionado com a manutenção da homeostase de ROS e com a geração de esqueletos de carbono para mecanismos de defesa. Essas alterações nos

processos vegetais foram acompanhadas por mudanças nas concentrações de açúcares, intermediários do ciclo de Calvin e intermediários da fotorrespiração. O SNP também influenciou de forma significativa o metabolismo antioxidante de *P. stratiotes* exposta ao As, tendo sido observado aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como dismutase do superóxido, peroxidase, catalase, peroxidase da glutatona e redutase da glutatona, e alteração a concentração de antioxidantes não enzimáticos, como glutatona, ascorbato e prolina. A glutatona foi particularmente importante na tolerância de *P. stratiotes* ao As, e parece ter agido tanto como substrato para atividade enzimática quanto para a síntese de fitoquelatinas. O SNP desencadeou ainda alterações nos metabólitos relacionados com a glicólise e com o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, além de afetar a concentração de vários polióis e aminoácidos, a maior parte dos quais estão relacionados com o combate ao estresse oxidativo. A adição de SNP permitiu, portanto, a integração dos processos vegetais e o ajuste da maquinaria metabólica de *P. stratiotes* em resposta ao As, o que resultou na reprogramação do metabolismo antioxidante e alterações no metabolismo primário e secundário, culminando com o aumento da tolerância das plantas ao metaloide.

ABSTRACT

FARNESE, Fernanda dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2015. **Cell signaling in response to arsenic: action of nitric oxide on the molecular, biochemical, physiological, ultrastructural level and implications for phytoremediation.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-advisers: Élder A. S. Paiva, Adriano Nunes Nesi and Cléberon Ribeiro.

Nitric oxide (NO) is an important cellular signaling molecule involved in the response of plants to biotic and abiotic stress. This study investigated the role of NO in *Pistia stratiotes* responses to arsenic (As). The plants were cultivated in nutrient solution, pH 6.5, with ¼ of the full ionic strength and exposed to four treatments, for 24 hours: control (nutrient solution) sodium nitroprusside (SNP) (0.1 mg L⁻¹); As (1.5 mg L⁻¹); As + SNP (1.5 and 0.1 mg L⁻¹, respectively). For growth analysis, plants remained for three days in the conditions described above. The accumulation of As by *P. stratiotes* increased the concentration of reactive oxygen species, which had harmful effects on the integrity of cell membranes and several physiological process, as photosynthesis, respiration and photorespiration. Regarding the photosynthesis, several parameters have changed, including since the pigment concentration until the carbon fixation, with consequent decrease in sucrose concentration. Similar behavior was observed in relation to photorespiration rate, which also decreased. The respiration process increased, probably due to chemical similarity between arsenate and phosphate, which compromised the energy status of the cell. All these harmful effects of As were reflected in the cellular structure of *P. stratiotes*, causing the disruption of the membranes system, the collapse of the protoplast and fall in trichomes. As a consequence, there was decrease of plant growth and low level of tolerance to the pollutant. The addition of SNP, however, was able to attenuate the toxic effects of the As, probably through protein S-nitrosylation. The addition of SNP remained the concentration of ROS at levels similar to the control and restored the photosynthetic rate, the cellular structure and the growth rate. These beneficial effects of SNP apparently are consequences of changes triggered both in primary, secondary and antioxidant metabolism of *P. stratiotes*. The SNP increased the NPQ and the respiratory activity, and inhibited photorespiration, which is probably related to the maintenance of ROS homeostasis and the generation of carbon skeletons for defense mechanisms. These changes in plant processes were accompanied by changes in sugar concentrations, Calvin cycle intermediates and intermediates of the photorespiration. The SNP also influenced the antioxidant metabolism of *P.*

stratiotes exposed to As and increased the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, peroxidase, catalase, glutathione peroxidase and of glutathione reductase, and altered the concentration of non-enzymatic antioxidants such as glutathione, ascorbate and proline. Glutathione was particularly important in the tolerance of *P. stratiotes* to As, and appears to have acted both as a substrate for enzyme activity as for the phytochelatin synthesis. The SNP also triggered changes in metabolites related with the glycolysis and the tricarboxylic acid cycle and affected the concentration of various polyols and amino acids, most of which are related to the oxidative stress. The addition of SNP therefore enabled the integration of plant physiological processes and the adjusting the metabolic machinery of *P. stratiotes* in response to As, resulting in the reprogramming the antioxidant metabolism and changes in primary and secondary metabolism, culminating in the increase in the plant tolerance to the metalloid.

INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação da água utilizada para consumo humano com arsênio (As) é um problema de proporções globais, com enormes implicações para a conservação da biodiversidade e para a saúde humana. De fato, o As é responsável por maiores taxas de mortalidade do que qualquer outro contaminante (Kumar e Suzuki, 2002; Yuan *et al.*, 2007). A elevação das concentrações de As no ambiente aquático resulta do despejo direto de resíduos nos cursos d'água ou das atividades antrópicas que liberam o As presente no solo, possibilitando, assim, que esse elemento seja drenado e atinja rios, lagos e águas subterrâneas (Shankar *et al.*, 2014). Apenas na América Latina, estima-se que existam pelo menos 14 milhões de pessoas expostas a concentrações tóxicas deste poluente (Litter *et al.*, 2011). No Brasil, um dos locais mais afetados é o Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais, onde a intensa atividade de mineração nos últimos 300 anos foi responsável pelo lançamento de, no mínimo, 390.000 toneladas de As nos corpos hídricos da região (Borba *et al.*, 2004).

Vários estudos já foram realizados na busca de técnicas para remover o As do ambiente, mas a maioria dos métodos desenvolvidos até então envolvem alto capital e acarretam danos ambientais (Mishra e Tripathi, 2008). Neste contexto, a fitorremediação, técnica que utiliza plantas para remover compostos tóxicos do solo, água ou atmosfera, se insere como uma alternativa para a descontaminação de ambientes contaminados com As (Susarla *et al.*, 2002). Como exemplo de plantas com alto potencial para a fitorremediação pode-se citar *Pistia stratiotes* L. (Araceae), uma macrófita aquática capaz de absorver grandes quantidades de metais tóxicos, além de apresentar alta produção de biomassa (Prasad e Greger, 2001), ambas características fundamentais para utilização de plantas na

extração de poluentes (Melo *et al.*, 2006). Embora já tenha sido demonstrado que *Pistia stratiotes* é capaz de absorver e acumular altas concentrações de As, os severos danos desencadeados pelo mesmo comprometem seu crescimento e metabolismo, o que limita sua utilização em programas de fitorremediação (Farnese *et al.*, 2014).

Dentre os vários danos desencadeados pelo As nas células vegetais, o mais comum é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo decorre do aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais podem oxidar as principais macromoléculas celulares, comprometendo diversos processos fisiológicos, como a fotossíntese, e causando, inclusive, a morte celular. Além disso, por ser análogo ao fosfato, quando o As é suprido na forma de arsenato o metabolismo do fosfato pode ser comprometido, já que o arsenato pode substituir o fosfato no sítio ativo de diversas enzimas. Isso ocorre, por exemplo, durante a respiração celular. Estes danos podem ser evitados ou minimizados pela atuação de mecanismos antioxidativos enzimáticos, como as enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidases (POX), catalases (CAT) e peroxidases do ascorbato (APX), mecanismos não enzimáticos, como a glutationa e o ascorbato, e pela ação de agente complexantes do As, como as fitoquelatinas (Singh *et al.*, 2009).

A ativação dos mecanismos de defesa em resposta ao As envolve alteração na expressão gênica e na atividade de enzimas e proteínas, o que é consequência de complexas cascatas de sinalização. Dentre os vários componentes dessas vias de sinalização, o óxido nítrico (NO) se insere como molécula gasosa que desempenha papel fundamental na ativação ou inibição de diversos processos vegetais (Baudouin e Hancock, 2014).

O NO foi inicialmente identificado nas plantas como um radical danoso e, apenas no início de 1998, começaram a ser publicados os primeiros trabalhos enfatizando o papel do NO na sinalização celular (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007). A partir de

então, numerosos estudos tem reportado o papel do NO na resposta das plantas a diferentes estímulos, principalmente em resposta a estresses bióticos e abióticos, incluindo o As (Singh *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2014; Hasanuzzaman e Fujita, 2014; Puyaubert e Baudouin, 2014). Em relação ao As, já foi demonstrado que o NO é capaz de agir como um sinalizador e aumentar a atividade e/ou concentração de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Namdjoyan e Kermaian, 2013; Singh *et al.*, 2013). Os mecanismos envolvidos nessa sinalização ainda não estão totalmente esclarecidos, mas acredita-se que a S-nitrosilação proteica seja particularmente importante nesse processo, já tendo sido demonstrado que ela é essencial na resposta de plantas a patógenos. A S-nitrosilação proteica consiste na ligação covalente do NO com determinados resíduos de cisteína na proteína-alvo, o que pode alterar a atividade, a estabilidade ou a localização subcelular da proteína (Sehrawat e Deswal, 2014).

Apesar dos diversos estudos, no entanto, muitas lacunas ainda existem, principalmente devido à ausência de estudos que enfoquem o efeito global do NO sobre a célula. Da mesma forma, também são escassos trabalhos que demonstrem se a sinalização pelo NO é efetiva em atenuar os danos desencadeados pelo As sobre a estrutura de organelas vegetais e os processos fisiológicos a elas associados. De fato, metodologias para avaliações da ultraestrutura ou perfil metabólico raramente são utilizadas em estudos que enfoquem a resposta das plantas a metais pesados, bem como o papel do NO nesse processo. Desta forma, o presente trabalho objetivou analisar o efeito do NO sobre a ultraestrutura, fisiologia e metabolismo de espécimes de *Pistia stratiotes* submetidas ao As, a fim de gerar um panorama global dos mecanismos de ação através dos quais o NO aumenta tolerância das plantas ao metaloide.

Referências bibliográficas

Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J (2007). Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science** 172: 876-887.

Baudouin E, Hancock JT (2014) Nitric oxide signaling in plants. **Frontiers in Plant Science** 4: 1-3.

Borba RP, Figueiredo BR, Cavalcanti JA (2004) Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). **Revista Escola de Minas** 57: 45-51.

Farnese, FS, Oliveira JA, Lima FS, Leão GA, Gusman GS, Silva LC (2014) Evaluation of the potential of *Pistia stratiotes* L. (water lettuce) for bioindication and phytoremediation of aquatic environments contaminated with arsenic. **Brazilian Journal of Biology** 74: 103-112.

Kumar BM, Suzuki KT (2002) Arsenic around the world: a review. **Talanta** 58: 201-235.

Leão GA, Oliveira JA, Arantes RFT, Farnese FS, Gusman G (2013) Anthocyanins, thiols, and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. **Journal of Plant Interactions** 2013: 1-9.

Litter MI, Alarcón-Herrera MT, Arenas MJ, Armienta MA, Avilés M, Cáceres RE, Cipriani HN, Cornejo L, Dias LE, Cirelli AF, Farfán EM, Garrido S, Lorenzo L, Morgada ME, Olmos-Márquez MA, Pérez-Carrera A (2011) Small-scale and household methods to remove arsenic from water for drinking purposes in Latin America. **Science of the Total Environment** 429: 107-122.

Melo EEC, Nascimento CWA, Santos ACQ (2006) Solubilidade, fracionamento e fitoextração de metais pesados após aplicação de agentes quelantes. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 30: 1051-1060.

Mishra VK, Tripathi BD (2008) Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology** 99: 7091-7097.

Prasad MNV, Greger M, Smith B (2001). Aquatic macrophytes. In: Prasad MNV, **Metals in the Environment: Analysis by biodiversity**, New York, Marcel Dekker (2001) 259-288.

Shankar S, Shanker U, Shikha S (2014) Arsenic contamination of groundwater: a review of sources, prevalence, health risks, and strategies for mitigation. **The Scientific World Journal** 2014: 1-18.

Sehrawat A, Deswal R (2014) Sub-proteome S-nitrosylation analysis in *Brassica juncea* hints at the regulation of Brassicaceae specific as well as other vital metabolic pathway(s) by nitric oxide and suggests post-translational modifications cross-talk. **Nitric oxide** 43: 97-111.

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

Susarla S, Medina VF, McCutcheon A (2002) Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering** 18; 647–658.

Yuan Y, Marshall G, Ferreccio C, Steinmaus C, Selvin S, Liaw J, Bates M, Smith A (2007) Acute myocardial infarction mortality in comparison with lung and bladder cancer mortality in arsenic-exposed region II of Chile from 1950 to 2000. **American Journal of Epidemiology** 166: 1381-1391.

Singh VP, Srivastava PK, Prasad SM (2013) Nitric oxide alleviates arsenic-induced toxic effects in ridged *Luffa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry** 71: 155-163.

Namdjoyan S, Kermanian, H (2013) Exogenous nitric oxide (as sodium nitroprusside) ameliorates arsenic-induced oxidative stress in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) plants. **Scientia Horticulturae** 161: 350-356.

Hasanuzzaman M, Fujita M (2014) Exogenous sodium nitroprusside alleviates arsenic-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by enhancing antioxidant defense and glyoxalase system. **Ecotoxicology** 22: 584-596.

Puyaubert J, Baudouin E (2014) New clues for a cold case: nitric oxide response to low temperature. **Plant Cell and Environment** 37: 2623-2630.

Gong BA, Miao L, Kong WJ, Bai JG, Wang XF, Wei M, Shi QH (2014) Nitric oxide, as a downstream signal, plays vital role in auxin induced cucumber tolerance to sodic alkaline stress. **Plant Physiology and Biochemistry** 83: 258-266.

Artigo I

Exposição de *Pistia stratiotes* ao arsênio e ao óxido nítrico: implicações fisiológicas, micromorfológicas, ultraestruturais

RESUMO

A toxicidade do arsênio (As) e o efeito do óxido nítrico, suprido na forma de nitroprussiato sódico (SNP), sobre a fisiologia, a ultraestrutura e a micromorfologia de *Pistia stratiotes*, foram investigados. As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, ¼ da força iônica, foram expostas a quatro tratamentos, por 24 horas: controle (apenas solução nutritiva); SNP (0,1 mg L⁻¹); As (1,5 mg L⁻¹); As+SNP (1,5 e 0,1 mg L⁻¹, respectivamente). A absorção de As pelas plantas aumentou a concentração de peróxido de hidrogênio nas células e desencadeou alterações na fotossíntese, na respiração e na fotorrespiração. Em relação à fotossíntese, diversos parâmetros foram alterados, desde a concentração de pigmentos até a fixação de carbono, com conseqüente queda na concentração de sacarose. Comportamento similar foi observado em relação à taxa de fotorrespiração, que também apresentou decréscimos. O processo respiratório, por sua vez, aumentou, provavelmente devido à similaridade química entre arsenato e fosfato, o que comprometeu o status energético da célula. Todos esses efeitos danosos do As se refletiram sobre a estrutura celular de *P. stratiotes*, provocando a desestruturação do sistema de membranas e o colapso do protoplasto, além de queda dos tricomas. A adição de SNP atenuou todos os efeitos tóxicos do As, sendo capaz de manter a concentração de peróxido de hidrogênio em níveis similares ao controle e restaurando a taxa fotossintética e a estrutura celular das plantas. O efeito benéfico do SNP provavelmente envolveu o aumento do NPQ e da atividade respiratória, bem como a inibição da fotorrespiração, evidenciando a importância da integração desses processos para a manutenção da homeostase celular.

Palavras-chave: fotossíntese; respiração; fotorrespiração; carga energética celular.

ABSTRACT

Arsenic (As) toxicity and nitric oxide effect, supplied in the form of sodium nitroprusiate (SNP), were analyzed in *Pistia stratiotes*. The plants were cultivated in nutrient solution, pH 6.5, with $\frac{1}{4}$ of the full ionic strength and exposed to four treatments, for 24 hours: control (nutrient solution) SNP (0.1 mg L⁻¹); As (1.5 mg L⁻¹); As + SNP (1.5 and 0.1 mg L⁻¹, respectively). The absorption of As by plants increased the concentration of hydrogen peroxide in the cells and triggered changes in photosynthesis, respiration and photorespiration. Regarding the photosynthesis, several parameters have changed, including since the pigment concentration until the carbon fixation, with consequent decrease in sucrose concentration. Similar behavior was observed in relation to photorespiration rate, which also decreased. The respiration process increased, probably due to chemical similarity between arsenate and phosphate, which compromised the energy status of the cell. All these harmful effects of As were reflected in the cellular structure of *P. stratiotes*, causing the disruption of the membranes system, the collapse of the protoplast and fall in trichomes. These damages were reversed by the SNP, that was able to maintain the concentration of hydrogen peroxide at levels similar to the control, restoring the photosynthetic rate and the cell structure of the plant. The beneficial effect of SNP probably involved the increase in the NPEQ and in respiration, as well as inhibition of photorespiration, demonstrating the importance of the integration of these processes to the maintenance of cellular homeostasis.

Keywords: photosynthesis; respiration; photorespiration; cellular energy charge.

1. Introdução

O arsênio (As) é um metaloide tóxico que ocorre naturalmente no ambiente, principalmente devido à dissolução de determinados tipos de rochas. Altas concentrações de As, no entanto, são potencialmente tóxicas para todas as formas de vida e ocorrem em todo o mundo, sobretudo como consequência de ações antrópicas que liberam este metaloide no meio (Kumar *et al.*, 2015; Bundschuh *et al.*, 2012). O arsenato é a forma

química na qual o As é predominantemente encontrado em ambientes oxigenados, como solos aeróbicos e águas superficiais. O arsenato é um análogo químico do fosfato e, portanto, pode ser facilmente absorvido por plantas através de transportadores de fosfato de alta afinidade presentes nas raízes (Castrillo *et al.*, 2013). Uma vez absorvido, este poluente desencadeará sérias alterações no metabolismo vegetal, o que pode comprometer processos bioquímicos e fisiológicos e poderá refletir em alterações na micromorfologia e na organização celular das plantas (Schneider *et al.*, 2013).

Grande parte dos danos desencadeados pelo As é consequência da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A produção de ROS ocorre naturalmente como consequência do metabolismo aeróbico e, em condições celulares normais, a sua homeostase é cuidadosamente balanceada, o que mantém seus níveis aproximadamente constantes. Em condições estressantes, no entanto, a geração de ROS aumenta bruscamente, afetando organelas e processos vegetais o que, em última instância, compromete o crescimento e a sobrevivência da planta (Gusman *et al.*, 2013; Leão *et al.*, 2014; Rofkar *et al.*, 2014).

As plantas frequentemente respondem aos agentes estressores por meio da reprogramação dos seus processos fisiológicos e metabólicos, a fim de garantir a manutenção da homeostase e o perfeito funcionamento celular. Processos como fotossíntese, fotorrespiração e respiração estão intrinsecamente relacionados e são essenciais para a tolerância das plantas a estresses abióticos, sendo cuidadosamente regulados em condições adversas (Gupta e Huang, 2014; Millar *et al.*, 2011; Osakabe *et al.*, 2014). Acredita-se que essa regulação envolva tanto mudanças no estado redox celular quanto a participação de sinalizadores celulares (Millar *et al.*, 2011).

O óxido nítrico (NO) é um sinalizador celular particularmente importante no processo de tolerância das plantas a agentes estressores. Nos últimos anos, diversos pesquisadores demonstraram que a adição de NO é capaz de aumentar a tolerância das plantas ao As (Namdjoyan and Kermanian, 2013; Singh *et al.*, 2013; Talukdar 2013; Jin *et al.*, 2010). Fortes evidências indicam que o NO age como um mensageiro secundário, desencadeando diferentes tipos de respostas celulares, como o incremento dos sistemas de defesa antioxidante (Fan *et al.*, 2014). Esta molécula também age como sinalizador nos principais processos fisiológicos da planta, alterando a fotossíntese e a respiração em diferentes condições ambientais (Jhanji *et al.*, 2012; Vanlerberghe, 2013). A maioria dos estudos realizados até o momento, no entanto, analisa esses processos isoladamente e não enfoca a resposta das plantas a metais pesados, de forma que ainda não está claro se o NO é capaz de alterar simultaneamente vários processos fisiológicos e, por conseguinte, reprogramar o metabolismo vegetal a fim de aumentar a tolerância das plantas ao As. Além disso, estes trabalhos não enfocam os efeitos do NO sobre as organelas celulares, não havendo dados que apresentem complementariedade entre estrutura e função, o que restringe a compreensão dos mecanismos de tolerância. Com base nesses fatos, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do As e do NO sobre a fisiologia, micromorfologia e ultraestrutura celular de *Pistia stratiotes*, macrófita aquática capaz de absorver e acumular grandes quantidades de As, sendo bastante sensível aos danos desencadeados por este metaloide.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção das plantas

Espécimes de *Pistia stratiotes* L. (Araceae) foram coletados no horto florestal da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil) e esterilizados com hipoclorito de sódio 1% durante 1 min, sendo então lavados em água corrente e água destilada. Os espécimes coletados foram transferidos para solução nutritiva de Clark (1975), ¼ da força iônica, pH 6,5, sendo mantidas em sala de crescimento de plantas, com luz e temperatura controladas (25 ± 2 °C; $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e fotoperíodo de 16 horas. As plantas permaneceram nestas condições por três dias para aclimação.

Após o período de aclimação, as plantas foram transferidas para recipientes contendo 0,5 L de solução nutritiva de Clark (1975), ¼ da força iônica, pH 6,5, e expostas a quatro tratamentos: controle (apenas solução nutritiva); SNP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$); As ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e As + SNP ($1,5$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). O SNP (nitroprussiato de sódio) é uma substância comumente utilizada em estudos bioquímicos como doadora de NO. As plantas permaneceram nestas condições por 24 horas.

2.1 Determinação do arsênio absorvido

A fim de determinar a concentração de As absorvido e translocado para as folhas por *P. stratiotes*, as folhas foram coletadas, lavadas em água destilada e mantidas em estufa convencional a 80°C até que o peso seco constante fosse obtido. O material seco foi macerado e digerido em uma mistura de ácido nítrico e perclórico (Marin *et al.* 1993), sendo a concentração de As determinada por meio de espectrômetro de emissão em plasma indutivamente acoplado (Optima 3300 DV, Perkin-Elmer, Norwalk, CT).

2.2 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

A fim de determinar a geração de espécies reativas de oxigênio, a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi quantificada utilizando-se amostras de 200 mg de folhas homogeneizadas em meio de extração (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM) e centrifugadas a 10.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 50 μ L do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo $FeNH_4SO_4$ 100 μ M, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μ M e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorvância determinada a 560 nm. As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 .

2.3 Processos fisiológicos vegetais

2.3.1 Pigmentos fotossintéticos, fluorescência da clorofila a e trocas gasosas

Para a determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos clorofila a e clorofila b, dois discos foliares de 0,5 cm de diâmetro foram coletados, pesados e incubados em 5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), saturado com carbonato de cálcio, por 24 horas (Wellburn, 1994). Após este período a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 665 e 649 nm, para determinação da clorofila a e clorofila b, respectivamente. A concentração dos pigmentos foi calculada empregando-se as equações propostas por Arnon (1949) e os resultados expressos em $mg\ g^{-1}\ MF$.

A análise da fluorescência mínima (F_0) foi realizada no período de antemanhã via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade (0,03 μ mol fótons $m^{-2}\ s^{-1}$). A fluorescência máxima (F_m) foi obtida pela aplicação de um pulso de 0,8

s de luz actínica saturante ($8000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel (F_v) foi determinada pela diferen\u00e7a entre F_0 e F_m e, a partir desses valores, foi calculado o rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II (van Kooten e Snel, 1990).

As folhas foram aclimatadas \u00e0 luz act\u00ednica ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 60 s, a fim de se obter a fluoresc\u00eancia transiente (F_s), seguido por um pulso de luz saturante para estimar-se a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima \u00e0 luz (F_m') e, por \u00faltimo, aplicou-se um pulso de luz vermelho-distante, para obter-se a fluoresc\u00eancia m\u00ednima ap\u00f3s aclima\u00e7\u00e3o \u00e0 luz act\u00ednica (F_0'). Com esses par\u00e2metros, foram calculados a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do transporte de el\u00e9trons associado ao fotossistema II (Φ_{FSII}), o rendimento qu\u00e2ntico da assimila\u00e7\u00e3o de CO_2 (Φ_{CO_2}) e o *quenching* n\u00e3o fotoqu\u00edmico (NPQ), conforme proposto por Maxwell e Johnson (2000).

A taxa de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida do carbono (A), a condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s) e a concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 (C_i) foram determinadas em sistema aberto, sob luz saturante ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e press\u00e3o parcial de CO_2 de 40 Pa, com um analisador de gases a infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA), equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6400-02B, LI-COR).

A concentra\u00e7\u00e3o de sacarose nas folhas de *P. stratiotes* foi determinada utilizando-se cromatografia gasosa acoplada \u00e0 espectrometria de massa (CG-EM), conforme descrito por Lisec *et al.*, 2006. A sacarose foi identificada por meio da compara\u00e7\u00e3o com padr\u00f5es aut\u00eênticos.

2.3.2 Respira\u00e7\u00e3o noturna e respira\u00e7\u00e3o mitocondrial

A respira\u00e7\u00e3o noturna (R_N), ou taxa de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida de CO_2 noturna, foi avaliada antes do amanhecer utilizando-se um analisador de gases \u00e0 infravermelho (LI-

6400, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA). A respiração mitocondrial durante o dia (R_D), por sua vez, foi estimada a partir de R_N , de acordo com Bai *et al.* (2008). R_D foi estimada à diferentes temperaturas usando o Q_{10} (Larcher, 1983), como a seguir:

$$R_D = R_N Q_{10}^{(T_d - T_n)/10} \quad (Q_{10} = 2,2);$$

em que T_n é a temperatura foliar no qual a R_n foi medida e T_d é a temperatura foliar na qual a R_D foi calculada.

2.3.3 Determinação da taxa fotorrespiratória e intermediários da fotorrespiração

A taxa de fotorrespiração (P_R) das plantas submetidas ao As e ao NO foi calculada utilizando-se os dados obtidos com o analisador de gases a infravermelho. O fluxo de elétrons utilizado para a carboxilação (ETRC) e para a oxigenação (ETRO) pela Rubisco (ribulose-1 5-bisphosphate carboxilase/oxigenase) também foram calculados. As seguintes fórmulas foram utilizadas (Epron *et al.*, 1995; Valentini *et al.*, 1995):

$$P_R = 1/12[ETR_T - 4(A + R_D)];$$

$$ETRC = 1/3[ETR_T + 8(A + R_D)];$$

$$ETRO = 2/3[ETR_T + 4(A + R_D)];$$

Para determinar a concentração dos aminoácidos serina e glicina, amostras foliares foram submetidas à extração metanólica, sendo os aminoácidos quantificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), conforme descrito por Lisek *et al.* (2006). Os aminoácidos foram identificados por meio da comparação com banco de dados criados a partir de padrões autênticos (Kopka *et al.*, 2005).

2.4 Concentração de ATP, ADP e AMP

As concentrações de ATP, ADP e AMP foram determinadas utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Waters 2695, Inc., Miliford, MA, USA), sendo as amostras foliares homogeneizadas e processadas de acordo com Liu *et al.*, 2006. Foi utilizada coluna de troca aniônica Pinnacle II-C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; Restek) e detector ultravioleta a 254 nm. A carga energética das células foi calculada segundo descrito por Pradet e Raymond (1983):

$$([\text{ATP}] + 0,5 [\text{ADP}]) / ([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]).$$

2.5 Alterações micromorfológicas e ultraestruturais desencadeados pelo arsênio e óxido nítrico

Para visualização da micromorfologia foliar, amostras da região mediana da folha foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2, por 2 horas. Após este período as amostras foram desidratadas em série etanólica crescente, submetidas à secagem ao ponto crítico com CO₂ líquido (Balzers, Modelo CPD 020, Bal-Tec, Liechtenstein), fixadas em stubs e, por fim, submetidas à deposição metálica com ouro em equipamento Balzers (Modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzer, Liechtenstein). Observações e documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO (Modelo 1430VP).

Para visualização dos danos ultraestruturais, por sua vez, amostras foliares de *P. stratiotes* foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,9, por 4 horas. A seguir as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e desidratadas em série etanólica crescente. O material foi então incluído em resina Spurr e seções ultra-finas de 70-90 nm foram obtidas em ultramicrotomo (modelo UCT, Leica

Microsystems Inc., Deerfield), com auxílio de uma navalha de diamante. Os cortes foram recolhidos em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963), sendo observados em microscópio eletrônico de transmissão modelo Tecnai G2–Spirit (Philips/FEI Company, Eindhoven, Netherlands), com câmera digital acoplada.

2.6 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo os dados submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls), a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAEG, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

3. Resultados

3.1 Absorção de arsênio e geração de espécies reativas de oxigênio

As plantas expostas ao As foram capazes de absorver, translocar e acumular grandes quantidades do poluente nas folhas (Fig. 1A). Embora a presença de SNP não tenha alterado o padrão de acúmulo de As, verificou-se que o mesmo não ocorreu em relação à produção de peróxido de hidrogênio. Nesse caso, as plantas expostas apenas ao As apresentaram maiores concentrações de H₂O₂ em relação aos demais tratamentos (Fig 1B).

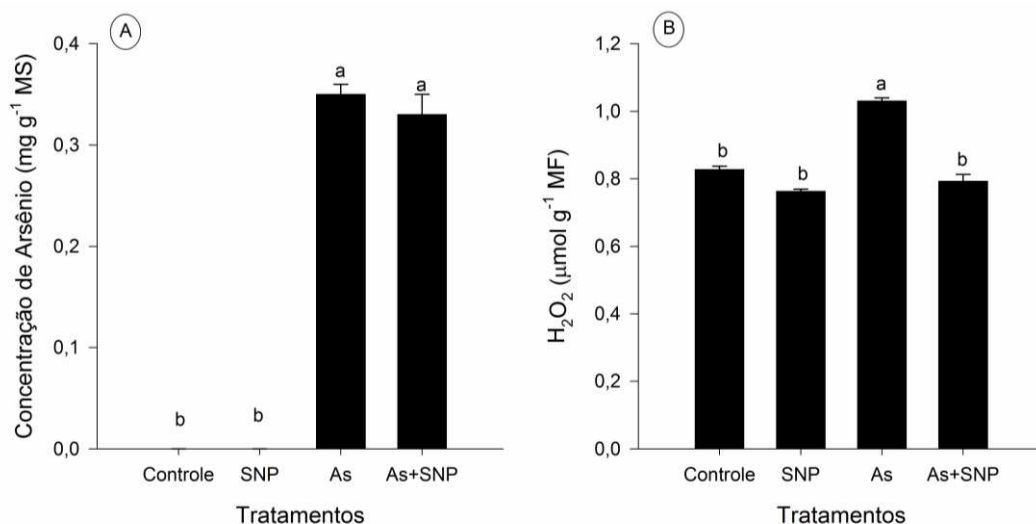


Figura 1. Concentração de arsênio (A) e peróxido de hidrogênio (B) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

3.2 Efeitos do arsênio e do óxido nítrico sobre os processos fisiológicos vegetais

3.2.1 Fotossíntese

A exposição de *P. stratiotes* ao As desencadeou alterações na fotossíntese, na respiração e na fotorrespiração. Em relação à fotossíntese, processo central no metabolismo vegetal, diversos parâmetros foram alterados após a exposição ao As. As concentrações de clorofila a e de clorofila b diminuíram significativamente após a exposição ao As (Fig. 2A e B), sendo estes decréscimos mais marcantes na concentração clorofila b. O acréscimo de SNP na solução contendo As foi, contudo, capaz de atenuar os efeitos tóxicos do As sobre os pigmentos cloroplásticos, os quais apresentaram valores estatisticamente iguais ao controle.

Embora o poluente não tenha desencadeado alterações no rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), a eficiência de operação do fotossistema II (Φ_{FSII}) e o

rendimento quântico da assimilação de CO₂ (Φ_{CO_2}) foram afetados. Esses danos foram atenuados pela adição de SNP, de forma que os parâmetros foram mantidos em níveis semelhantes àqueles do controle (Fig. 2C, D e E). O NO desencadeou, ainda, incremento no *quenching* não fotoquímico (NPQ) das plantas expostas ao poluente em combinação com SNP (Fig. 2F).

Além da fluorescência da clorofila a, as trocas gasosas também foram afetadas pelo As, tendo sido observadas diminuições na taxa de assimilação líquida de carbono (A) (Fig. 3A), enquanto a concentração interna de CO₂ (C_i) e a condutância estomática (g_s) mantiveram-se constantes (Fig. 3B e C). Apesar do SNP ter sido capaz de manter a taxa de assimilação líquida em níveis semelhantes àqueles observados no controle, a concentração de sacarose diminuiu em todos os tratamentos, sendo esse decréscimo mais significativo quando o As foi suprido em conjunto com o SNP (Fig. 3D).

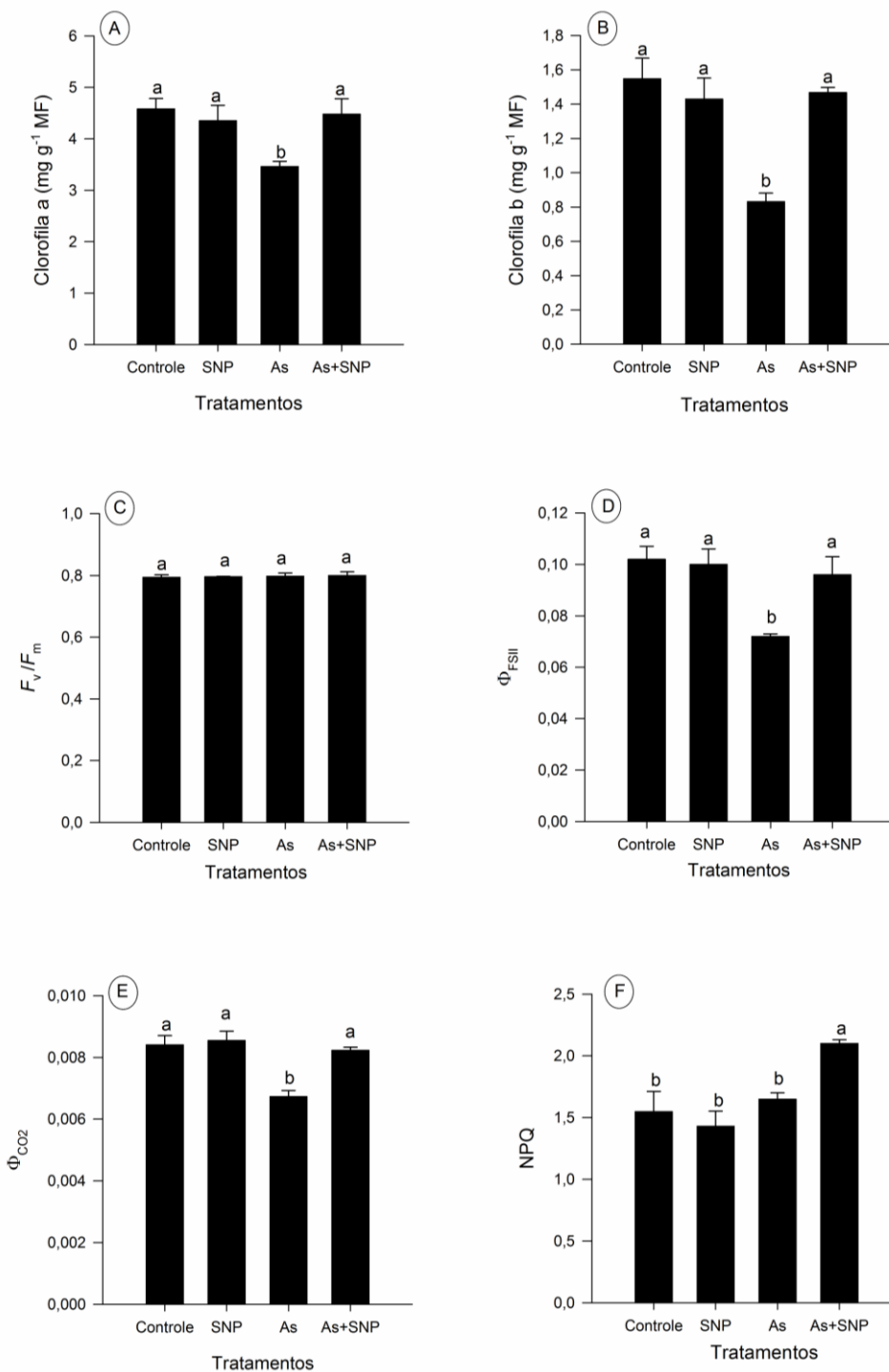


Figura 2. Clorofila a (A), Clorofila b (B), Rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (C), Eficiência de operação do fotossistema II (Φ_{FSII}) (D), rendimento quântico da assimilação de CO₂ (Φ_{CO2}) (E) e *quenching* não fotoquímico (NPQ) (F) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

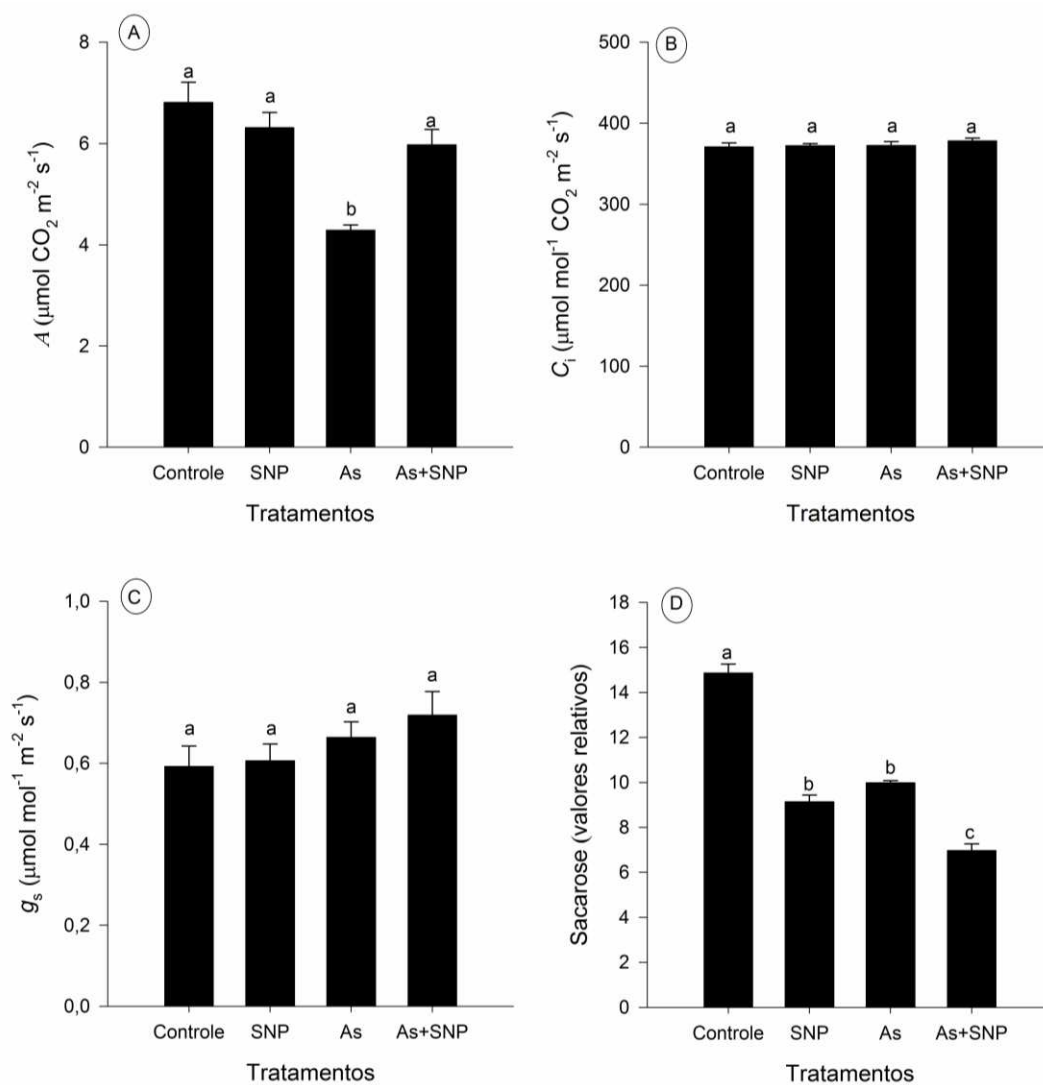


Figura 3. Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), concentração interna de CO_2 (C_i) (B), condutância estomática (g_s) (C) e concentração de sacarose (valores normalizados pelo ribitol) (D) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

3.2.2 Respiração

Tanto o As quanto o SNP promoveram acréscimo na respiração noturna (R_N), na razão R_N/A e na respiração mitocondrial (R_D) das folhas de *P. stratiotes*, sendo que o aumento foi mais significativo quando As e SNP foram supridos em conjunto (Fig. 4A, B e C). O As também afetou os pools de ATP e ADP (Fig. 4D e E), o que resultou em decréscimos na razão ATP/ADP (Fig. 4F). De fato, a razão ATP/ADP foi mais de duas vezes maior nas plantas submetidas ao As+SNP do que naquelas expostas apenas ao As, de forma que a carga energética das células vegetais foi restaurada pelo SNP (Fig. 4G).

3.3.3 Fotorrespiração

Tanto o As quanto o SNP diminuíram a taxa fotorrespiratória (P_R) das plantas, sendo este efeito mais pronunciado quando as duas substâncias foram supridas em conjunto (Fig. 5A). Embora a taxa de carboxilação da Rubisco (ETRc) tenha se alterado apenas no tratamento contendo o metaloide, a taxa de oxigenação (ETRo) diminuiu nos tratamentos As e As+SNP (Fig. 5B e C). Como consequência, a razão ETRc/ETRo aumentou somente nas plantas expostas simultaneamente ao As e ao SNP (Fig. 5D). Como reflexo da diminuição em P_R , a razão glicina/serina também diminuiu em resposta ao SNP e ao As (Fig. 5E).

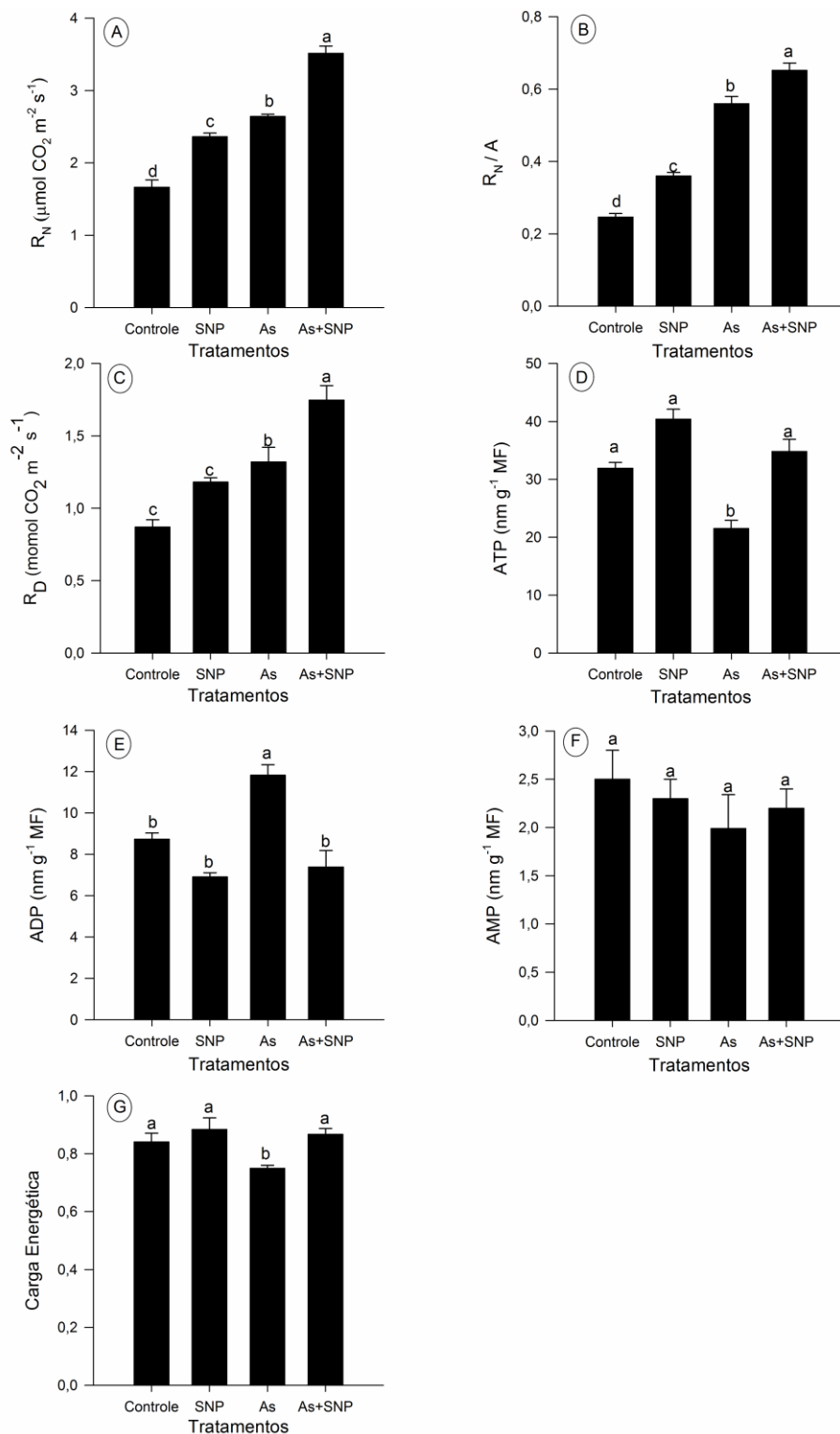


Figura 4. Respiração noturna (R_N) (A), razão R_N/A (B), Respiração mitocondrial (R_D) (C), concentração dos nucleotídeos adenilatos ATP (D), ADP (E) e AMP (F) e carga energética celular (G) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

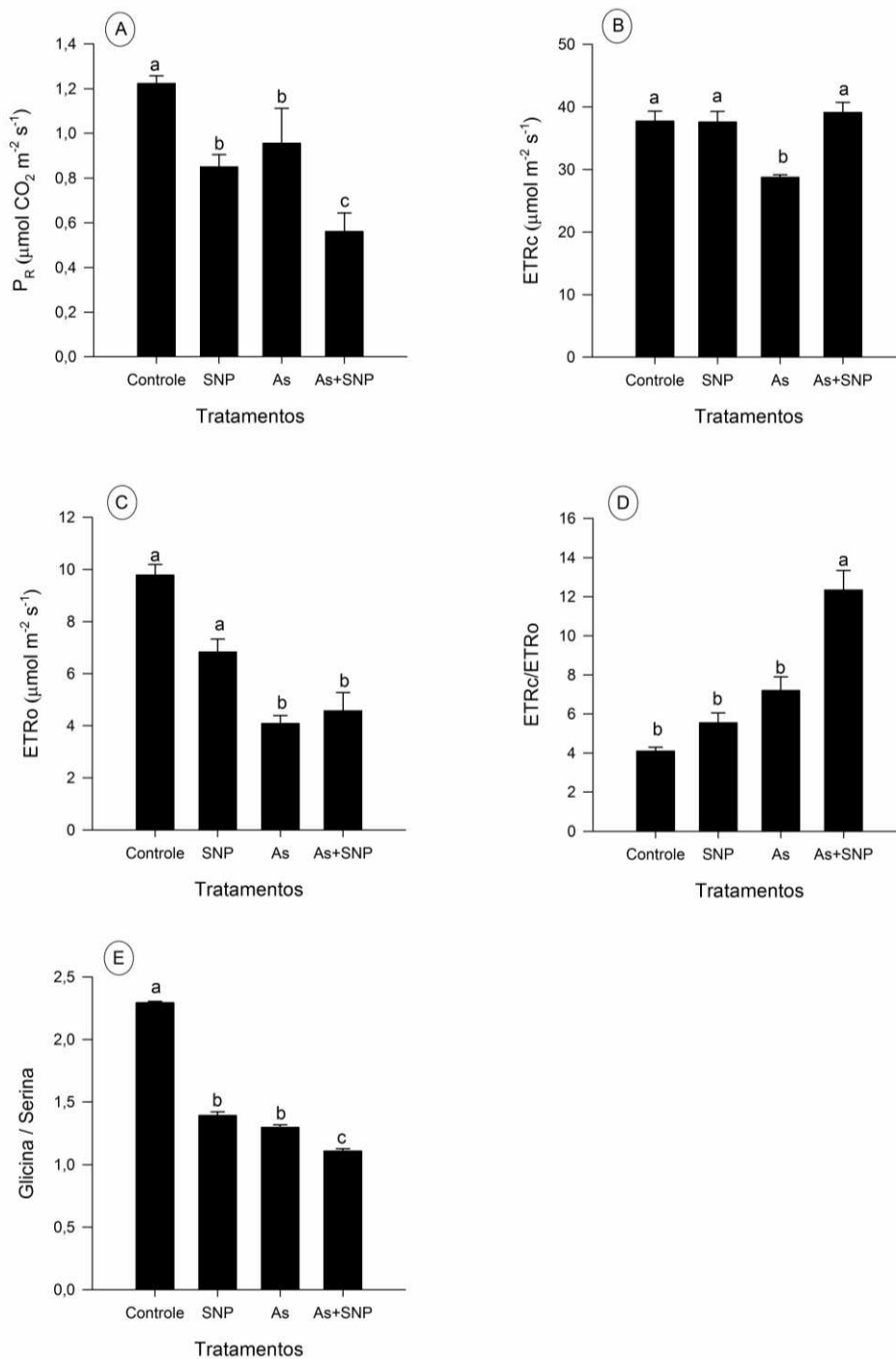


Figura 5. Fotorrespiração (P_R) (A), taxa de carboxilação da Rubisco (ETRc) (B), taxa de oxigenação da Rubisco (ETRo) (C), razão ETRc/ETRo (D) e razão glicina/serina (E) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

3.3 Alterações micromorfológicas e ultraestruturais

A exposição ao As desencadeou diversas alterações na micromorfologia e na ultraestrutura das células foliares de *P. stratiotes*. Em relação à micromorfologia, a principal alteração desencadeada pelo poluente foi em relação à quantidade de tricomas presentes na epiderme foliar. Nas plantas que permaneceram na solução sem As (Fig. 6A) foi possível visualizar grande quantidade de tricomas tectores tanto na face adaxial quanto na face abaxial da epiderme. A exposição ao As, no entanto, teve efeito devastador sobre os tricomas, diminuindo significativamente o número desses apêndices epidérmicos. Além disso, os poucos tricomas remanescentes encontravam-se colapsados (Fig. 6B, C e F). A adição de NO foi capaz de atenuar parcialmente estes danos e, embora ainda fosse possível visualizar tricomas colapsados no tratamento As+SNP, o aspecto geral da epiderme foi bastante similar ao observado nas plantas controle (Fig. 6D).

Nas folhas de *P. stratiotes* a organização do protoplasto das células do mesofilo também foi afetada pela exposição ao As, sendo que as alterações mais conspícuas foram observadas no sistema de membranas, com especial efeito sobre o vacúolo, cloroplastos e mitocôndria (Fig. 7A-B, D e E). Tais danos ao sistema de membranas resultaram em colapso do protoplasto (Fig. 7A-B), com nítido contraste entre as células das plantas controle (Fig. 7A e C) e aquelas submetidas ao As+SNP (Fig. 7G e H). As alterações observadas nas células do mesofilo submetidas ao As foram evidentes, embora células com diferentes graus de perturbação tenham sido observadas, inclusive células aparentemente saudáveis. Os cloroplastos apresentaram alterações no sistema de membranas, tendo sido recorrente a vesiculação da membrana externa (Fig. 7 D), bem como dilatações nas membranas dos tilacóides. Foi possível observar, ainda, indícios de rompimento da

membrana mitocondrial (Fig. 7E), embora mitocôndrias e cloroplastos tenham apresentado integridade até mesmo em células com danos severos.

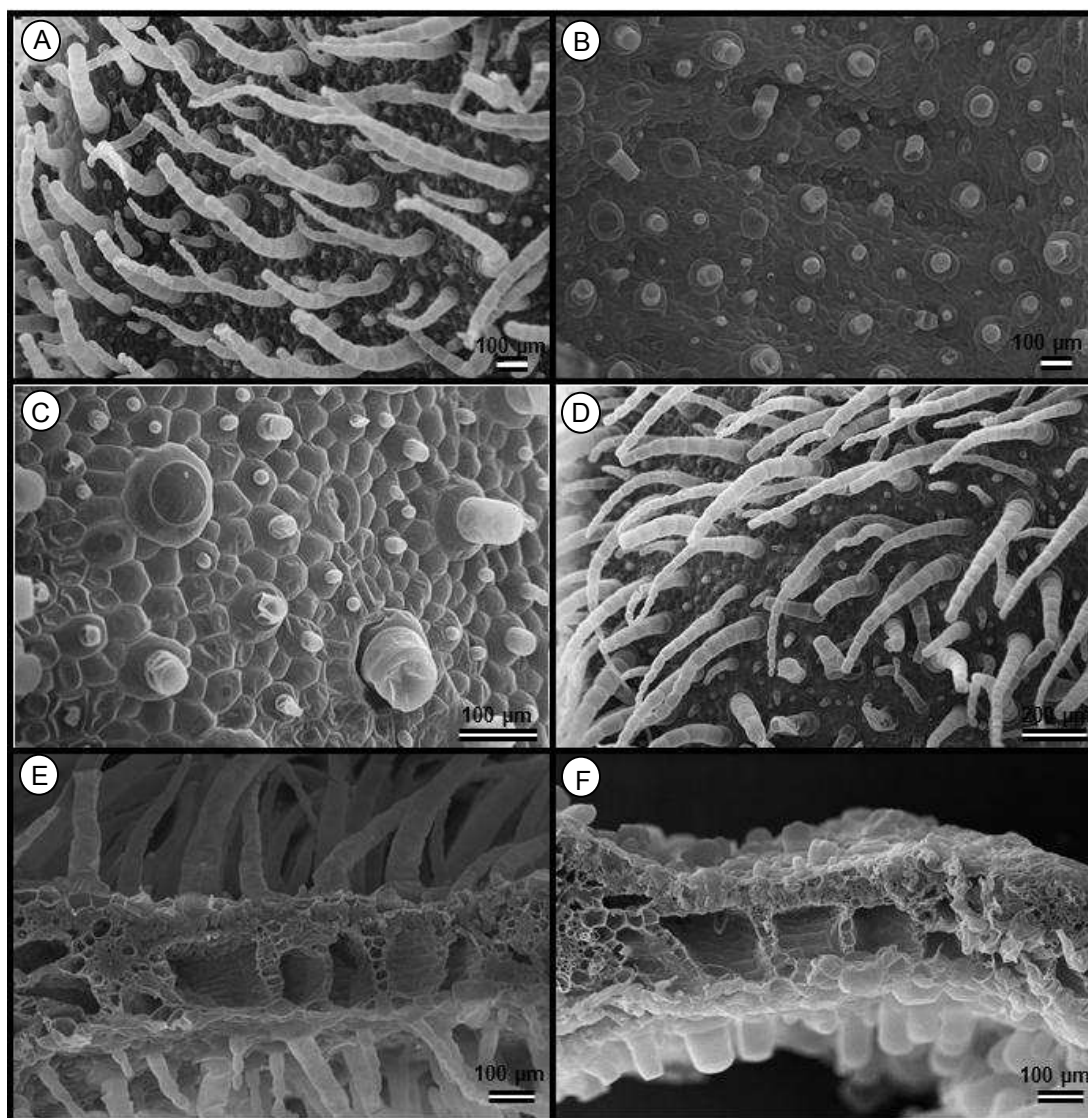


Figura 6. Micromorfologia de folhas de *Pistia stratiotes* submetidas a diferentes tratamentos. Controle (A e E), Arsênio (B, C e F) e Arsênio+SNP (D). Observar colapso e redução no número de tricomas (B e C).

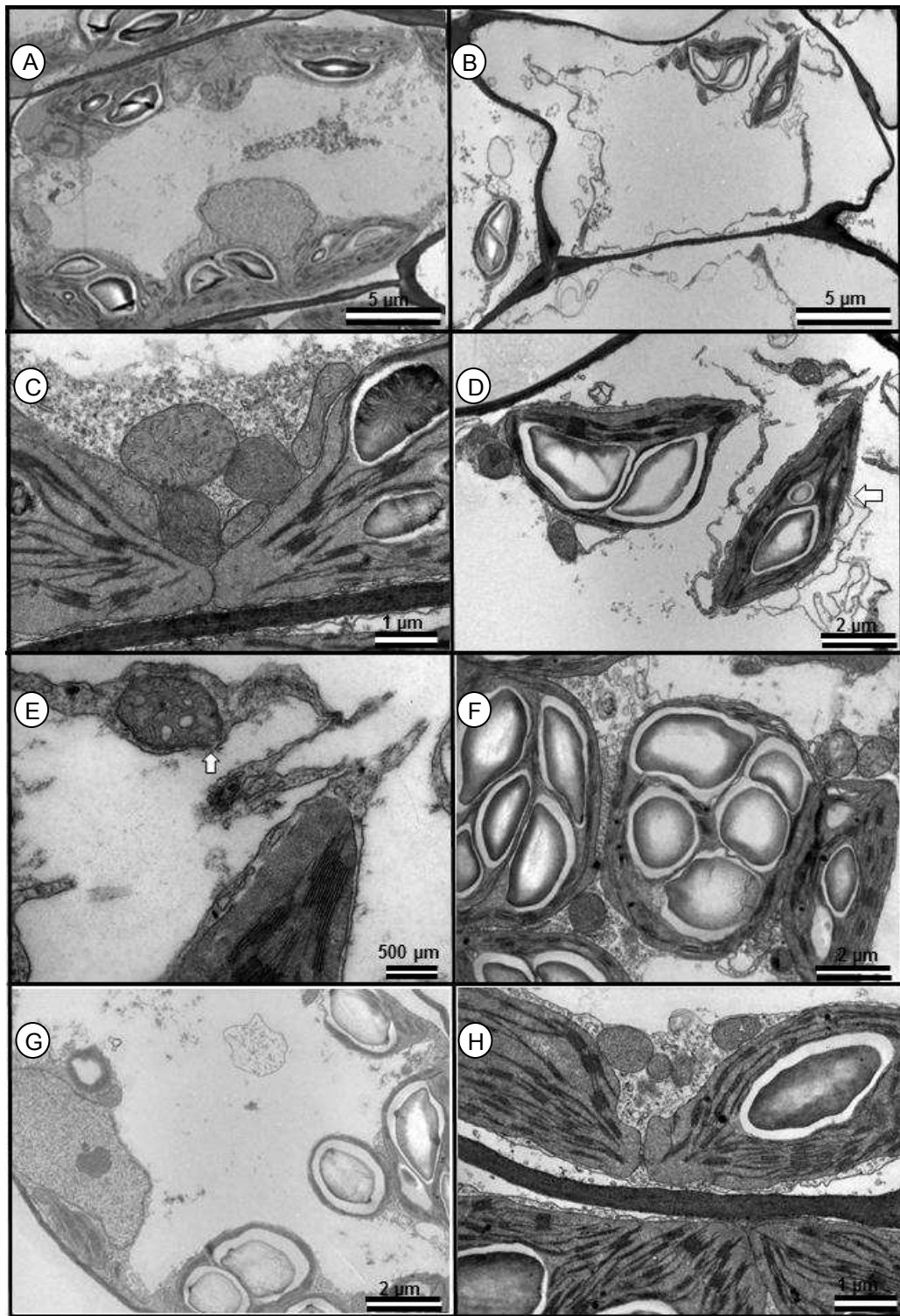


Figura 7. Organização ultraestrutural de células do mesofilo de *Pistia stratiotes* submetidas a diferentes tratamentos. Controle, (A e C), Arsênio (B, D-F) e Arsênio+SNP (G e H). Observar desestruturação do citosol (B), alteração da membrana do cloroplasto (D - seta) e rompimento da membrana mitocondrial (E - seta).

Discussão

A absorção e o acúmulo de As nas folhas de *Pistia stratiotes* interferiram na fisiologia, ultraestrutura e micromorfologia das plantas. Esses efeitos danosos do metaloide são consequência, principalmente, do aumento na geração de ROS, como o peróxido de hidrogênio, o qual pode atravessar membranas, ser convertido em formas mais reativas e danificar as principais macromoléculas celulares (Mishra *et al.*, 2014). A adição de SNP, por sua vez, diminuiu a produção de ROS e, conseqüentemente, os danos desencadeados pelo metaloide também foram reduzidos, assim como já foi observado para diversas outras plantas expostas ao As (Fan *et al.*, 2014; Saeid *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2013). Embora a redução de ROS em função da adição de NO seja normalmente associada apenas ao incremento dos sistemas de defesa antioxidante (Saeid *et al.*, 2014; Namdjoyan e Kermanian, 2013; Jin *et al.*, 2010), no caso de *P. stratiotes* essa redução envolveu também importantes alterações em processos fisiológicos do metabolismo primário das plantas.

O processo fotossintético nas folhas de *P. stratiotes* foi afetado em diferentes níveis pelo As. O metaloide diminuiu a concentração de clorofila a e b, principais pigmentos fotossintéticos, provavelmente devido a fatores como peroxidação das membranas do cloroplasto, aumento da atividade da clorofilase e redução da síntese de clorofila (Tewari *et al.*, 2008). A diminuição na concentração dos pigmentos fotossintéticos é uma resposta comumente observada em plantas submetidas ao As (Srivastava *et al.*, 2013), e pode ter sido um dos principais responsáveis pela diminuição do fluxo de elétrons no FSII e pela queda na eficiência do fotossistema II (FSII) (Baker, 2008). De fato, o As aparentemente não danificou proteínas e componentes do FSII, já que F_v/F_m manteve-se constante, de forma que o decréscimo em Φ_{FSII} provavelmente deve-se à diminuição na captação e transferência de energia de excitação para o FSII. A diminuição em Φ_{FSII} decorrente de

decréscimos nos níveis de pigmentos fotossintéticos já foi observada para outras plantas submetidas ao As (Mishra *et al.*, 2014).

Os efeitos danosos do As sobre a etapa fotoquímica da fotossíntese não foram observados nas plantas expostas ao tratamento As+SNP. A adição de SNP foi capaz de manter os níveis de clorofila e, por conseguinte, os parâmetros de fluorescência foram restaurados aos níveis normais. Outro fator que possivelmente contribuiu para a manutenção do Φ_{FSII} no tratamento As+SNP foi o aumento no NPQ, um indicador da dissipação termal na antena do FSII (Baker, 2008). O incremento do NPQ é comumente observado em plantas expostas a agentes estressores e representa um importante mecanismo de adaptação, pois evita que ocorram aumentos na produção de ROS durante a fotossíntese (Carboner *et al.*, 2012).

O decréscimo desencadeado pelo As em Φ_{CO_2} , bem como na taxa de assimilação líquida de carbono, podem ser reflexos da menor eficiência do FSII, uma vez que não foram observadas alterações em g_s e em C_i . A redução na fixação do CO_2 pode ter ocorrido, também, pela diminuição na expressão gênica da Rubisco e outras enzimas do ciclo de Calvin em resposta ao As (Finnegan e Chen, 2012), ou devido aos severos danos desencadeados na estrutura dos cloroplastos (Xing *et al.*, 2013).

Por serem um dos principais sítios de produção de ROS nas células, os cloroplastos são comumente as organelas mais sensíveis aos danos causados pelo As (Xing *et al.*, 2013). Em *P. stratiotes* foram observados severos danos estruturais às membranas internas dos cloroplastos, conforme foi observado também em folhas de *Leucaena leucocephala* (Schneider *et al.*, 2013) e *Pteris vittata* (Li *et al.*, 2006) expostas ao As. Alterações nas membranas cloroplastídicas tem forte impacto sobre a fotossíntese e envolvem desde queda na concentração de pigmentos até decréscimos nas taxas de fixação de carbono (Tewari *et*

al., 2008; Schneider *et al.*, 2013). Assim como observado para a fluorescência da clorofila a, o SNP foi capaz de restaurar as taxas de assimilação de carbono a níveis normais, reestabelecendo todo o processo fotossintético. É possível que isto esteja relacionado, principalmente, com a manutenção da estrutura dos cloroplastos e com a ativação de drenos alternativos para o excesso de energia proveniente da fotossíntese, como a respiração.

O comprometimento da fotossíntese nas plantas expostas ao As foi corroborado pela baixa concentração de sacarose nos cloroplastos. A sacarose é um dos principais produtos finais da fotossíntese e a principal forma de translocação de carbono (Zhou *et al.*, 2002). A adição de SNP, por sua vez, diminuiu ainda mais a concentração deste açúcar. Uma vez que as taxas fotossintéticas foram restauradas nas plantas expostas ao As+SNP, é provável que o acentuado decréscimo na concentração de sacarose seja devido à sua utilização mais intensa, a fim de gerar metabólitos e energia para manter os mecanismos de defesa celulares (Bolton, 2009). Tal hipótese apoia-se nas altas taxas respiratórias observadas nas folhas de *P. stratiotes* no tratamento As+SNP.

Embora a exposição ao As também tenha promovido acréscimos na respiração das plantas, essa alteração não foi acompanhada por ganhos líquidos na fotossíntese ou na manutenção das organelas celulares, ou seja, não contribuiu para que a homeostase celular fosse restaurada. O aumento da respiração nas plantas expostas ao As provavelmente é consequência da similaridade química entre o arsenato e o fosfato, os quais competem pelo mesmo sítio ativo da ATP-sintase mitocondrial (Moore *et al.*, 1983). Essa competição resulta na síntese de um produto altamente instável, ADP-As, e diminui a concentração de ATP. A queda na concentração de ATP é um dos sinais celulares que desencadeia incrementos na atividade respiratória, o que resulta na geração de mais ADP-As. Esses ciclos fúteis de geração de ADP-As comprometem o status energético da célula e

aumentam a produção de ROS, danificando as mitocôndrias e colapsando todo o metabolismo energético celular (Finnegan and Chen, 2012).

Além do As, o NO também é capaz de aumentar a taxa respiratória nas células vegetais. A alteração mediada pelo NO, no entanto, baseia-se no incremento tanto da via da citocromo c oxidase quanto da via da oxidase alternativa (Gandin *et al.*, 2009). O aumento desencadeado pelo SNP foi maior do que aquele apresentado pelas plantas expostas apenas ao As e restaurou o status energético celular. Desta forma é provável que, diferentemente do observado nas plantas expostas ao As, o aumento da respiração no tratamento As+SNP tenha um efeito benéfico sobre as folhas de *P. stratiotes* e tenha contribuído para a manutenção da estrutura das organelas e também do processo fotossintético.

É crescente o número de pesquisas que demonstram a importância do metabolismo mitocondrial na manutenção de outros processos fisiológicos, principalmente em condições de estresse (Dutilleul *et al.*, 2003; Nunes-Nesi *et al.*, 2011). A respiração e a fotossíntese, por exemplo, são processos interligados, e o metabolismo respiratório atua no fornecimento de ATP para síntese de sacarose, na produção de ácido ascórbico e no consumo do excesso de poder redutor (NADPH) prevenindo, assim, a sobre-redução da cadeia de transporte de elétrons. O processo respiratório pode atuar como uma válvula que regula o balanço redox celular o que, em última instância, permite a otimização dos processos do metabolismo primário (Millar *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2007). Nesse contexto fica clara a importância da integração metabólica para a manutenção da homeostase celular, sobretudo em condições de estresse.

É provável que as alterações observadas na respiração das plantas submetidas ao As não se sustentariam em maiores períodos de exposição, visto que o metaloide desencadeou o rompimento da membrana mitocondrial, o que levaria à interrupção do processo

respiratório. O aumento na taxa respiratória desencadeado no tratamento As+SNP, por sua vez, pode realmente ser uma adaptação metabólica de longo prazo, já que não foram observados danos na estrutura mitocondrial. Os mecanismos pelos quais o NO media a regulação da respiração para proteger as células ainda não está completamente compreendido, mas evidências indicam o envolvimento de múltiplas vias. Alguns dos mecanismos pelos quais o NO pode ter restaurado o status energético celular incluem, dentre outros: (i) restauração do processo fotossintético e, conseqüentemente, da produção de ATP associada a ele (Jhanji *et al.*, 2012); (ii) aumento da síntese de compostos que sequestram o As no vacúolo, o que diminuiria a ocorrência de ciclos fúteis de geração ADP-As (Shan *et al.*, 2012); (iii) aumento simultâneo na atividade da citocromo c oxidase e da oxidase alternativa, o que permitiria a manutenção da síntese de ATP sem que ocorresse a formação excessiva de ROS (Wang *et al.*, 2010).

Ao contrário do que foi observado na respiração, o As aparentemente diminuiu o processo fotorrespiratório nas folhas de *P. stratiotes*, sendo esta alteração mais significativa quando o poluente foi suprido conjuntamente com SNP. De fato, As e SNP aumentaram a taxa de oxigenação da Rubisco, aumentaram razão ETRc/ETRo e diminuíram a razão glicina/serina, um dos principais marcadores bioquímicos para a taxa de fotorrespiração (Novitskaya *et al.*, 2002). Todos estes parâmetros indicam maior inibição da fotorrespiração no tratamento As+SNP, a qual pode ser consequência da inativação de enzimas da fotorrespiração em decorrência de alterações pós-transdacionais mediadas pelo NO. Todas as enzimas envolvidas na etapa da fotorrespiração que ocorre nos peroxissomos são alvos de S-nitrosilação pelo NO e já foi demonstrado que a atividade da enzima glicolato oxidase (GOX) é inibida pela S-nitrosilação desencadeada por doadores de NO. A GOX é uma enzima chave na fotorrespiração e atua oxidando o glicolato e transferindo

elétrons para o O₂, o que resulta na formação glicoxalato e H₂O₂. Dessa forma, acredita-se que o NO seja importante para regular os níveis de ROS por meio de modificações pós-transducionais de uma das principais enzimas produtoras de H₂O₂ (Ortega-Galisteo *et al.* 2012). Tal regulação é necessária porque, embora a fotorrespiração desempenhe importantes papéis fisiológicos (Peterhansel e Maurino, 2011), em condições de estresse esse processo pode ser responsável pela geração de até 70% de todo o H₂O₂ celular e é a principal fonte de ROS em plantas submetidas ao As (Gupta *et al.*, 2013; Noctor *et al.*, 2002).

Além das alterações nos processos fisiológicos, nos cloroplastos e mitocôndrias, deve-se considerar, ainda, que a presença do As desestruturou todo o protoplasto das células do mesófilo de *P. stratiotes*, possivelmente por danos ao sistema de membranas e consequente colapso de organelas. É possível que o excesso de ROS, além de danificar as membranas dos cloroplastos e mitocôndrias, possa ter ocasionado o rompimento de todo o sistema de membranas, sobretudo das membranas plasmática e vacuolar. No caso da membrana vacuolar, tem sido sugerido que ROS participem da cascata de sinalização celular que culmina com a ativação da enzima vacuolar do processamento, a qual modifica a estrutura e provoca colapso da membrana (Li *et al.*, 2013). Adicionalmente, é possível que o aumento na concentração de ROS também tenha um efeito direto sobre a desestruturação do citosol, através da oxidação de biomoléculas, como lipídeos de membrana (Jin *et al.*, 2010).

É possível que a exposição ao As tenha desencadeado a morte celular programada nas folhas de *P. stratiotes*, processo que envolve ROS. O aumento na concentração de ROS age como um sinal, o qual altera outros componentes celulares e, em última instância, modifica o padrão de expressão gênica, desencadeando a morte celular programada (Laloi

et al., 2006). A participação de ROS na morte celular programada já foi demonstrada em plantas submetidas a diferentes condições de estresses, incluindo metais pesados (Iakimova *et al.*, 2008) e, em *P. stratiotes*, foi evidenciada pela manutenção da integridade de algumas organelas, principalmente mitocôndrias, até a morte da célula, o que é uma característica deste processo (Schussler e Longstreth, 1996). Evidências de morte celular não foram observadas no tratamento As+SNP, onde a estrutura celular se manteve bem semelhante ao controle. Acredita-se que o NO seja capaz de prorrogar ou evitar a morte celular programada, o que provavelmente é resultado da influência desta molécula sobre a concentração de ROS (Beligni *et al.*, 2002).

Nas plantas submetidas ao As, a coexistência de células com diferentes níveis de danos estruturais, incluindo células com aspecto normal, mostrou-se compatível com os sintomas percebidos externamente nas folhas. A exposição ao As provoca manchas necróticas de contorno circular nas folhas, indicando que os processos de morte celular ocorrem em pontos específicos e parecem progredir de modo a causar a morte de toda a folha.

Os danos desencadeados pelo As em nível ultraestrutural e fisiológico se refletiram sobre a micromorfologia dos órgãos vegetais, causando o colapso e a redução do número de tricomas foliares. O efeito devastador do As sobre os tricomas foliares de *P. stratiotes* possivelmente está relacionado com o acúmulo do metaloide nessas estruturas. De fato, em muitas plantas o As é preferencialmente acumulado nas células epidérmicas ordinárias e nos tricomas. Essas células apresentam maior adaptação para o acúmulo do poluente do que as células do mesofilo, uma vez que apresentam grandes vacúolos e não contêm cloroplastos, o que minimiza os danos ao processo fotossintético (Leitenmaier e Kupper, 2013). O acúmulo preferencial de As, no entanto, poderia acelerar a queda dos tricomas e

inibir a diferenciação de novos apêndices epidérmicos, provavelmente através da interrupção de divisões celulares. Resultados similares foram observados em folhas de *Vigna radiata* expostas ao As (Gupta e Bhatnagar, 2015).

Os danos causados na ultraestrutura e na micromorfologia das folhas de *P. stratiotes* foram atenuados pela adição de NO, na forma de SNP. Três mecanismos principais têm sido propostos para explicar como o NO age na atenuação dos danos desencadeados pelo As: (i) por meio de mudanças nas paredes celulares das raízes, o que resultaria na regulação da absorção do metaloide; (ii) eliminação direta do excesso de ROS produzido; (iii) participação em vias de sinalização que induzem respostas ao estresse. No caso de *P. stratiotes* o NO aparentemente desencadeou cascatas de sinalização que alteraram os processos fisiológicos da planta, permitindo a manutenção das taxas de fixação de carbono, produção de ATP e minimizando a geração de ROS, o que conseqüentemente minimizou os danos causados nas organelas celulares, bem como na micromorfologia. Desta forma, o NO apresenta papel fundamental para a adaptação e integração dos processos fisiológicos de *P. stratiotes* em condições de estresse desencadeado pelo As, sendo crucial para a manutenção da homeostase celular e tolerância da planta ao poluente.

Referências Bibliográficas

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, **Plant Physiology** 24: 1-15.

Bai J, Xu DH, Kang HM, Chen K, Wang G (2008) Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. **Photosynthetica** 46 (2): 232-237.

Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology** 59: 89-113.

Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in Barley aleurone layers. **Plant Physiology** 129 (4): 1642-1650.

Bolton MD (2009) Primary metabolism and plant defense - fuel for the fire. **Molecular Plant Microbe Interaction** 22: 487-497.

Bundschuh J, Litter MI, Parvez F, Román-Ross G, Nicolli HB, Jean J, Liu C, López D, Armienta MA, Guilherme LRG, Cuervas AG, Cornejo L, Cumbal L, Toujaguez R (2012) One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. **Science of the Total Environment** 429: 2-35.

Carboner D, Gerotto C, Posocco B, Giacometti GM, Morosinotto T (2012) NPQ activation reduces chlorophyll triplet state formation in the moss *Physcomitrella patens*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1608-1615.

Castrillo G, Sánchez-Bermejo E, de Lorenzo L, Crevillén P, Fraile-Escanciano A, Tc M, Mouriz A, Catarecha P, Sobrino-Plata J, Olsson S, Leo Del Puerto Y, Mateos I, Rojo E, Hernández LE, Jarillo JA, Piñeiro M, Paz-Ares J, Leyva A (2013) WRKY6 transcription factor restricts arsenate uptake and transposon activation in Arabidopsis. **Plant Cell** 8: 2944-2957.

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

Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chétrit P, Foyer CH, Paepe R (2003) Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. **Plant Cell** 15: 1212–1226.

Epron D, Dreyer E (1993) Long-term effects of drought on photosynthesis of adult oak trees [*Quercuspetraea* (Matt.) Liebl. and *Quercusrobur* L.] in a natural stand. **New Phytologist** 125: 381-389.

Fan H, Du C, Xu Y, Wu X (2014) Exogenous nitric oxide improves chilling tolerance of *Chinese cabbage* seedlings by affecting antioxidant enzymes in leaves. **Horticulture, Environment, and Biotechnology** 55: 159-165.

Finnegan PM, Chen W (2012) Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. **Frontiers in Physiology** 3: 1-18.

Gandin A, Lapointe L, Dizengremel P (2009) The alternative respiratory pathway allows sink to cope with changes in carbon availability in the sink-limited plant *Erythronium americanum*. **Journal of Experimental Botany** 60: 4235–4248.

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

Gupta B, Huang B (2014) Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. **International Journal of Genomics** 2014: 1-18.

Gupta DK, Inouhe M, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Sandalio LM (2013) Oxidative stress and arsenic toxicity: Role of NADPH oxidases. **Chemosphere** 90:1987-1996.

Gupta KJ, Igamberdiev AU (2013) Recommendations of using at least two different methods for measuring NO. **Frontiers in Plant Science** 4: 1-4.

Gupta P, Bhatnagar AK (2015) Spatial distribution of arsenic in different leaf tissues and its effect on structure and development of stomata and trichomes in mung bean, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Environmental and Experimental Botany** 109: 12–22.

Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS, Cambraia J (2013) Mineral nutrition and enzymatic adaptation induced by arsenate and arsenite exposure in lettuce plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 71: 307-314.

Iakimova ET, Woltering EJ, Kapchina-Toteva VM, Harren FJM, Cristescu SM (2008) Cadmium toxicity in cultured tomato cells – role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling. **Cell Biology International** 32: 1521–1529.

Jhanji S, Setia RC, Kaur N, Kaur P, Setia N (2012) Role of nitric oxide in cadmium-induced stress on growth, photosynthetic components and yield of *Brassica napus* L. **Journal of Environmental Biology** 33: 1027-1032.

Jin J, Xu Y, Huang Y (2010) Protective effect of nitric oxide against arsenic-induced oxidative damage in tall fescue leaves. **African Journal of Biotechnology** 9: 1619-1627.

Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E, Dormann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D (2005). The Golm metabolome database. **Bioinformatics** 21: 1635-1638.

Kumar S, Dubey RS, Tripathi RD, Chakrabarty D, Trivedi (2015) Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: Current updates and prospective. **Environment International** 74: 221–230.

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

Laloi C, Przybyla D, Apel K (2006) A genetic approach towards elucidating the biological activity of different reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany** 57: 1719–1724.

Larcher W (1983) **Physiological Plant Ecology**. Springer-Verlag, Berlin.

Leão, G, Oliveira, JA, Felipe, RTA, Farnese, FS, Gusman, GS (2014) Anthocyanins, thiols and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. **Journal of Plant Interactions** 9:1: 143-151.

Leitnmaier B, Kupper H (2013) Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. **Frontiers in Plant Science** 4: 1-13.

Li W, Chen T, Huang Z, Lei M, Liao X (2006) Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Chemosphere** 62: 803-809.

Li Z, Yue H, Xing D (2013). MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in *Arabidopsis*. **New Phytologist** 195: 85-96.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols** 1: 387-396.

Liu H, Jiang Y, Luo Y, Jiang W (2006) A simple and rapid determination of ATP, ADP and AMP concentrations in pericarp tissue of litchi fruit by High Performance Liquid Chromatography. **Food Technology and Biotechnology** 44 (4): 531–534.

Marin AR, Pezeshki SR, Masschelen PH, Choi HS (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. **Journal of Plant Nutrition** 16: 1532-4807.

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. **Journal of Experimental Botany** 51: 659-668.

Millar AH, Whelan J, Soole KL, Dayl DA (2011) Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. **Annual Review of Plant Biology** 62: 79-104.

Mishra S, Stark H-J, Kupper H (2014) A different sequence of events than previously reported leads to arsenic-induced damage in *Ceratophyllum demersum* L. **Metallomics** 6: 444-454.

Moore SA, Moennich DM, Gresser MJ (1983) Synthesis and hydrolysis of ADP-arsenate by beef heart submitochondrial particles. **Journal of Biological Chemistry** 25: 6266-71.

Namdjoyan S, Kermanian H (2013) Exogenous nitric oxide (as sodium nitroprusside) ameliorates arsenic-induced oxidative stress in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) plants. **Scientia Horticulturae** 161: 350-356.

Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH (2002) Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? **Annals of Botany** 89: 841–850.

Novitskaya L, Trevanion SJ, Driscoll S, Foyer CH, Noctor G (2002) How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis. **Plant, Cell and Environment** 25: 821-835.

Nunes-Nesi A, Araújo WL, Fernie AR (2011) Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. **Plant Physiology** 155: 101-107.

Ortega-Galisteo AP, Rodríguez-Serrano M, Pazmiño DM, Gupta DK, Sandalio LM, Romero-Puertas MC (2012) S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress, **Journal of Experimental Botany** 63: 2089-2103.

Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran LP (2014) Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science** 13: 1-8.

Peterhansel C, Maurino VG (2011) Photorespiration Redesigned. **Plant Physiology** 155: 49-55.

Pradet A, Raymond P (1983) Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. **Annual Review Plant Physiology** 34: 199–224.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 17: 208-212.

Rofkar JR, Dwyer DF, Bobak DM (2014) Uptake and toxicity of arsenic, copper, and silicon in *Azolla caroliniana* and *Lemna minor*. **International Journal of Phytoremediation** 16: 155-166.

Saeid ZD, Zahra A, Abdolhamid NS (2014) Investigation of synergistic action between coronatine and nitric oxide in alleviating arsenic-induced toxicity in sweet basil seedlings. **Plant Growth Regulation** 74: 119-130.

Saxena I, Shekhawat GS (2013) Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitration. **Nitric Oxide** 32: 13-20.

Schneider J, Labory CRG, Rangel WM, Alves E, Guilherme LRG (2013) Anatomy and ultrastructure alterations of *Leucaena leucocephala* (Lam.) inoculated with mycorrhizal fungi in response to arsenic-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials** 262: 1245-1258.

Schussler EE, Longstreth DJ (1996) Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). **American Journal of Botany** 83 (10): 1266-1273.

Shan C, He F, Xu G, Han R, Liang Z (2012) Nitric oxide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. **Biologia Plantarum** 56: 187-191.

Sing VP, Srivastava PK, Prasad SM (2013). Nitric oxide alleviates arsenic-induced toxic effects in ridged *Luffa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry** 71: 155-163.

Srivastava S, Srivastava AK, Singh B, Suprasanna P, D'souza SF (2013) The effect of arsenic on pigment composition and photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. **Biologia Plantarum** 57: 385-389.

Talukdar D (2013) Arsenic-induced oxidative stress in the common bean legume, *Phaseolus vulgaris* L. seedlings and its amelioration by exogenous nitric. **Physiology and Molecular Biology of Plants** 19: 69-79.

Tewari A, Singh R, Singh NK, Rai UN (2008) Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals. **Bioresource Technology** 18: 8715-8721.

Valentini R, Epron D, De Angelis P, Matteucci G, Dreyer E (1995) In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. **Plant, Cell and Environment** 18: 631 -640.

van Kooten, O, Snel JFH (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research** 25: 147-150.

Vanlerberghe GC (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. **International Journal of Molecular Sciences** 14: 6805-6847

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

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

Xing F, Li Z, Sun A, Xing D (2013) Reactive oxygen species promote chloroplast dysfunction and salicylic acid accumulation in fumonisin B1-induced cell death. **FEBS Letters** 587: 2164–2172.

Yoshida K, Terashima I, Noguchi K (2007) Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light. **Plant Cell Physiology** 48: 606–14.

Zhou R, Silcher RC, Quebedeaux B (2002) Apple leaf sucrose phosphate synthase is inhibited by sorbitol-6-phosphate. **Functional Plant Biology** 29: 569-574.

Artigo II

Óxido nítrico e a reprogramação do metabolismo vegetal após exposição ao arsênio

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um importante sinalizador celular em condições de estresses bióticos ou abióticos. No presente estudo investigou-se o papel deste sinalizador na resposta de *Pistia stratiotes* ao arsênio (As). As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 6,5, ¼ da força iônica, foram expostas a quatro tratamentos, por 24 horas: controle (apenas solução nutritiva); nitroprussiato sódico (SNP – doador de NO) (0,1 mg L⁻¹); As (1,5 mg L⁻¹); As+SNP (1,5 e 0,1 mg L⁻¹, respectivamente). Para análise de crescimento as plantas permaneceram por três dias nas condições supracitadas. O acúmulo de As por *P. stratiotes* aumentou a concentração de espécies reativas de oxigênio, o que teve efeitos danosos sobre a integridade das membranas celulares e sobre o crescimento das plantas. O SNP, no entanto, foi capaz de atenuar esses danos e restaurar o crescimento de *P. stratiotes*. A adição de SNP aumentou a concentração de nitrito, indicando aumentos na absorção de NO, e incrementou a concentração de nitrosotióis, os quais provavelmente estão envolvidos nas vias de sinalização desencadeadas pelo NO. O SNP aumentou a atividade de enzimas antioxidantes, como dismutase do superóxido, peroxidase, catalase, peroxidase da glutationa e redutase da glutationa, e alterou a concentração de antioxidantes não enzimáticos, como glutationa, ascorbato e prolina. A glutationa foi particularmente importante na tolerância de *P. stratiotes* ao As, e parece ter agido tanto como substrato para atividade enzimática quanto para a síntese de fitoquelatinas. O SNP desencadeou ainda alterações nos metabólitos relacionados com a glicólise e com o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, além de afetar a concentração de vários aminoácidos, a maior parte dos quais estão relacionados com o combate ao estresse oxidativo. A adição de SNP permitiu, portanto, o ajuste da maquinaria metabólica de *P. stratiotes* em resposta ao As, o que envolveu a reprogramação do metabolismo antioxidante e alterações no metabolismo primário e secundário, culminando com o aumento da tolerância das plantas ao metaloide.

Palavras-chave: metaboloma, estresse oxidativo, antioxidantes, nitrosotióis, respiração.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is an important cellular signaling molecule involved in the response of plants to biotic and abiotic stress. This study investigated the role of NO in *Pistia stratiotes* responses to arsenic (As). The plants were cultivated in nutrient solution, pH 6.5, with $\frac{1}{4}$ of the full ionic strength and exposed to four treatments, for 24 hours: control (nutrient solution) sodium nitroprusside (SNP) (0.1 mg L⁻¹); As (1.5 mg L⁻¹); As + SNP (1.5 and 0.1 mg L⁻¹, respectively). For growth analysis, plants remained for three days in the conditions described above. The accumulation of As by *P. stratiotes* increased the concentration of reactive oxygen species, which had harmful effects on the integrity of cell membranes and on plant growth. The SNP, however, was able to mitigate the damage and restore the growth of *P. stratiotes*. The addition of SNP increased the nitrite concentration, indicating increases in the NO absorption, and increased the concentration of nitrosothiols, which are likely involved in signaling pathways triggered by NO. The SNP increased the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, peroxidase, catalase, glutathione peroxidase and of glutathione reductase, and altered the concentration of non-enzymatic antioxidants such as glutathione, ascorbate and proline. Glutathione was particularly important in the tolerance of *P. stratiotes* to As, and appears to have acted both as a substrate for enzyme activity as for the phytochelatin synthesis. The SNP also triggered changes in metabolites related with the glycolysis and the tricarboxylic acid cycle and affected the concentration of various amino acids, most of which are related to the avoidance of the oxidative stress. Therefore, the addition of SNP allowed the adjustment of the metabolic machinery of *P. stratiotes* in response to arsenic by a reprogramming in the antioxidant metabolism and changes in primary and secondary metabolism, culminating in increased tolerance of the plants metalloids.

Keywords: metabolome, oxidative stress, antioxidants, nitrosothiols, plant respiration.

1. Introdução

No ambiente natural as plantas estão constantemente expostas a condições adversas, como estresses bióticos e abióticos, sendo que a tolerância a esses fatores é determinante para manutenção do crescimento e sobrevivência. A tolerância das plantas a estresses depende da capacidade do organismo em detectar o agente estressor e desencadear mecanismos sinalizadores que resultem em uma resposta rápida e específica, capaz de manter a homeostase celular (Xiong *et al.*, 2002). Diversos sinalizadores estão envolvidos nessas vias de transdução do sinal, incluindo o óxido nítrico (NO) (Sehrawat e Deswal, 2014). O NO é uma molécula gasosa, altamente reativa e que pode se difundir livremente através das membranas, características essenciais em sinalizadores celulares (Saxena e Shekhawa, 2013). Além de participar de diversos processos naturais do ciclo de vida da planta, como germinação e florescimento, o NO também é importante na resposta a estresses abióticos, como por exemplo, na resposta das plantas ao arsênio (As) (Singh *et al.*, 2013).

O As é um metaloide comumente encontrado em altas concentrações em águas e solos contaminados e, apesar de tóxico para a maioria dos organismos, é facilmente absorvido pelas plantas. A maior parte do As absorvido fica, normalmente, retido nas raízes, e parte é translocado e acumulado nas folhas (Kumar *et al.*, 2015). Respostas típicas de plantas ao As incluem inibição da fotossíntese e do crescimento, geralmente como consequência do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Rahman *et al.*, 2007). As ROS são moléculas reativas, que podem oxidar diversas macromoléculas celulares, alterando o equilíbrio redox celular e desencadeando uma condição conhecida como estresse oxidativo (Demidchik, 2015). Algumas plantas, denominadas hipertolerantes, apresentam robustos mecanismos de

defesa celulares, os quais são hábeis para atenuar os efeitos tóxicos do As e evitar a ocorrência de danos podendo, inclusive, ser utilizadas na fitorremediação de ambientes contaminados (Sridhar *et al.*, 2011). A maioria das espécies vegetais, no entanto, não consegue tolerar altas concentrações de As, de forma que a exposição ao metaloide geralmente resulta em alterações que comprometem a sobrevivência da planta (Gusman *et al.*, 2013; Leão *et al.*, 2014a; Rofkar *et al.*, 2014).

Resultados de diversas pesquisas têm evidenciado que o NO participa ativamente no aumento da tolerância das plantas ao As por meio da manutenção da concentração de ROS em níveis normais (Saxena e Shekhawa, 2013). O NO pode atuar em duas vias principais para eliminar o excesso de ROS: (i) pode agir diretamente como um antioxidante, reagindo com o ânion superóxido; (ii) pode agir como molécula sinalizadora, ativando mecanismos antioxidantes enzimáticos (dismutase do superóxido, catalase, peroxidase, dentre outros) ou não enzimáticos (como, por exemplo, glutathione e prolina) (Grob *et al.*, 2013).

A ação do NO como sinalizador celular é decorrente, principalmente, da modificação pós-traducional de proteínas, mais especificamente da S-nitrosilação proteica. A S-nitrosilação pode alterar a atividade, a estabilidade ou a localização subcelular de proteínas-alvo (Sehrawat e Deswal, 2014). Ainda não está claro, no entanto, qual o impacto dessas alterações no metabolismo celular, principalmente em situações de estresse. De fato, embora o desenvolvimento de abordagens como a proteômica e a metabolômica tenham aberto a possibilidade de estudos mais aprofundados sobre o funcionamento da célula, pouco se sabe sobre como as plantas respondem à presença de poluentes ao nível de metaboloma e como o NO pode alterar o perfil de resposta das plantas (Foroughi *et al.*, 2014). Consequentemente, o conhecimento gerado é fragmentado e dificulta a compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase celular pelo NO de forma geral

e, mais particularmente, em resposta ao As. Assim sendo, o presente estudo buscou fornecer uma visão mais abrangente do metabolismo primário e antioxidante de *Pistia stratiotes*, macrófita capaz de acumular grandes quantidades de As, a fim de permitir maior compreensão da dinâmica celular em resposta ao As e ao NO.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção das plantas

Espécimes de *Pistia stratiotes* L. (Araceae) foram coletados no horto florestal da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil) e esterilizados com hipoclorito de sódio 1% durante 1 min, sendo então lavados em água corrente e água destilada. Os espécimes coletados foram transferidos para solução nutritiva de Clark (1975), ¼ da força iônica, pH 6,5, sendo mantidas em sala de crescimento de plantas, com luz e temperatura controladas (25 ± 2 °C; $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e fotoperíodo de 16 horas. As plantas permaneceram nestas condições por três dias para aclimação.

Após o período de aclimação, as plantas foram transferidas para recipientes contendo 0,5 L de solução nutritiva de Clark (1975), ¼ da força iônica, pH 6,5, e expostas a quatro tratamentos: controle (apenas solução nutritiva); SNP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$); As ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) e As + SNP ($1,5$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). O SNP (nitroprussiato de sódio) é uma substância comumente utilizada em estudos bioquímicos como doadora de NO. As plantas permaneceram nestas condições por 24 horas. Para cálculo da taxa de crescimento e do índice de tolerância as plantas foram submetidas aos tratamentos por 3 dias.

2.1 Determinação do arsênio absorvido

A fim de determinar a concentração de As acumulado por *P. stratiotes*, folhas das plantas submetidas aos tratamentos foram coletadas, lavadas em água destilada e mantidas em estufa convencional a 80°C até que o peso seco constante fosse obtido. O material seco foi macerado e digerido em uma mistura de ácido nítrico e perclórico (Marin *et al.* 1993), sendo a concentração de As determinada através de espectrômetro de emissão em plasma indutivamente acoplado (Optima 3300 DV, Perkin-Elmer, Norwalk, CT).

2.2 Concentração de espécies reativas de oxigênio

Para determinação da concentração de ânion superóxido (O_2^-), amostras de 50 mg de folhas foram incubadas em meio de extração constituído de sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100 μ M, NADH 20 μ M e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). A reação foi iniciada pela introdução de 100 μ L de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 min. A leitura da absorvância foi feita a 480 nm, durante 5 minutos (Boveris *et al.*, 2002; Misra e Fridovich, 1971). A produção de O_2^- foi avaliada pela determinação do adenocromo acumulado, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Boveris *et al.*, 2002).

Para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), amostras de 200 mg de tecido foliar foram homogeneizadas em meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, e centrifugadas a 10.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 50 μ L do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo $FeNH_4SO_4$ 100 μ M, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μ M e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram

mantidas no escuro por 30 minutos e a absorvância determinada a 560 nm. As concentrações de H₂O₂ foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H₂O₂.

2.3 Avaliação da peroxidação lipídica

A concentração de malondialdeído (MDA) foi medida e utilizada como um parâmetro para avaliar a peroxidação lipídica. Para isso, 150 mg de folhas foram maceradas em 2 mL de ácido tricloroacético 1% (TCA) (p/v) e centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi adicionado a 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v) e a mistura foi incubada a 95°C. Duas horas após a reação, a absorvância foi medida a 532 nm (a absorvância inespecífica foi determinada a 600 e 400 nm e subtraída das amostras). A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Hodges et al., 1999).

2.4 Quantificação de nitrito e nitrosotióis

A quantificação de nitrito e nitrosotióis (NOS) nas folhas de *P. stratiotes* foi realizada utilizando-se o Analizador de Óxido Nítrico Sievers (NOA 280i, GE Water & Process Technologies, Ratingen, Germany). As amostras (aproximadamente 60 µg de material foliar liofilizado) foram maceradas em moinho de bolas, homogeneizadas em 600 µL de tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,7, contendo N-etilmaleimida (NEM) 10 mM, EDTA 2,5 mM, e centrifugadas duas vezes a 14.000 x g, a 4°C. Alíquotas de 100 µL e 200 µL foram retiradas do sobrenadante e injetadas no vaso de reação do NOA 280i para quantificar nitrito e NOS, respectivamente. Antes da medida da concentração de NOS, os extratos vegetais foram pré-tratados com sulfanilamida 5% (p/v) em HCL, para remover

quimicamente o nitrito. A integração da área do pico e a quantificação de nitrito e NOS foram realizadas com o software Sievers NO Analysis (v. 3.2), usando padrões de nitrito (Vanzo *et al.*, 2014).

2.5 Taxa de crescimento e índice de tolerância ao arsênio

A taxa de crescimento relativo (TCR) foi calculada usando a equação proposta por Hunt (1978), usando o peso seco de folhas e raízes:

$$Rw = (\ln w_1 - \ln w_0) \times 1000 / (t_1 - t_0);$$

onde Rw representa a taxa de crescimento relativo; $\ln w_1$ e $\ln w_0$ representam o logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente; e $t_1 - t_0$ representa a duração do experimento, em dias.

A tolerância ao As foi estimada pelo cálculo do índice de tolerância (IT) (%), segundo proposto por Wilkins (1978):

$$TI (\%) = (Rw^*/Rw) \times 100;$$

Onde Rw^* é a taxa de crescimento da planta na solução com As (ou As+SNP) e Rw é a taxa de crescimento da planta na solução controle.

2.6 Determinação dos mecanismos de defesa antioxidantes

2.6.1 Antioxidantes não-enzimáticos

2.6.1.1 Concentração de compostos tiolados

Amostras de 0,5 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, adicionando-se 6 mL de meio de extração constituído de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 1 mM e ácido ascórbico 1%. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min, a 4 °C. Para

determinação de tióis totais, alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de extração proposto por Sedlak e Lindsay (1968). Após 15 min de reação a absorvância foi determinada a 412 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar $13.100 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Tióis não-proteicos foram determinados através da adição de 5,0 mL do sobrenadante a TCA 50%. Após 1 h de repouso em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg durante 15 min. O sobrenadante foi então adicionado a meio de extração contendo reagente de Ellman 0,01 M. Após 5 min, a absorvância foi lida a 412 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $13.100 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. O teor de tióis proteicos foi calculado pela diferença entre o teor de tióis solúveis totais e o teor de tióis não proteicos.

2.6.1.2 Concentração de glutathiona total e fitoquelatinas

Para determinação do teor de glutathiona total, amostras de 0,3 g de massa fresca de folhas foram homogeneizadas em meio de extração e centrifugado a 12.000 x g por 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo o sobrenadante utilizado como extrato bruto. Alíquotas de 200 μL do extrato bruto foram então adicionadas a meio de reação e incubados a 30°C . Após 5 min de incubação, adicionou-se 10 μL de redutase da glutathiona e determinou-se a absorvância a 412 nm durante 1 minuto (Anderson, 1985). A concentração de glutathiona foi determinada por meio de curva de calibração e os resultados foram expressos em nmol g^{-1} massa fresca.

A concentração de fitoquelatinas totais foi estimada utilizando-se as concentrações de glutathiona total e tióis não proteicos, segundo proposto por Hartley-Whitaker *et al.* (2001).

2.6.1.3 Concentração de ascorbato total

A determinação da concentração de ascorbato total foi realizada através da maceração de 0,3 g de folhas de *P. stratiotes*, homogeneizadas em 2,0 mL de TCA 6% (p/v) e centrifugadas a 15.000 x g, a 4°C, durante 5 min. Retirou-se 200 µL do sobrenadante e adicionou-se a 200 µL de DTT 10 mM (dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4), 400 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4, 200 µL de N-etilmaleimida 0,5% (p/v), 1,0 mL de TCA 10 % (p/v), 800 µ de H₃PO₄ 42% (v/v), 800 µL de 2-2'-dipiridil 4% (p/v) e 400 µL de FeCl₃ 3% (p/v). Após agitação vigorosa, a mistura foi incubada a 42°C, por 40 min. Em seguida, a reação foi paralisada em banho de gelo e a absorvância foi determinada a 525 nm (Kampfenkel *et al.*, 1995). Os teores de ascorbato total foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos de ascorbato.

2.6.2 Antioxidantes enzimáticos

Para determinar a atividade enzimática, amostras foliares de aproximadamente 0,3 g foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas nos seguintes meios de reação:

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% para dismutases do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e catalases (CAT, EC 1.11.1.6) (Peixoto *et al.*, 1999);

- Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM e MgCl₂ 10 mM para peroxidases da glutaciona (GPX, EC 1.11.1.9) (Nagalakshmi e Prasad, 2001);

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% para a enzima redutase da glutatona (GR, EC 1.6.4.2) (Carlberg and Mannervik, 1985);

- Tampão Tris-HCL 0,2 M, pH 7,8, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM e PVPP 5% para a sulfotransferase da glutatona (GST, EC 2.5.1.18) (Habig *et al.*, 1985);

- Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 e EDTA 5 mM para enzima sintetase da γ -glutamilcisteína (γ GCS, EC 6.3.2.2) (Ruegsegger and Brunold, 1992);

Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 min, a 4°C, para as enzimas SOD, POX, APX, CAT, GR e GST, e a 20.000 x g por 20 min a 4°C para as enzimas GPX e γ GCS. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto e as atividades enzimáticas foram determinadas pela adição do extrato aos seguintes meios de reação:

- Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μ m, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μ m, para SOD (Giannopolitis e Ries, 1977);

- Tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 2 mM, para POX (Peixoto *et al.*, 1999);

- Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM, para APX (Peixoto *et al.*, 1999);

- Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,114 M, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM e uma unidade de redutase da glutatona, para GPX (Nagalakshmi e Prasad, 2001);

- Tampão fosfato de potássio 50 mM e H₂O₂ 12,5 mM, para CAT (Peixoto *et al.*, 1999);

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, GSSG 1 mM e NADPH 0,1 mM, para GR (Carlberg and Mannervik, 1985);

- Tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, glutathiona reduzida 20 mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), para GST (Nagalakshmi and Prasad, 2001);

- Tampão Tris-HCL 100 μ M, pH 8,2, glutamato de sódio 10 μ M, L-aminobutirato 10 μ M, Na₂EDTA 2 μ M, 0,2 mg BSA, 20 μ M MgCl₂ e sal dissódico de ATP 5 μ M (Rueggsegger and Brunold, 1992), para γ GCS.

Para determinação da atividade da SOD, as amostras foram iluminadas por 5 min e a absorvância foi, então, medida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a fotorredução do NBT (Giannopolitis e Ries, 1977). As atividades das enzimas POX, APX, GPX, CAT, GR e GST foram estimadas pela leitura da absorvância durante o primeiro minuto de reação. Os seguintes coeficientes de extinção molar foram utilizados: POX (420 nm, ϵ : 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹), APX (290 nm, ϵ : 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹), GPX (340nm, ϵ :6,22 mM⁻¹ cm⁻¹), CAT (240 nm, ϵ : 36 M⁻¹ cm⁻¹) (Peixoto *et al.*, 1999), GR (340 nm, ϵ : 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹) (Carlberg and Mannervik, 1985) e GST (340 nm, ϵ : 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹) (Nagalakshmi and Prasad, 2001). Para γ GCS, teor de fosfato inorgânico no sobrenadante foi determinado pelo método do fosfo-molibdato (Lindeman, 1958).

2.7 Perfil metabólico

Para obter uma visão geral do metabolismo de *P. stratiotes*, aproximadamente 20 μ g de material foliar foi liofilizado a -48°C e macerado em moinho de bolas. Metabólitos do metabolismo primário e alguns do secundário foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) com base em perfis metabólicos,

exatamente como descrito por Lisec *et al.* (2006). O sistema CG-EM utilizado era composto por amostrador automático CTC CombiPAL, cromatógrafo a gás (Agilente 6890N) e espectrômetro de massa (LECo Pegasus III TOF-MS, operado no modo de ionização positiva). O cromatograma e o espectro de massa foram avaliados usando o programa TAGFINDER (Luedemann *et al.*, 2008). Os metabólitos foram identificados em comparação com banco de dados criados a partir de padrões autênticos (Kopka *et al.*, 2005; Schauer *et al.*, 2005). A identificação e a anotação dos picos detectados seguiram as recomendações descritas em Fernie *et al.* (2011).

2.8 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo os dados submetidos à ANOVA e as médias calculadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls), a 5% de probabilidade.

Com o objetivo de reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados e identificar as variáveis que explicam a maior proporção da variância total, de modo a descreverem-se as estratégias pelas quais o NO contribuiria para a tolerância ao As, foi empregada a técnica de análise multivariada em componentes principais. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAEG, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

3. Resultados

3.1 Absorção de arsênio, geração de ROS e danos às membranas

A exposição de *Pistia stratiotes* ao As resultou na absorção e acúmulo do metaloide pela planta, alcançando concentrações médias de 0,35 mg g⁻¹ MS nas folhas, sem, no

entanto, ocorrer diferenças entre os tratamentos As e As+SNP (Fig. 1A). A concentração de O_2^- e H_2O_2 , por sua vez, foi diferente entre esses dois tratamentos, com significativos acréscimos nas plantas expostas apenas ao As (Fig. 1B e C), evidenciando a habilidade do SNP em manter as concentrações de ROS em níveis semelhantes aqueles encontrados no controle.

O acúmulo de As e o aumento na geração de ROS tiveram efeito danoso sobre as membranas celulares de *P. stratiotes*, tendo ocorrido aumento considerável na concentração de MDA nas plantas submetidas ao poluente (Fig. 1D). A adição de NO, na forma de SNP, foi capaz de atenuar os danos causados às membranas celulares, provavelmente como consequência do decréscimo observado na concentração de ROS.

3.2 Concentração de nitrito e nitrosotióis

A presença do SNP, isoladamente ou em conjunto com o As, promoveu incremento na concentração de nitrito, sendo esta resposta mais expressiva no tratamento As+SNP. O tratamento com As, por sua vez, não provocou alteração na concentração de nitrito, tendo sido observados valores similares àqueles do controle. Acréscimos na concentração de nitrosotióis, foram observados em todos os tratamentos, sendo 10,98, 18,03 e 57,64 para os tratamentos SNP, As e As+SNP, respectivamente. Observa-se que as maiores concentrações de nitrito e de nitrosotióis ocorreram no tratamento em que o As foi acrescido de SNP (Fig. 2A e B).

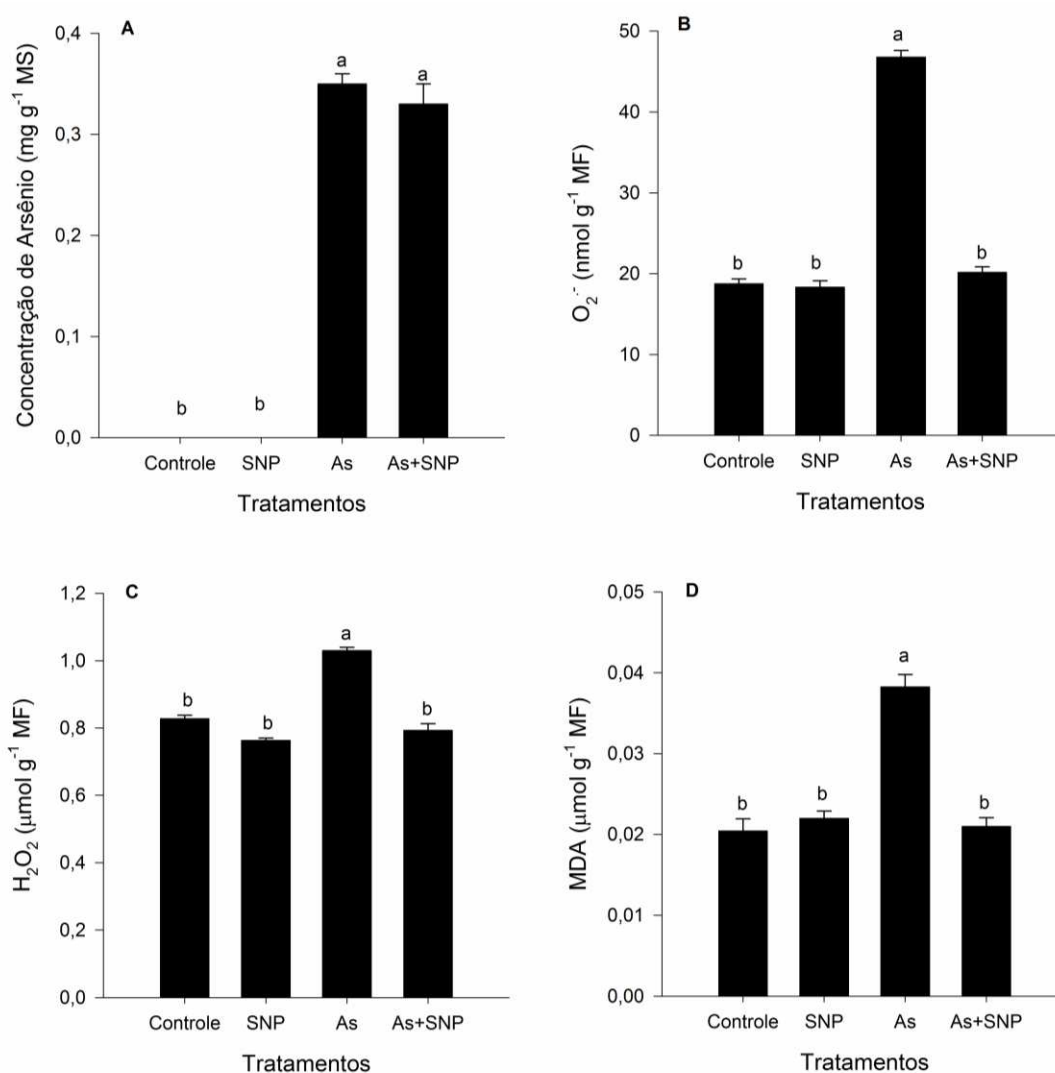


Figura 1. Teor de arsênio (A), ânion superóxido (B), peróxido de hidrogênio (C) e MDA (malondialdeído) (D) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

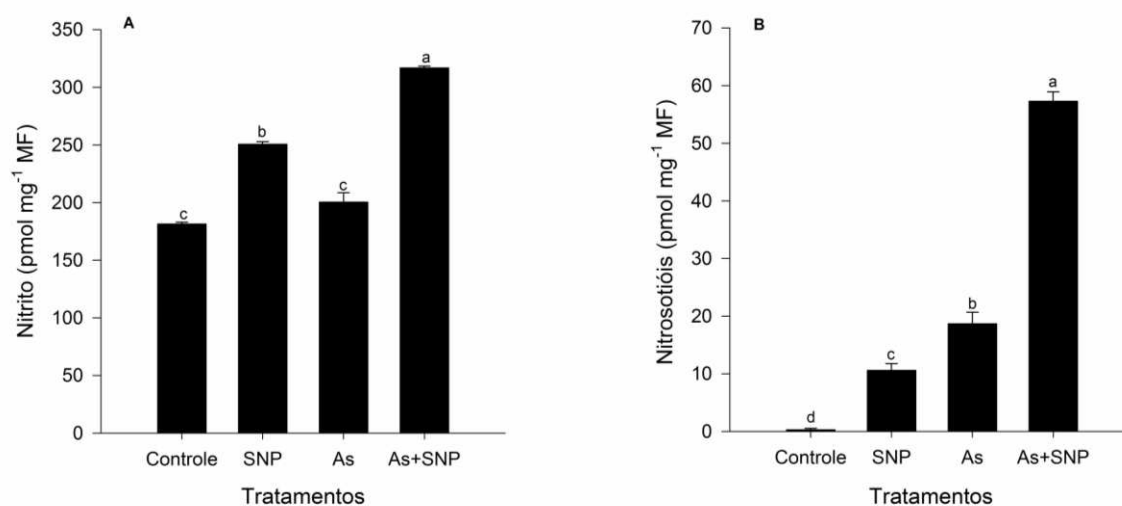


Figura 2. Concentração de nitrito (A) e nitrosotióis (B) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

3.3 Crescimento e índice de tolerância

A exposição de *P. stratiotes* ao As desencadeou quedas drásticas no crescimento vegetal, o que se refletiu em baixo índice de tolerância da planta ao metaloide (Tabela 1). As plantas submetidas ao tratamento contendo apenas As apresentaram taxa de crescimento 43,89% menor do que as plantas do controle. A adição de SNP manteve a TCR das plantas similar àquela do controle e, conseqüentemente, o índice de tolerância nessas plantas foi superior aquele observado nos espécimes submetidos apenas ao As.

3.4 Mecanismos de defesa antioxidante

Alterações nas concentrações de tióis não proteicos, tióis proteicos, glutathiona total, fitoquelatinas e ascorbato total foram observadas apenas no tratamento contendo As e SNP. Embora a concentração de tióis totais não tenha se modificado, a exposição das plantas ao

As+SNP alterou a proporção entre tióis não proteicos e proteicos, havendo aumento na concentração de um e decréscimo na concentração do outro, respectivamente (Fig. 3A-C). Nesse mesmo tratamento observou-se decréscimo na concentração de glutatona e aumento na concentração de fitoquelatinas e ascorbato. Para os demais tratamentos, a concentração dessas moléculas permaneceram semelhantes ao controle (Fig. 3D-F).

Dentre o “pool” de enzimas do metabolismo antioxidante aqui analisadas, verificou-se que respostas significativas em relação à exposição ao As ocorreram nas enzimas SOD, CAT, GPX e GR (Fig. A, D-F). A adição de SNP ao meio contendo As, por sua vez, promoveu acréscimos bem mais significativos em quase todas as enzimas, à exceção da APX (Fig. A-H), evidenciando o efeito sinalizador do NO sobre as respostas enzimáticas antioxidantes.

Tabela 1. Taxa de crescimento relativo (TCR ($\text{mg g}^{-1} \text{MS dia}^{-1}$)) e índice de tolerância (IT (%)) em *Pistia stratiotes* submetida ao arsênio (As) e ao óxido nítrico (suprido na forma de nitroprussiato sódico (SNP)).

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	SNP	As	As+SNP
TCR	14,699a	14,877a	6,451c	13,022b
IT	-	-	43,927b	88,636a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK, a 5% de probabilidade.

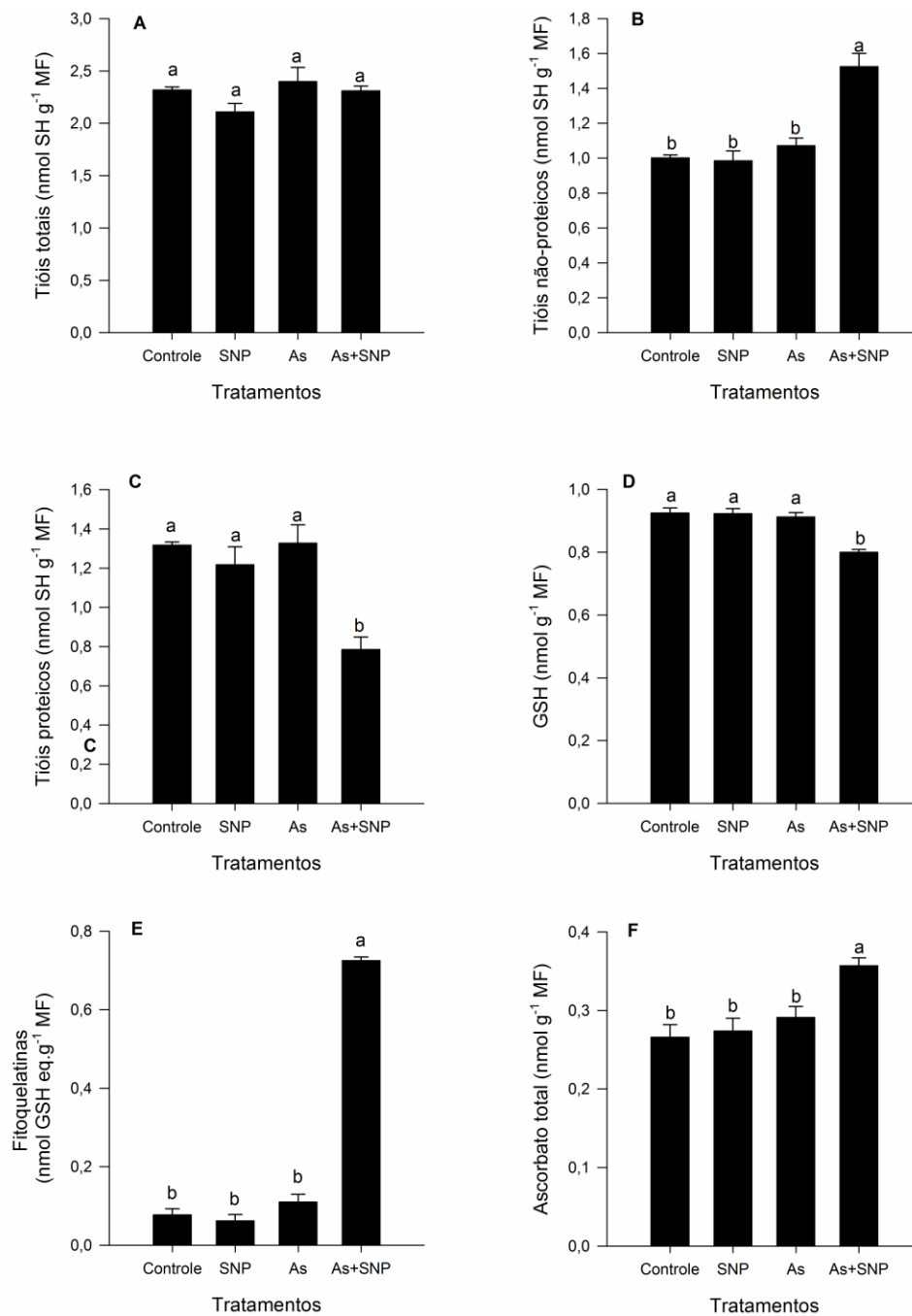


Figura 3. Concentração de tióis totais (A), tióis não proteicos (B), tióis proteicos (C), glutathiona total (GSH) (D), fitoquelatinas (E) e ascorbato total (F) em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

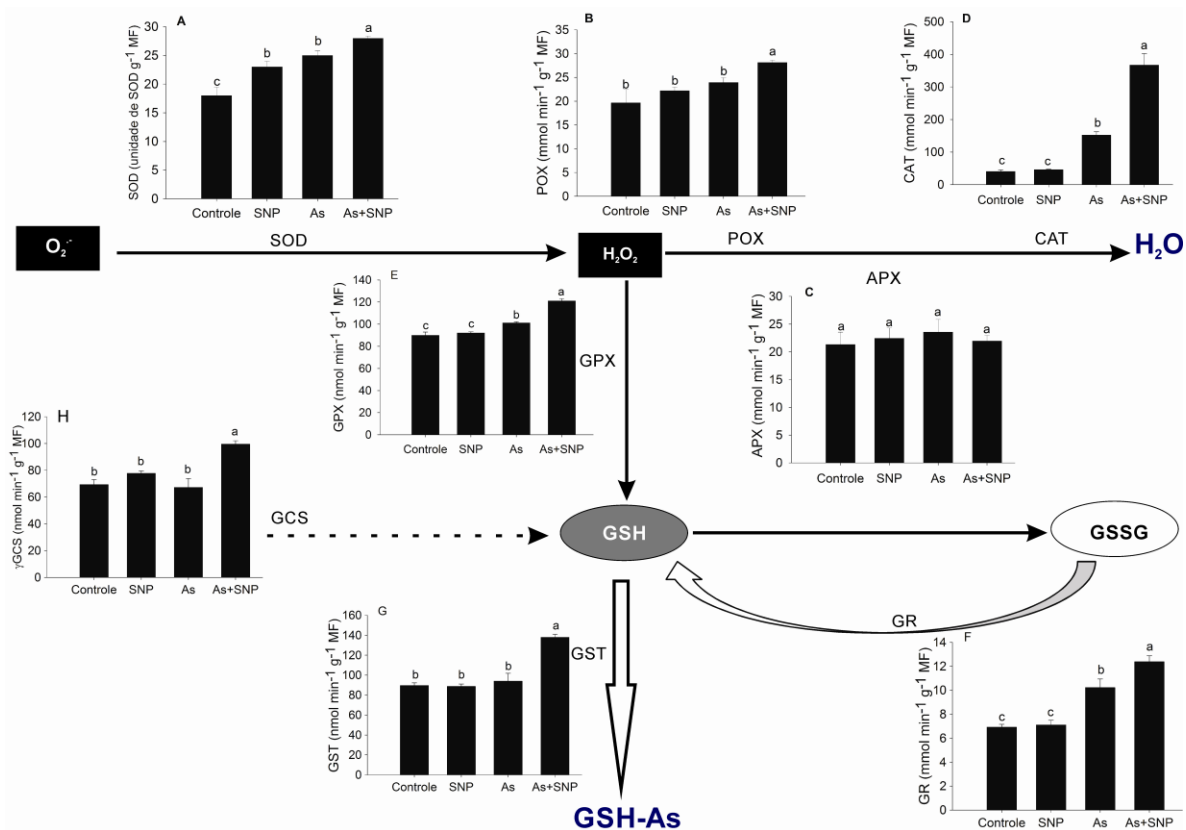


Figura 4. Representação esquemática do sistema antioxidante enzimático em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. A enzima SOD (A) elimina o ânion superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio pode ser eliminado pelas enzimas POX (B), APX (C), CAT (D) ou GPX (E), gerando água. GPX utiliza GSH como doador de elétrons, oxidando esta molécula (glutathiona oxidada - GSSG). GSSG pode ser convertido novamente à GPX pela enzima GR (F). Além de doar elétrons para a reação da GPX, GSH também pode eliminar peróxido de hidrogênio diretamente ou pode se complexar com o arsênio livre na célula, reação catalisada pela enzima GST (G). Os complexos GSH-As são direcionados para o vacúolo, onde são acumulados sem causar danos. A concentração de GSH é determinada, principalmente, pela atividade da enzima γ GCS (H). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

3.5 Perfil metabólico

Dentre as tecnologias ômicas, o metaboloma, ou perfil metabólico, é considerado o indicador mais sensível para condições de estresse (Ravenzwaay *et al.*, 2007; Lankadurai *et al.*, 2013). A análise do perfil metabólico foliar de *P. stratiotes* evidenciou uma marcante reprogramação metabólica das plantas em resposta ao As e ao SNP, uma vez que, dos 45 metabólitos detectados, 37 tiveram seus níveis alterados em pelo menos um dos tratamentos avaliados (Figura 5). As respostas mais conspícuas foram observadas nos espécimes submetidos ao As+SNP. Nessas plantas, 35 metabólitos tiveram alteração em suas concentrações, sendo que para 14 metabólitos as alterações ocorreram exclusivamente no tratamento As+SNP e para 11 metabólitos as alterações ocorreram de forma mais acentuada neste tratamento.

Dentre as classes de metabólitos analisadas, as respostas mais significativas foram àquelas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos. Com exceção da homoserina e da asparagina, todos os demais aminoácidos analisados tiveram seus níveis alterados pelos tratamentos, principalmente pelo tratamento As+SNP. De fato, sete aminoácidos apresentaram decréscimos em sua concentração (valina, prolina, glicina, glutamato, fenilalanina, ácido γ -aminobutírico (GABA) e triptofano), enquanto quatro (alanina, serina, treonina, e arginina) tiveram suas concentrações aumentadas (Figura 5).

Todos os polióis detectados (glicerol, inositol, mio-inositol, lactitol, maltitol e galactinol) sofreram decréscimos em seus níveis após a exposição ao As+SNP. A concentração de polióis, com exceção do glicerol e mio-inositol, também diminuiu no tratamento contendo apenas As, mas essas alterações não foram tão significativas (Figura 5). Comportamento semelhante foi observado em relação aos açúcares, já que o As e o SNP, supridos isoladamente ou em conjunto, diminuíram as concentrações de sacarose,

glicose, arabinose, ácido galacturônico, isomaltose e palatinose. Não foram observadas alterações na concentração dos demais açúcares analisados (Figura 5).

Com relação aos ácidos orgânicos envolvidos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), o SNP, suprido em conjunto com o As, aumentou as concentrações de fumarato e citrato, enquanto malato e succinato não se alteraram. Alterações em resposta ao As, suprido isoladamente, não foram observadas. A concentração de piruvato, um ácido orgânico chave associado com a via glicolítica, também aumentou nas plantas expostas ao As+SNP e As (Figura 5).

Da mesma forma que foi observado para o metabolismo primário, a exposição ao As e ao SNP também alterou a concentração de alguns compostos do metabolismo secundário. Embora as concentrações dos ácidos octadecanoico e nicotínico não tenha se alterado, a concentração dos ácidos cafeico e pantotênico diminuíram nas plantas submetidas ao As e ao SNP, enquanto a concentração dos ácidos 4-hidrobenzoico (4-HBA) e hexadecanoico aumentaram nesse mesmo tratamento.

3.5 Mecanismos fisiológicos

As respostas fisiológicas de *P. stratiotes* ao As e ao NO foram reportadas previamente (Farnese, 2015) e empregadas aqui na análise de componentes principais, a fim de gerar um quadro mais amplo sobre as respostas de *P. stratiotes* ao As e ao NO. O processo fotossintético foi negativamente afetado pelo As, tanto em nível de eficiência fotoquímica do transporte de elétrons no fotossistema II (Φ FSII) quanto em nível de assimilação de carbono (A). O As também diminuiu a taxa de fotorrespiração (P_R), embora tenha aumentado a respiração mitocondrial (R_D) das plantas. O SNP, quando suprido em conjunto com o As, restaurou os parâmetros fotossintéticos a níveis normais, o que

provavelmente envolveu o aumento observado no *quenching* não fotoquímico (NPQ), e aumentou a respiração ainda mais do que havia sido observado no tratamento com o metaloide. A fotorrespiração, por sua vez, foi inibida pelo SNP, tendo sido observados incrementos na razão ETR_c/ETR_o (fluxo de elétrons utilizado para a carboxilação (ETR_c) e para a oxigenação (ETR_o)) (Tabela 2).

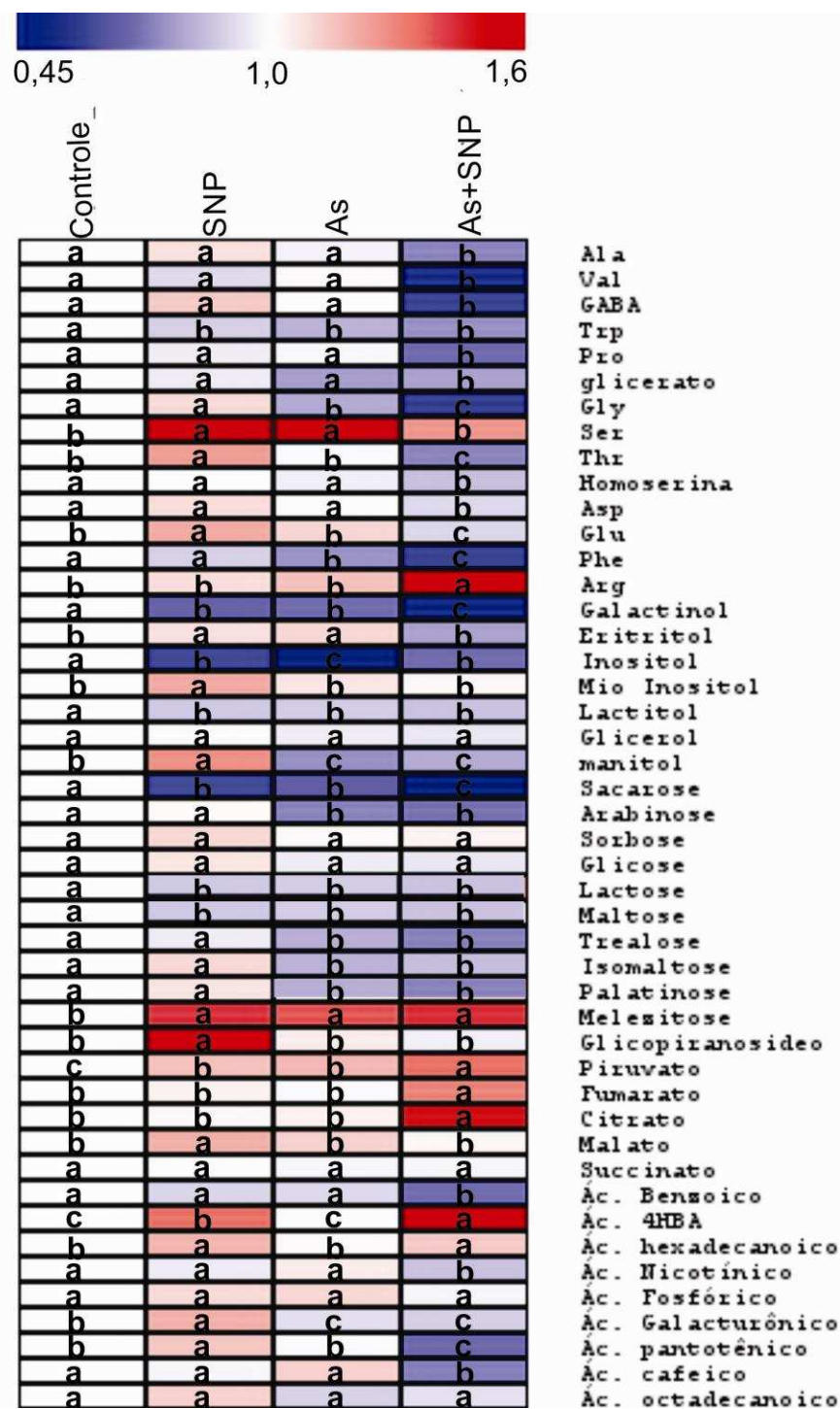


Figura 5. Mapa de calor de 46 metabólitos acumulados em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. A matriz de cores representa os valores normalizados da intensidade dos metabólitos em cada tratamento. Metabólitos seguidos pela mesma letra para diferentes tratamentos não diferem entre si pelo teste SNK ($P \leq 0,05$).

Tabela 2. Eficiência fotoquímica do transporte de elétrons associado ao fotossistema II (Φ FSII), quenching não fotoquímico (NPQ), taxa de assimilação líquida de carbono (A), respiração mitocondrial (R_D), fotorrespiração (P_R) e razão do fluxo de elétrons utilizado para a carboxilação e para a oxigenação (ETR_c/ETR_o) em *Pistia stratiotes* submetida ao arsênio (As) e ao óxido nítrico (suprido na forma de nitroprussiato sódico (SNP)) (dados provenientes de Farnese, 2015).

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	SNP	As	As+SNP
Φ FSII	0,102a	0,100a	0,072b	0,096a
NPQ	1,548b	1,430b	1,658b	2,102a
A	6,814a	6,310a	4,292b	5,989a
R_D	0,872c	1,182b	1,322b	1,748a
P_R	1,664c	2,362b	2,642b	3,516a
ETR_c/ETR_o	3,878b	5,556b	7,194b	12,348a

* A, R_D e P_R foram expressos em unidade de área ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste SNK, a 5% de probabilidade.

3.6 Relações entre as variáveis

Por meio da análise de componentes principais obteve-se uma visão integrada das alterações na dinâmica celular desencadeadas pelo As e pelo NO, sendo possível observar que as plantas submetidas aos tratamentos As e As+SNP apresentam perfis metabólicos e processos fisiológicos diferenciados. Os dois primeiros componentes (CPs) explicaram 81,0% da variância total observada. Os resultados dessa análise permitiram observar alta

similaridade entre o controle e as plantas submetidas apenas ao SNP. É importante salientar, no entanto, que apesar do padrão comum de resposta entre controle e o tratamento SNP, algumas particularidades foram observadas entre eles. No tratamento contendo apenas SNP, por exemplo, foi possível observar aumento na respiração, na fotorrespiração e em alguns metabólitos, como 4-HBA e ácido hexadecanoico. Essas diferenças provavelmente são consequência do papel do NO como sinalizador, embora a sua ação tenha sido maximizada quando a planta se encontrava sob estresse (Figura 6).

A exposição das plantas ao As, de forma isolada ou combinada com o SNP, promoveu profundas alterações metabólicas e funcionais nas folhas de *P. stratiotes*, sendo possível observar um comportamento diferencial entre as plantas submetidas aos dois tratamentos. Indicadores de danos ou de estresse oxidativo, como MDA, H_2O_2 e O_2^- estavam mais fortemente relacionados às plantas submetidas ao As, enquanto Φ FSII e a taxa de assimilação de carbono se relacionaram negativamente. Nos espécimes de *P. stratiotes* submetidos ao tratamento As+SNP, por outro lado, enzimas antioxidantes, antioxidantes não enzimáticos e compostos do metabolismo secundário (ácido hexadecanoico e ácido 4-HBA) se relacionaram mais fortemente e, provavelmente, foram os principais responsáveis pelo alto índice de tolerância dessas plantas. Alterações desencadeadas na fotossíntese, respiração e na fotorrespiração também contribuíram para a diferenciação metabólica das plantas nesse tratamento, como pode ser observado pela forte relação entre NPQ, P_R , R_D e intermediários do TCA (fumarato e citrato). É importante salientar ainda que alguns metabólitos se relacionaram negativamente com o As+SNP, provavelmente devido ao consumo destes compostos, como é o caso de fenilalanina, prolina e sacarose (Figura 6).

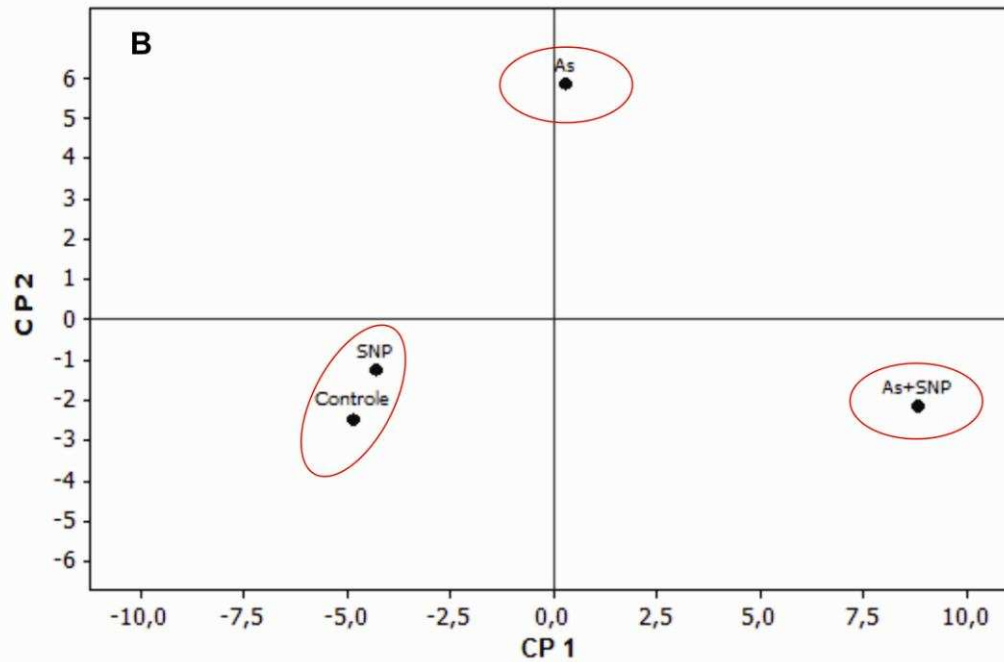
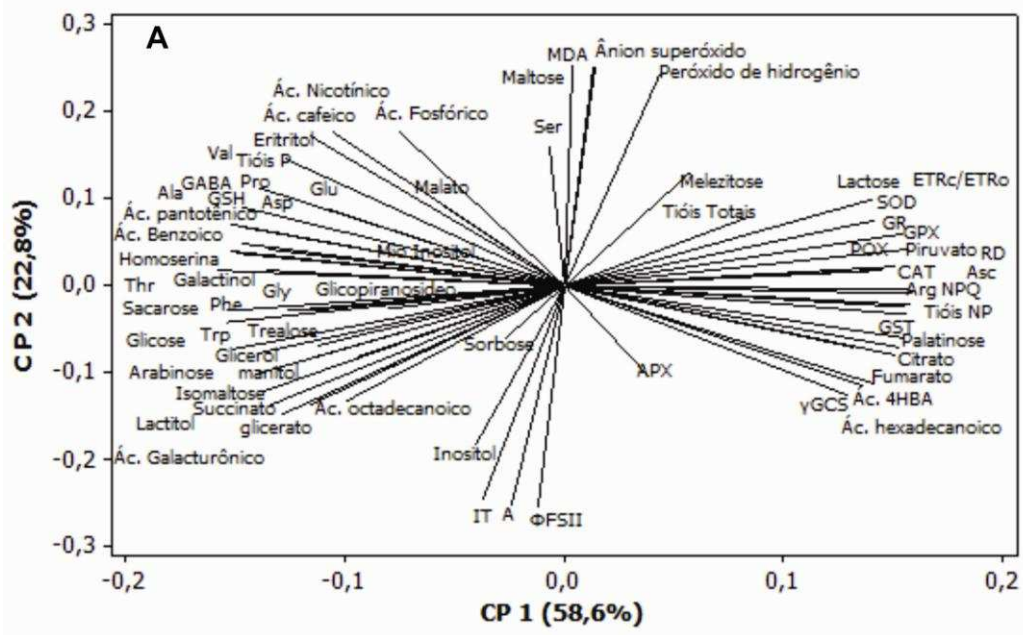


Figura 6. Análise dos dois primeiros componentes principais em folhas de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio, isoladamente ou em conjunto com SNP, por 24 horas. Distribuição das variáveis (A) e dos tratamentos (B) entre os dois primeiros componentes.

4. Discussão

Diversos danos foram desencadeados nas folhas de *Pistia stratiotes* devido à exposição e ao acúmulo de As, evidenciados pelo aumento nas concentrações de MDA, O_2^- , H_2O_2 e pelo conseqüente comprometimento da fotossíntese e do crescimento. Esses efeitos danosos do As foram parcialmente mitigados pelo SNP, provavelmente devido à liberação de NO. De fato, a exposição das plantas ao SNP, isolado ou em combinação com o As, aumentou o nível de nitrito nas células, evidenciando aumento na concentração celular de NO (Vitecek *et al.*, 2008). Em soluções aquosas, o NO é uma molécula altamente instável e que se oxida rapidamente, formando dois produtos finais estáveis, nitrito e nitrato, sendo que a concentração nitrito tem sido largamente utilizada como indicador da concentração de NO nas células vegetais (Vitecek *et al.*, 2008; Yucel *et al.*, 2012; Ziogas *et al.*, 2013).

O principal mecanismo pelo qual o NO regula a resposta das plantas ao estresse é a S-nitrosilação, que consiste na ligação covalente do NO a resíduos de cisteína de proteínas-alvo, formando nitrosotióis (Frungillo *et al.*, 2014). A S-nitrosilação pode alterar a atividade, a estabilidade ou a localização subcelular das proteínas-alvo e, assim, alterar todo o funcionamento da célula (Sehrawat e Deswal, 2014). Incrementos na concentração de nitrosotióis já foram observados em plantas expostas a estresses bióticos e abióticos, e têm sido associados com o aumento da tolerância das plantas às condições estressantes (Feechan *et al.*, 2005; Kubienová *et al.*, 2014).

Embora a concentração de nitrosotióis tenha aumentado após a exposição ao As e ao SNP, fornecidos de forma isolada, essa resposta foi maximizada quando as duas moléculas foram supridas em conjunto. Esses resultados indicam, ainda que circunstancialmente, que a S-nitrosilação é um mecanismo normalmente envolvido na resposta de *P. stratiotes* ao

As. A adição de SNP no tratamento contendo As, no entanto, potencializou esse mecanismo de sinalização, desencadeando diversas alterações no metabolismo vegetal e, em última instância, aumentando a tolerância da planta ao poluente.

O aumento na tolerância ao As observado nas folhas de *P. stratiotes* foi consequência de um efeito global do SNP sobre a dinâmica celular, provavelmente mediado pela formação de nitrosotióis. A adição de SNP alterou o metabolismo antioxidante e o metabolismo primário e secundário de *P. stratiotes*. É provável que todas essas alterações tenham um efeito cumulativo e contribuam para uma reprogramação metabólica, tornando possível a restauração da homeostase celular. As maiores alterações observadas, no entanto, dizem respeito ao metabolismo antioxidante das plantas, tanto enzimático quanto não enzimático. Tal afirmação foi corroborada pela análise dos metabólitos, onde uma parcela significativa dos compostos que foram responsáveis pelo agrupamento no PCA tem ação antioxidante.

Em relação ao metabolismo antioxidante enzimático, O SNP, suprido em conjunto com o As, aumentou a atividade da SOD, enzima envolvida na eliminação do O_2^- , e da POX, CAT e GPX, as quais catalisam a conversão do H_2O_2 em água (Noori, 2012). Durante esse processo a enzima GPX utiliza a glutathiona como doadora de elétrons, formando glutathiona oxidada. A glutathiona oxidada pode ser convertida à sua forma reduzida pela enzima GR, a qual também apresentou incrementos em sua atividade após a exposição ao As+SNP. Resultados similares já foram observados para outras plantas expostas ao As e ao SNP (Namdjoyan e Kermaian, 2013; Singh *et al.*, 2013), evidenciando que o aumento na atividade de enzimas do metabolismo antioxidante é um mecanismo amplamente empregado por diferentes plantas na resposta ao As e que pode ser afetado pelo NO.

Assim como observado para as enzimas do metabolismo antioxidante, compostos antioxidantes não enzimáticos também foram afetados pelo SNP e contribuíram para a tolerância de *P. stratiotes* ao As. Dentre estes compostos, a glutatona aparentemente teve um papel essencial na mitigação dos danos desencadeados pelo metaloide. A glutatona é considerada uma molécula central nos mecanismos de defesa contra o As (Leão *et al.*, 2014b) e diferentes etapas do seu metabolismo foram afetadas pelo SNP. De fato, a atividade da enzima γ GCS, a qual catalisa o primeiro passo na síntese de glutatona e é considerada a etapa limitante desse processo (Noctor e Foyer, 1998), aumentou nas plantas submetidas ao tratamento As+SNP. A capacidade do SNP em desencadear incrementos na atividade da γ GCS foi previamente relatado por Shan *et al.* (2012). No presente estudo, o aumento na atividade desta enzima foi acompanhado por decréscimos nas concentrações de dois dos aminoácidos empregados na síntese de glutatona, o glutamato e a glicina. No entanto, apesar dos dados sugerirem aumento na biossíntese de glutatona observou-se que a sua concentração diminuiu, provavelmente devido à complexação com o poluente e/ou consumo para a síntese de fitoquelatinas.

A principal rota de desintoxicação do As nas células vegetais envolve a complexação do metaloide com ligantes ricos em enxofre, incluindo fitoquelatinas e a própria glutatona. Esta complexação reduz a concentração de As livre no citosol, reduzindo, assim, os danos celulares (Requejo e Tena, 2012). As fitoquelatinas, cuja unidade básica é a glutatona, representam a principal classe de tióis não proteicos (Zhang *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível que os incrementos desencadeados pelo SNP nas concentrações de tióis não proteicos e de fitoquelatinas sejam responsáveis pelo decréscimo na concentração de glutatona no tratamento As+SNP, a despeito do aumento da atividade de γ GCS. Respostas similares já foram observadas em *Lemna gibba*, macrófita aquática

considerada tolerante ao As (Leão *et al.*, 2014b), o que evidencia a relevância do mecanismo desencadeado pelo SNP para a tolerância das plantas ao metaloide.

Outro fator que pode ter contribuído para a redução dos teores de glutathione no tratamento As+SNP é a complexação desta molécula com o As, reação catalisada pela enzima GST. A GST promove a conjugação da glutathione via grupo sulfidril a uma variedade de compostos eletrofílicos (Agusa *et al.*, 2010) e vários trabalhos já evidenciaram que esse processo é importante para a tolerância das plantas ao As (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009; Leão *et al.*, 2014b). Essa hipótese é corroborada pelo aumento desencadeado pelo SNP na atividade de GST e que também já foi relatado para outras plantas expostas ao As (Singh *et al.*, 2013).

Além da glutathione, outros antioxidantes não enzimáticos tiveram suas concentrações alteradas em resposta ao SNP, como o ascorbato, polióis e diversos aminoácidos. O aumento na concentração de ascorbato foi acompanhado por decréscimo nos níveis do substrato utilizado para sua síntese, o ácido galacturônico (Hemavathi *et al.*, 2009). O ascorbato é o antioxidante mais abundante nas células vegetais e pode reagir diretamente com ROS ou ser utilizado como co-substrato para enzimas, além de participar da regeneração de outros antioxidantes, como o tocoferol (Foyer e Noctor, 2011). Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram observados em espécies do gênero *Luffa* expostas ao As e ao SNP, sendo que o aumento na concentração de ascorbato aparentemente teve papel fundamental para tolerância das plantas ao poluente (Singh *et al.*, 2013).

Os polióis são compostos do metabolismo secundário que apresentam múltiplos grupos funcionais e, dentre diversas outras funções, podem agir como antioxidantes capazes de eliminar o excesso de ROS, como é o caso do manitol e galactinol. Os polióis

são importantes na resposta das plantas a metais pesados e metaloides (Gupta e Huang, 2014) e, no tratamento As+SNP, observou-se decréscimo em suas concentrações. É possível que essa redução seja resultado do consumo desses compostos em mecanismos de defesa celular, os quais contribuíram para a manutenção de níveis constantes de ROS.

A resposta das plantas ao As envolve a participação de aminoácidos relacionados ao estresse (Hossain *et al.*, 2012), os quais podem participar da síntese de compostos de defesa, agir diretamente como antioxidantes ou se complexar com metais e metaloides (Sharma e Dietz, 2006). Assim como observado para os polióis, a concentração de vários aminoácidos diminuiu no tratamento As+SNP, e é provável que essa alteração seja consequência de um redirecionamento dos aminoácidos para reações que preveniram o acúmulo de ROS e os danos desencadeados pelo As. Dentre os vários aminoácidos detectados pela análise do perfil metabólico, convém ressaltar a diminuição desencadeada pelo As+SNP nas concentrações de glicina e glutamato, aminoácidos envolvidos na síntese da glutathione; de fenilalanina, o qual participa da via biossintética da maioria dos compostos fenólicos, incluindo o ácido 4-HBA (Widhalm e Dudareva, 2015); da prolina, a qual pode agir diretamente como antioxidante e eliminar diversas ROS, principalmente oxigênio singlete e radical hidroxila (Kaul *et al.*, 2008); do GABA, o qual é importante na resposta das plantas contra o estresse oxidativo, apresentando capacidade antioxidante maior do que a prolina (Liu *et al.*, 2011). O consumo de GABA também pode estar relacionado com o metabolismo respiratório, uma vez que esse aminoácido pode ser convertido em succinato e, dessa forma, entrar no TCA (Renault 2013); e a diminuição nos níveis de triptofano, aminoácido que, além de possuir atividade antioxidante (Meucci e Mele, 2012), também é utilizada na síntese de diversos compostos envolvidos na eliminação de ROS (Christen *et al.*, 1990).

Em relação aos antioxidantes é importante ressaltar, ainda, o papel dos ácidos hecadedecanoico e 4-HBA, ambos produtos do metabolismo secundário. O 4-HBA é um isômero do ácido salicílico que contribuiu para a diferenciação dos perfis metabólicos das plantas entre os tratamentos As e As+SNP. O aumento na concentração deste composto foi observado apenas quando *P. stratiotes* foi submetida ao SNP, isolado ou em combinação com o As. Embora não tenham sido encontrados relatos sobre o envolvimento do ácido 4-hidroxibenzoico na resposta das plantas ao As, estudos prévios já demonstraram o efeito benéfico desta molécula em condições de estresse abiótico, aumentando capacidade antioxidante celular ou inibindo a formação de ROS (Horváth *et al.*, 2007; Ooh *et al.*, 2014). O ácido hexadecanoico, por sua vez, é um composto antioxidante que pode ser encontrado nas folhas de algumas plantas e que também aumentou em resposta ao SNP, isolado ou em combinação com o As (Sermakkani e Thangapandian, 2012).

Açúcares como glicose, sacarose e arabinose são conhecidos por se acumular nas células vegetais em condições de estresse abiótico (Foroughi *et al.*, 2014). No presente estudo, no entanto, isso não foi observado, e concentração de açúcares diminuiu nos tratamentos As e As+SNP. Resultados similares foram observados em plantas submetidas ao estresse desencadeado por metais, como Zn (Foroughi *et al.*, 2014). É provável que isso seja consequência do aumento que foi relatado na respiração mitocondrial, sobretudo no tratamento As+SNP, e coincide com o incremento dos níveis de piruvato e intermediários do ciclo TCA, como o fumarato e o citrato, bem como com a diminuição na concentração de ácido pantotênico, o qual participa da síntese da coenzima A (Hutschenreuther *et al.*, 2013). De uma forma geral, o As tem efeito danoso sobre o status energético celular, o que desencadeia incrementos na atividade respiratória sem que ocorra um acoplamento com a síntese de ATP, comprometendo todo o metabolismo celular (Finnegan and Chen, 2012).

No tratamento As+SNP, no entanto, a diminuição na concentração de glutathiona, associada aos aumentos observados na atividade de GST, indicam, ainda que circunstancialmente, que o SNP pode ter contribuído para a diminuição do As livre no citosol. Assim sendo, o metabolismo respiratório sofreria menor influência do metaloide e o seu incremento teria um efeito benéfico sobre o metabolismo vegetal, podendo fornecer esqueletos de carbono para a síntese de compostos envolvidos em mecanismos de defesa (Bolton, 2009) e, ainda, agindo como um dreno de elétrons para possíveis excessos de poder redutor gerados durante a fotossíntese (Millar *et al.*, 2011).

Quando analisados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo permitem observar que o NO, suprido na forma de SNP, não agiu de forma pontual nas folhas de *Pistia stratiotes* submetidas ao As. Ao invés disso, o NO teve uma ação global, e seus efeitos diretos ou indiretos permitiram a reprogramação e a integração do metabolismo primário, secundário e antioxidante de *P. stratiotes*, o que resultou em aumento na tolerância, restauração do processo fotossintético e manutenção do crescimento vegetal mesmo após a exposição ao poluente. Apesar do presente estudo fornecer uma perspectiva mais abrangente do envolvimento do NO nas respostas das plantas ao As, ainda são necessárias análises adicionais para a compreensão dos mecanismos de ação deste sinalizador. Desta forma, é importante que estudos futuros busquem a identificação dos sinalizadores que agem *upstream* e *downstream* ao NO, bem como a identificação das moléculas S-nitrosiladas e análises de expressão gênica. Tais resultados permitiriam não apenas a compreensão das vias de sinalização em resposta ao estresse por metais pesados e metaloides, mas também a obtenção de marcadores moleculares do estresse e, ainda, a obtenção plantas geneticamente modificadas capazes de suportar altas concentrações desses

poluentes, as quais poderiam, por exemplo, ser utilizadas em programas de descontaminação ambiental.

Referências bibliográficas

Agusa T, Iwat H, Fujihara J, Kunito T, Takeshita H, Minh BT, Trang PTK, Viet PH, Tanave S (2010) Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase (GST) superfamily and arsenic metabolism in residents of the Red River Delta, Vietnan. **Toxicology and Applied Pharmacology** 242: 352-362.

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

Bolton MD (2009) Primary metabolism and plant defense - fuel for the fire. **Molecular Plant Microbe Interaction** 22: 487-497.

Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L (2002) Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. **Methods in Enzymology** 105: 280-287.

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

Christen S, Peterhans E, Stocker R (1990) Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. **PNAS** 87: 2506-2510.

Clark, R.B., 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J Agric. Food Chem.* 23, 458-460.

Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany** 109: 212–228.

Farnese FS (2015) Sinalização celular em resposta ao arsênio: mecanismos de ação do óxido nítrico em nível ultraestrutural, fisiológico e bioquímico. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de Viçosa.

Feechan A, Kwon E, Yun B-W, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. **PNAS** 102: 8054-8059.

Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V (2011) Recommendations for reporting metabolite data. **The Plant Cell** 23: 2477-2482.

Finnegan PM, Chen W (2012) Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. **Frontiers in Physiology** 3: 1-18.

Foroughi S, Baker AJM, Roessner U, Johnson AAT, Bacicbde A, Callahan DM (2014) Hyperaccumulation of zinc by *Noccaea caerulea* results in a cascade of stress responses and changes in the elemental profile. **Metallomics** 6: 1671-1682.

Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. **Plant Physiology** 155: 2-18.

Frunghillo L, Skelly M, Loake GJ, Spoel SH, Salgado I (2014) S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. **Nature Communications** 5: 1-6.

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

- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59: 309–314.
- Groß F, Durner J, Gaupels F (2013) Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. **Frontiers in Plant Science** 4: 1-15.
- Gupta B, Huang B (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International Journal of Genomics** 2014: 1-18.
- Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS, Cambraia J (2013) Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. **Acta Physiologiae Plantarum** 35: 1201-1209.
- Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (1974) Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry** 249: 7130-7139.
- Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Ten BW, Schat H, Meharg AA (2001). Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Plant Physiology** 126: 299-306.
- Hemavathi A, Upadhyaya CP, Young KE, Akula N, Kim H, Heung JJ, Oh Man Oh, Aswath CR, Chun SC, Kim DH, Park SW (2009) Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance. **Plant Science** 177: 659–667.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** 207: 604-611.

Horváth E, Pál M, Szalai G, Páldi E, Janda T (2007) Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. **Biologia plantarum** 51: 480-487.

Hossain MA, Piyatida P, Silva JAT, Fujita M (2012) Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. **Journal of Botany** 2012: 1-37.

Hunt R (1978) **Plant growth analysis**. London: Edward Arnold Limited 67 p.

Hutschenreuther A, Birkenmeier G, Bigl M, Krohn K, Birkemeyer C (2013) Glycerophosphoglycerol, beta-alanine, and pantothenic acid as metabolic companions of glycolytic activity and cell migration in breast cancer cell lines. **Metabolites** 3: 1084-1101.

Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry** 225: 165-167.

Kaul S, Sharma SS, Mehta IK (2008) Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. **Amino acids** 34: 315-320.

Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E, Dormann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D (2005) The Golm metabolome database. **Bioinformatics** 21: 1635-1638.

Kubienová L, Tichá T, Jahnová J, Luhová L, Mieslerová B, Petrivalský M (2014) Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosogluthathione reductase in plants. **Planta** 239:139-146.

Kumar D, Singh VP, Tripathi DK, Prasad SM, Chauhan DK (2015). Effect of arsenic on growth, arsenic uptake, distribution of nutrient elements and thiols in seedlings of *Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb. **International Journal of Phytoremediation** 17: 128-134.

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

Lankadurai BP, Nagato EG, Simpson MJ (2013) Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. **Environmental Review** 21: 180–205.

Leão, G, Oliveira, JA, Felipe, RTA, Farnese, FS, Gusman, GS (2014a) Anthocyanins, thiols and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. **Journal of Plant Interactions** 9:1: 143-151.

Leão GA, Oliveira JA, Farnese FS, Gusman GS, Felipe RTA (2014b) Sulfur metabolism: different tolerances of two aquatic macrophytes exposed to arsenic. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 105: 36–42.

Lindeman W (1985) Observations on the behavior of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light. Proc 2nd International **Conference on the Peaceful Uses Atomic Energy** 24: 8-15.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols** 1: 387-396.

Liu C, Zhao L, Yu G (2011) The dominant glutamic acid metabolic flux to produce γ -amino butyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under water stress relates to its significant role in antioxidant activity. **Journal of Integrative Plant Biology** 53: 608–618.

Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J (2008) Tag Finder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolite profiling experiments. **Bioinformatics** 24: 732-737.

Marin AR, Pezeshki SR, Masschelen PH, Choi HS (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. **Journal of Plant Nutrition** 16: 1532-4807.

Meucci E, Mele MC (1997) Amino acids and plasma antioxidant capacity. **Amino Acids** 12: 373-377.

Millar AH, Whelan J, Soole KL, Dayl DA (2011) Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. **Annual Review of Plant Biology** 62: 79-104.

Misra HP, Fridovich I (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **The Journal of Biological Chemistry** 246: 6886-6890.

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

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

Namdjoyan S, Kermanian, H (2013) Exogenous nitric oxide (as sodium nitroprusside) ameliorates arsenic-induced oxidative stress in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) plants. **Scientia Horticulturae** 161: 350-356.

Noori S (2012) An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. **Open Access Scientific Reports** 8: 2-9.

Ooh K-F, Ong H-C, Wong F-C, Sit N-W, Chai T-T (2014) High performance liquid chromatography profiling of health-promoting phytochemicals and evaluation of antioxidant, anti-lipoxygenase, iron chelating and anti-glucosidase activities of wetland macrophytes. **Pharmacognosy** 10: 443-455.

Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim PR, Moreira MA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 11: 137-143.

Rahman MA, Hasegawa H, Rahman MM, Islam MN, Majid-Miah MA, Tasmien A (2007) Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. **Chemosphere** 67: 1072-1079.

Ravenswaay B, Cunha GCP, Leibold E, Looser R, Mellert W, Prokoudine A, Walk T, Wiemer J (2007). The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect. **Toxicology Letters** 172 (1–2): 21–28.

Renault H (2013) Fiat lux! Phylogeny and bioinformatics shed light on GABA functions in plants. **Plant Signaling and Behavior** (8) 6: e24274-1- e24274-4.

Requejo R, Tena M (2012) Influence of glutathione chemical effectors in the response of maize to arsenic exposure. **Journal of Plant Physiology** 169: 649–656.

Rofkar JR, Dwyer DF, Bobak DM (2014) Uptake and toxicity of arsenic, copper, and silicon in *Azolla caroliniana* AND *Lemna minor*. **International Journal of Phytoremediation** 16: 155-166.

Ruegsegger A, Brunold CH (1992) Effect of cadmium and/or removal of kernels or shoots on the levels of cysteine, γ -glutamyl-cysteine, glutathione, and TCA soluble thiols in maize seedlings. **Phyton** 32: 109–112.

Saxena I, Shekhawat GS (2013) Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitration. **Nitric oxide** 32: 13-20.

Schauer N, Steinhäuser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner U, Forbes MG, Willmitzer L, Fernie AR, Kopka J (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters** 579: 1332-1337.

Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry** 25: 192–205.

Sehrawat A, Deswal R (2014) Sub-proteome S-nitrosylation analysis in *Brassica juncea* hints at the regulation of Brassicaceae specific as well as other vital metabolic pathway(s) by nitric oxide and suggests post-translational modifications cross-talk. **Nitric oxide** 43: 97-111.

Sermakkani M, Thangapandian V (2012) GC-MS analysis of *Cassia italica* leaf methanol extract. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research** 5 (2): 90-94.

Shan C, He F, Xu G, Han R, Liang Z (2012) Nitric oxide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. **Biologia Plantarum** 56: 187-191.

Sharma SS, Dietz K-J (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. **Journal of Experimental Botany** 57: 711–726.

Singh VP, Srivastava PK, Prasad SM (2013) Nitric oxide alleviates arsenic-induced toxic effects in ridged *Luffa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry** 71: 155-163.

Sridhar BBM, Han FX, Diehl SV, Monts DL, Su Y (2011) Effect of phytoaccumulation of arsenic and chromium on structural and ultrastructural changes of brake fern (*Pteris vittata*). **Brazilian Journal of Plant Physiology** 23: 285-293.

Vanzo E, Ghirardo A, Merl-Pham J, Lindermayr C, Heller W, Hauck SM, Durner J, Schnitzler JP (2014) S-nitroso-proteome in poplar leaves in response to acute ozone stress. **Plos One** 9: 1-14.

Vitecek J, Reinohl V, Jones RL (2008) Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells. **Molecular Plant** 1: 270-284.

Widhalm JR, Dudareva N (2015) A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. **Molecular Plant** 8, 83–97.

Wilkins DA (1978) The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. **New Phytologist** 80: 623–633.

Xiong L, Schumaker KS, Zhu J-K (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell** 14: S165–S183.

Yucel AA, Gulen S, Dincer S, Yucel AE, Yetkin I (2012) Comparison of two different applications of the Griess method for nitric oxide measurement. **Journal of Experimental and Integrative Medicine** 2: 167-171.

Zhang X, Uroic MK, Xie W, Zhu Y, Chen B, McGrath S, Feldmann J, Zhao F (2012). Phytochelatins play a key role in arsenic accumulation and tolerance in aquatic macrophyte *Wolffia globosa*. **Environmental Pollution** 165: 18–24.

Ziogas V, Tanou G, Filippou P, Diamantidis G, Vasilakakis M, Fotopoulos V, Molassiotis A (2013) Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** 68: 118-126.

CONCLUSÕES GERAIS

A absorção de arsênio (As) por *Pistia stratiotes* desencadeou uma série de danos aos vegetais, afetando processos fisiológicos como a fotossíntese, respiração e fotorrespiração, e danificando toda a estrutura celular, principalmente o sistema de membranas, com especial efeito sobre o vacúolo, cloroplastos e mitocôndria. Esses efeitos deletérios do As provavelmente são consequência do aumento observado na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). A adição de SNP, por sua vez, atenuou os efeitos deletérios do As, o que aparentemente envolveu mecanismos de sinalização relacionados com a S-nitrosilação proteica. A restauração da homeostase celular pelo SNP envolveu alterações em toda a dinâmica celular, abrangendo tanto alterações bioquímicas quanto fisiológicas. Dentre as alterações bioquímicas, as mais conspícuas referem-se a antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, os quais foram efetivos na manutenção da concentração de ROS em níveis similares ao controle. Dentre esses antioxidantes, a glutathiona parece ter um papel central, uma vez que diversas enzimas que participam do seu metabolismo foram alteradas. Igualmente importantes foram os polióis, como galactinol, glicerol e manitol, e aminoácidos, como a prolina, glutamato e fenilalanina. Dentre os processos fisiológico, o SNP aumentou a taxa respiratória, de forma que esse processo pôde fornecer esqueletos de carbono para mecanismos de defesa, bem como agir como um dreno para o excesso de poder redutor produzido na fotossíntese. Adicionalmente, ocorreu a diminuição da fotorrespiração e, em consequência, houve redução na produção de ROS. Todas essas alterações, em conjunto, foram importantes para a manutenção da estrutura celular, da fotossíntese e do crescimento de *P. stratiotes* e, em última instância, contribuíram para o aumento na tolerância das plantas ao poluente. O NO é, portanto, um sinalizador essencial

na resposta das plantas ao As e atua, direta ou indiretamente, em diversas vias diferentes, promovendo a integração dos processos celulares e permitindo a manutenção da homeostase celular em plantas expostas ao metaloide. Tais resultados, além de contribuir para o avanço na sinalização desencadeada pelo NO, podem servir de base para o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados para utilização em programas de fitorremediação.

