

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO
CHUMBO EM PLANTAS DE QUITOCO (*Pluchea
sagittalis*): POSSÍVEL PAPEL FITORREMEIADOR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Liana Veronica Rossato

Santa Maria, fevereiro de 2010

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO CHUMBO EM
PLANTAS DE QUITOCO (*Pluchea sagittalis*): POSSÍVEL
PAPEL FITORREMEIADOR**

por

Liana Veronica Rossato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Maria Rosa Chitolina Schetinger
Orientadora
Vera Maria Morsch
Co-orientadora

Santa Maria, RS, Brasil
2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO CHUMBO EM
PLANTAS DE QUITOCO (*Pluchea sagittalis*): POSSÍVEL PAPEL
FITORREMEIADOR**

elaborada por
Liana Veronica Rossato

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA


Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Janette Palma Fett, Dra (UFRGS)


Maria Ester Pereira, Dra (UFSM)

Santa Maria, 18 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

À meus pais, Emilia Rossato e Diomedes S. Rossato
pela vida, pelo amor e confiança que sempre em mim depositaram

Aos meus irmãos, Luciana, Tobias, Taisa, Tiago e Carla
pela amizade e incentivo em todos os momentos

Ao meu namorado, João
pelo amor, amizade e incentivo

Dedico e ofereço!

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Prof^a. Maria Rosa C. Schetinger, pela receptividade, orientações e auxílios em todos os momentos, obrigada.

À co-orientadora, Prof^a. Vera Maria Morsch, pelo conhecimento e atenção, obrigada.

Ao professor Fernando T. Nicoloso por, desde a graduação, despertar em mim a vontade de trabalhar com pesquisa científica, pela orientação, dedicação e ensinamentos, muito obrigada.

Aos colegas de laboratório: Júlia, Luciane T., Denise, Luciane B., Jamile, Joseila, Gabriel Y C., Sibila, Gabriel e Jader por toda a colaboração, amizade e apoio prestados durante o desenvolvimento do trabalho, obrigada.

À UFSM, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, aos professores, ao CNPq, e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO CHUMBO EM PLANTAS DE QUITOCO (*Pluchea sagittalis*): POSSÍVEL PAPEL FITORREMEIADOR

Autora: Liana Veronica Rossato
Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Co-Orientadora: Vera Maria Morsch
Data e local de defesa: Santa Maria, 18 de fevereiro de 2010.

O Chumbo (Pb) é um dos elementos tóxicos mais abundantes e globalmente distribuídos. A contaminação dos solos, ar e água por este metal leva a sua acumulação em peixes, mamíferos e plantas e a intoxicação humana, através da alimentação. Devido aos efeitos danosos do Pb ao ecossistema, é necessário que estas áreas sejam reabilitadas. A fitorremediação é uma técnica de baixo custo que pode ser utilizada com tal objetivo. Para que a planta seja utilizada na fitorremediação, no entanto, é necessário haver conhecimento sobre o comportamento vegetal quando exposto ao contaminante. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar aspectos fisiológicos e bioquímicos da toxidez do Pb em raízes e folhas de diferentes regiões da parte aérea (apical, mediana e basal) em plantas de *P. sagittalis*. As plantas foram expostas a cinco concentrações de Pb: (0, 200, 400, 600, 1000 μM) durante 30 dias. Após esse período foram avaliados parâmetros de crescimento, concentração de Pb nos tecidos, indicadores de toxicidade (atividade da δ -aminolevulinato desidratase, δ -ALA-D), marcadores de dano oxidativo (TBARS, peroxidação lipídica, e concentração de H_2O_2) e antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, SOD, catalase, CAT, e ascorbato peroxidase, APX) e não enzimáticos (tióis não protéicos, NPSH, ácido ascórbico, AsA). A concentração de Pb nos tecidos aumentou com o acréscimo de Pb ao meio ocasionando uma diminuição do consumo de solução nutritiva e da taxa de transpiração. Da mesma forma ocorreu decréscimo na matéria fresca da raiz e da parte aérea, na área foliar, na altura da parte aérea e na atividade da δ -ALA-D com o aumento da concentração de Pb. Por outro lado, a matéria seca da raiz e da parte aérea, a concentração de clorofila e carotenóides não foram afetadas, sendo que os pesos das matérias fresca e seca das raízes aumentaram em 200 μM Pb comparado ao controle. O índice de tolerância das raízes e da parte aérea de *P. sagittalis* reduziu nas maiores concentrações de Pb. Contudo, as raízes foram mais tolerantes ao Pb que a parte aérea. Com o aumento da concentração de Pb, a peroxidação lipídica e a concentração de H_2O_2 aumentaram nas raízes e folhas. A atividade da APX aumentou em todas as partes da planta com o aumento da concentração de Pb, enquanto a atividade da SOD aumentou nas folhas e não foi afetada nas raízes. A atividade da CAT nas folhas da região apical não foi alterada pelo aumento da concentração de Pb, mas nas outras partes da planta a sua atividade aumentou. A toxicidade do Pb aumentou a concentração de NPSH na parte aérea, enquanto não

foi observada diferença significativa nas raízes. A concentração de AsA aumentou com o aumento da concentração de Pb. Nossos resultados sugerem que o Pb induziu estresse oxidativo em plantas de *P. sagittalis* e que o aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante pode ter atuado como um importante mecanismo de defesa antioxidante contra o dano oxidativo, demonstrando tolerância e possibilidade de utilização dessas plantas para a recuperação de solos contaminados por Pb.

Palavras-chave: sistema antioxidante; toxicidade por Pb; *Pluchea sagittalis*; peroxidação lipídica; eficiência do uso da água

ABSTRACT

Master Dissertation

Biological Sciences: Toxicological Biochemistry Post-Graduation
Universidade Federal de Santa Maria

EFFECTS OF LEAD ON BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN QUITOC PLANTS (*Pluchea sagittalis*): POSSIBLE PHYTOREMEDIATOR ROLE

Author: Liana Veronica Rossato

Oriented by: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-oriented by: Vera Maria Morsch

Place and date: Santa Maria, February 18, 2010.

Lead (Pb) is one of the most abundant, globally distributed toxic elements. Soil, water and air contamination by Pb leads to its accumulation in fish, mammals, and plants, and thus to human intoxication through food. Due to the hazardous effects to the ecosystem, it is necessary that contaminated soils be rehabilitated. Phytoremediation is a cheap technique that can be utilized with this objective. However, it is necessary to know about plant behavior during metal exposure. Therefore, the aim of this study was to characterize physiological and biochemical aspects of Pb toxicity in roots and leaves of different developmental stages (apex, middle, and basal regions) in *P. sagittalis* plants. Plants were exposed to five Pb levels: (0, 200, 400, 600, 1000 μM) for 30 days. Parameters such as growth, tissue Pb concentration and content, toxicity indicators (δ -aminolevulinic acid dehydratase, δ -ALA-D, activity), oxidative damage markers (TBARS, lipid peroxidation, and H_2O_2 concentration) and enzymatic (superoxide dismutase, SOD, catalase, CAT, and ascorbate peroxidase, APX) and non-enzymatic (non-protein thiols, NPSH, ascorbic acid, AsA) antioxidants were investigated. Tissue Pb concentration increased with external Pb levels causing a decrease in the consumption of nutrient solution and transpiration ratio. Moreover, root and shoot fresh weight, leaf area, shoot length and δ -ALA-D activity decreased upon addition of Pb treatments. On the other hand, dry weight of shoots and roots and chlorophyll and carotenoids concentrations were not affected. Both fresh and dry weight of roots increased at 200 μM Pb, when compared to control. The index of tolerance of roots and shoots of *P. sagittalis* decrease at higher Pb concentrations. However, the roots were more tolerant to Pb than shoots. Lipid peroxidation and hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration both in roots and leaves increased with increasing Pb levels. APX activity increased by Pb treatments in all plant parts, while SOD activity increased in leaves and it was not affected in roots. CAT activity in leaves from the apex shoot was not affected by Pb; however, in other plant parts its activity increased. Pb toxicity caused increase in NPSH concentration in shoot parts, whereas no significant difference was observed in roots. AsA concentration increased with increasing Pb levels. These results suggest that Pb induces oxidative stress in *P. sagittalis* and that elevated activity of antioxidative enzymes could serve as important components of antioxidative defense mechanism against oxidative injury, demonstrating tolerance and possible use of these plants for reclamation of Pb contaminated soils.

Keywords: antioxidant system; Pb toxicity; *Pluchea sagittalis*; lipid peroxidation; water use efficiency

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - Valores norteadores para solo e água subterrânea para detecção de contaminação por chumbo.20

MANUSCRITO

TABLE 1 - Effects of various Pb concentrations on the index of tolerance of *P. sagittalis* after 30 days exposure.....51

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - <i>Pluchea sagittalis</i> (Lam.) Cabrera.....	25
FIGURA 2 - Processos da fitorremediação do solo.....	28
FIGURA 3 - Sítios de produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	30
FIGURA 4 - Ciclo ascorbato – glutathiona.....	33
FIGURA 5 - Caminho das espécies reativas de oxigênio e sua remoção nas plantas.....	34
FIGURA 6 - Estrutura do ácido ascórbico atuando na estabilidade dos radicais livres.....	35

MANUSCRITO

FIGURE 1 - Effect of increasing Pb concentration on the Pb concentration (A) and content (B) in roots and in leaves and stem of different shoot parts (apex, middle and basal) of <i>P. sagittalis</i> plants.	48
FIGURE 2 - Effect of increasing Pb concentration on fresh (A) and dry (B) weight of different shoot parts (apex, middle and basal) and roots, leaf area (C), shoot length (D), nutrient solution consumption (E), and transpiration ratio (F) of <i>P. sagittalis</i> plants	50
FIGURE 3 - Effect of increasing Pb concentration on the δ -aminolevulinic acid dehydratase activity (A), and chlorophyll (B) and carotenoids (C) concentration in leaves of different shoot parts.....	52

FIGURE 4 - Effect of increasing Pb concentration on the hydrogen peroxide concentration (A), and on lipid peroxidation (B) in roots and leaves of different shoot parts.....53

FIGURE 5 - Effect of increasing Pb concentration on the superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase activities (A , B and C, respectively), and ascorbic acid and nonprotein thiol groups concentration (D and E, respectively) in roots and in leaves of different shoot parts.55

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA - ácido 5-aminolevulínico
APX - ascorbato peroxidase
AsA - ácido ascórbico
CAT – catalase
CETESB - Centro Tecnológico de Saneamento Básico
CuZnSOD - superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DMSO - dimetilsulfóxido
DNPH - dinitrofenilidrazina
DTNB - ácido 5-5'-ditio-bis-(nitrobenzóico)
DTT - ditioneitol
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
EROs - espécies reativas de oxigênio
FeSOD - superóxido dismutase dependente de ferro
GPX - glutationa peroxidase
GSH - glutationa reduzida
GSSG - glutationa oxidada
HCl - ácido clorídrico
HgCl₂ – cloreto de mercúrio
HNO₃ - ácido nítrico
HO• - radical hidroxila
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ - ácido sulfúrico
KI - iodeto de potássio
K₂HPO₄ - fosfato de potássio
MDA – malondialdeído
MnSOD - superóxido dismutase dependente de manganês
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NPSH - tióis não-protéicos
O₂ - oxigênio molecular
O₂^{•-} - radical superóxido
¹O₂ - radical oxigênio singleto
Pb (CH₃COO)₂·3H₂O – acetato de chumbo
PBG – porfobilinogênio
PC - fitoquelatina
pH - potencial de hidrogênio
PVP – polivinilpirrolidona
SOD - superóxido dismutase
TBA - ácido tiobarbitúrico
TCA - ácido tricloroacético
δ-ALA-D - delta-aminolevulinato desidratase
SH - grupo sulfidril

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	08
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
SUMÁRIO.....	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos.....	17
1.1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Chumbo – escala global.....	19
2.2 Chumbo no Brasil.....	20
2.3 Efeitos fisiológicos do chumbo em plantas.....	21
2.4 <i>Pluchea sagittalis</i>	24
2.5 Fitorremediação.....	26
2.6 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo.....	29
2.7 Sistema antioxidante.....	31
3 RESULTADOS.....	37
3.1 MANUSCRITO - <i>Pluchea sagittalis</i> has tolerance to Pb stress and this behavior is related to an efficient antioxidant system and improved water use efficiency. Liana Veronica Rossato, Fernando Teixeira Nicoloso, Júlia Gomes Farias, Denise Cargnelluti, Luciane Almeri Tabaldi, Fabiane Goldschmidt Antes, Valderi Luiz Dressler, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger.	38
4 DISCUSSÃO.....	69
5 CONCLUSÕES.....	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A poluição do meio ambiente por metais pesados é uma das maiores preocupações ecológicas atuais, devido ao seu impacto sobre a saúde humana através da cadeia alimentar e pela sua alta persistência no meio ambiente (PIECHALAK et al., 2002). O chumbo (Pb) é um dos maiores poluentes tanto de ecossistemas aquáticos quanto de terrestres. A contaminação do ambiente por este metal através de fontes antropogênicas, tais como uso de insumos agrícolas com teores elevados de chumbo, deposições atmosféricas, mineração e resíduos industriais, têm causado sérias preocupações devido à sua elevada toxicidade aos seres humanos e animais, mesmo em baixas concentrações (PIERANGELI, 1999). Essas fontes são responsáveis pela adição de cerca de 1,16 milhões de toneladas de chumbo por ano em ecossistemas terrestres e aquáticos (NRIAGU, 1989).

Em vista da crescente contaminação dos solos por Pb e da expansão da contaminação a outros ecossistemas, é importante estabelecer metodologias para a reabilitação destas áreas contaminadas. Muitas técnicas são aplicadas para remoção ou atenuação dos metais pesados. As técnicas atuais de remediação baseiam-se em processos de engenharia, apresentando custos elevados e de difícil aplicação (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). Em contraste, o uso de plantas para remover os metais pesados em solos contaminados, conhecida como “fitorremediação”, oferece vantagens econômicas e ambientais além de ser uma técnica promissora (SALT et al., 1995). O sucesso da fitorremediação depende da capacidade da planta em captar, translocar e acumular o metal pesado na parte aérea sem que o seu crescimento e desenvolvimento sejam afetados (XIONG, 1997).

Entretanto, o aumento dos níveis de Pb no solo pode induzir a uma série de efeitos adversos no crescimento e no metabolismo das plantas (SINGH et al., 1997; SHARMA & DUBEY, 2005) através da inibição de atividades enzimáticas (ISLAM et al., 2008; XIAO et al., 2008a; GUPTA et al., 2009), alteração na taxa fotossintética (XIAO et al., 2008a), redução da absorção de água, nutrientes minerais e da transpiração (WIERZBICKA, 1995; SINHA et al., 2006; ISLAM et al., 2008),

mudanças no “status” hormonal (SHARMA & DUBEY, 2005) e aumento da peroxidação lipídica (XIAO et al., 2008b; GUPTA et al., 2009).

A exposição das plantas a uma condição de estresse pode intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FOYER et al., 1994). As EROs, tais como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot), que em condições fisiológicas normais são produzidos em baixa quantidade em reações normais do metabolismo, tal como na fotossíntese e respiração, podem causar danos a biomoléculas como lipídios de membrana, proteínas, pigmentos fotossintéticos e ácidos nucleicos (MITTLER, 2002).

Entretanto, as plantas desenvolveram uma variedade de estratégias para prevenir a acumulação excessiva de metais nas células e/ou transformar estes metais em formas menos tóxicas (SINGH et al., 1997). O primeiro passo é evitar a entrada do metal na célula através da exclusão e/ou através da ligação à parede celular. Dentro da célula, o metal pode ser detoxificado através da ligação a outros ligantes como ácidos orgânicos, aminoácidos (cisteína e prolina), glutathione (GSH) ou fitoquelatinas (PCs) (MISHRA et al., 2006). Para o Pb, a ligação à parede celular é um dos principais mecanismos de detoxificação (ANTOSIEWICZ & WIERZBICKA, 1999). No entanto, quando estes mecanismos de defesa não são suficientes para evitar os danos provocados pelo Pb causando o estresse oxidativo, outros mecanismos antioxidantes são acionados (MISHRA et al., 2006). O sistema antioxidante é composto por antioxidantes enzimáticos [superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1), catalase (E.C. 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (E.C. 1.11.1.11), etc] e não enzimáticos [ácido ascórbico, glutathione reduzida (GSH), carotenóides e outros grupos tiólicos não protéicos] que normalmente mantêm um balanço de EROs dentro das células (FOYER et al., 1994; CROSS et al., 1998).

A capacidade do sistema antioxidante de detoxificar as EROs está intimamente ligada à tolerância das plantas aos metais pesados (SCHÜTZENDÜBEL & POLLE, 2002). Nos últimos anos, muitas espécies de plantas estão sendo identificadas como hiperacumuladoras, tendo a capacidade de acumular grandes concentrações de metais pesados, sem impacto no seu crescimento e desenvolvimento (HUANG & CUNNINGHAM, 1996).

A distribuição dos metais absorvidos entre os órgãos da planta é muito diferenciada (BRUNE et al., 1994), podendo depender da espécie e do metal

utilizado. A distribuição do metal na planta está, de certo modo, relacionada com a absorção e translocação de cada metal e pode ser um mecanismo de tolerância (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

A *Pluchea sagittalis* é uma espécie comum da região tropical, sendo facilmente encontrada em vários países da América do Sul, e amplamente distribuída por todo o Brasil (DALPIAZ & RITTER, 1998).

Esta espécie pode apresentar um possível papel fitorremediador, pois em um trabalho realizado por Sampanpanish et al. (2006), ao avaliarem um total de seis espécies de plantas daninhas visando à escolha destas para emprego em programas de fitorremediação em áreas contaminadas com cromo, verificaram que uma espécie do gênero *Pluchea* (*P. indica*) acumulou e translocou grandes quantidades de cromo em seus tecidos, cerca de 180, 86 e 90 mg/kg na raiz, caule e folha, respectivamente, podendo ser utilizada como fitoacumuladora em solos contaminados com cromo.

O uso de plantas para extrair o Pb de solos contaminados requer um melhor entendimento dos mecanismos de captação, translocação e acumulação pela planta (HUANG & CUNNINGHAM, 1996), sendo que a hiperacumulação é regulada por processos fisiológicos, bioquímicos e genéticos da planta (BAKER, 1987) sendo necessário ter um melhor entendimento desses processos. No entanto, há poucas informações acerca da toxicologia do Pb e sobre os mecanismos pelo qual esse elemento produz estresse oxidativo nas plantas de *P. sagittalis*. Deste modo, os objetivos do presente trabalho foram:

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar os efeitos do chumbo sobre aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos em diferentes partes da planta de *Pluchea sagittalis*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as alterações no crescimento, e determinar o conteúdo de chumbo absorvido pelas plântulas de *P. sagittalis* após exposição ao chumbo.

- Avaliar a atividade da enzima delta-ALA-D e o conteúdo de clorofila e carotenóides em folhas de diferentes partes da parte aérea (apical, mediana e basal) de plantas de *P. sagittalis* após exposição ao chumbo.

- Determinar os níveis de peroxidação lipídica, o conteúdo de peróxido de hidrogênio em raiz e em folhas de diferentes partes da parte aérea (apical, mediana e basal) de plantas de *P. sagittalis* após exposição ao chumbo.

- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase) e os níveis de antioxidantes não-enzimáticos (carotenóides, ácido ascórbico e tióis não-protéicos) em raiz e em folhas de diferentes partes da parte aérea (apical, mediana e basal) de plantas de *P. sagittalis* após exposição ao chumbo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Chumbo - escala global

O chumbo (Pb) é um elemento metálico sólido cinza azulado conhecido há séculos como potencialmente tóxico. Ele ocorre naturalmente nos solos e é um constituinte essencial de muitos minerais, sendo encontrado na crosta terrestre em uma concentração de 17 mg kg^{-1} (BOSSO & ENZWEILER, 2008). A galena (PbS) é o principal mineral de chumbo. O chumbo metálico é produzido por oxidação da galena, seguida pela redução do litargírio (PbO) formado. Alguns minerais importantes de chumbo são formados por transformação da galena. Exemplos são a reação com águas carbonatadas para formar cerussita (PbCO_3), a oxidação que produz a anglesita (PbSO_4) e a reação com fosfatos que resulta na piromorfita [$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$ onde $\text{X} = \text{OH}^-$, F^- , Br^- ou Cl^-] (BOSSO & ENZWEILER, 2008).

O aporte antropogênico do Pb ocorre através do uso de insumos agrícolas com teores elevados deste metal, deposições atmosféricas, mineração e resíduos industriais, sendo que as fontes antropogênicas são responsáveis pela adição de cerca de 1,16 milhões de toneladas de chumbo por ano em ecossistemas terrestres e aquáticos (NRIAGU, 1989).

O aumento da concentração de Pb causa sérias preocupações devido à sua elevada toxicidade aos seres humanos e animais, mesmo em baixas concentrações (PIERANGELI, 1999).

Segundo Chlopecka et al. (1996), metais originados de diferentes fontes antrópicas são relativamente mais móveis e potencialmente mais fitodisponíveis que aqueles presentes no material de origem dos solos. Entretanto, vários fatores podem controlar a biodisponibilidade do Pb no solo. A química do solo, através da presença de espécies aniônicas, as quais formam complexos com o Pb (ácidos orgânicos, matéria orgânica, fosfato, carbonato, sulfetos, cloreto, e hidróxido), concentrações de ferro e manganês, pH do solo, capacidade de troca catiônica, e condições redox determinam a extensão em que ocorrem reações como: dissolução, precipitação,

complexação e adsorção entre o Pb e as partículas do solo (RUBY et al., 1999; JIN et al., 2005).

Apesar da solubilidade e da mobilidade de Pb serem geralmente baixas, em alguns ambientes sua concentração é tão alta a ponto de colocar em risco a saúde humana, principalmente em locais próximos a mineração e indústrias que usam chumbo (WOWK, 2003).

Em uma área antiga de mineração na Malásia observou-se que frutos de manga, mamão e goiaba cultivados nessa área apresentavam concentrações de Pb acima dos níveis permitidos para alimentação, tornando-se um risco para a saúde humana (ANG & NG, 2000).

2.2 Chumbo no Brasil

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, foram identificadas mais de 217 áreas de contaminação por metais pesados (BRASIL, 2006). Áreas contaminadas por chumbo (Pb) são encontradas em todo o país, mas principalmente no estado de São Paulo. As principais fontes de contaminação antrópica de Pb no Brasil ocorrem através de indústrias de baterias, de pigmentos, de cerâmica e de plástico (PAOLIELLO & CAPITANI, 2007).

De acordo com trabalho desenvolvido pela CETESB (Centro Tecnológico de Saneamento Básico) em 2001, foram estabelecidos critérios, valores e padrões como referência para problemas de contaminação de solo e águas subterrâneas (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores norteadores para solo e água subterrânea para detecção de contaminação por chumbo.

Referência	Solo (mg kg ⁻¹ de peso seco)			Água subterrânea (µg.L ⁻¹)	
	Prevenção	Intervenção		Intervenção	
		Agrícola	Residencial		Industrial
17	72	180	300	900	10

Fonte: CETESB (2005).

- Valor de Referência (R) de qualidade: reflete o teor natural médio do elemento para um solo sob condições naturais, indicando a não-contaminação.
- Valor de Prevenção (P): indica possibilidade de alteração prejudicial à qualidade dos solos, sendo utilizado em caráter preventivo; excedendo-se no solo, obrigatoriamente deverá ser feito o monitoramento dos impactos que venham a ocorrer.
- Valor de Intervenção (I): indicam a concentração limite em que acima destes existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana.

Em estudos relacionados à contaminação por Pb na região sudeste do Brasil, foi encontrada em uma área contaminada por depósito inadequado de resíduos de indústrias de revestimentos cerâmicos do pólo de Santa Gertrudes (São Paulo) uma concentração de 945 mg kg^{-1} de Pb (OLIVEIRA & MORINA, 2008). Em outra área do estado de SP foi avaliado o teor de metais pesados em sedimento do rio Betari, o qual passa por diversas áreas de mineração de chumbo. Foram verificadas elevadas concentrações de Pb (7569 mg kg^{-1}) no sedimento do rio, podendo representar um fator de risco a saúde das populações ribeirinhas (COTTA et al., 2006).

Da mesma forma, no município de Bauru (SP) foi verificada a contaminação por chumbo em solos, vegetação, animais e também em crianças, nas proximidades de duas indústrias de acumuladores elétricos (MOREIRA & MOREIRA, 2004).

2.3 Efeitos fisiológicos do chumbo em plantas

Stefanov et al. (1995) relataram que as espécies de plantas diferem na sua sensibilidade aos metais. Sabe-se que a acumulação do chumbo (Pb) depende da espécie, cultivar, órgão da planta, estágio de desenvolvimento, concentração de chumbo exógena e da presença de outros íons no ambiente (SINGH et al., 1997; XU & XU, 1993).

As plantas podem absorver chumbo a partir do ar ou do solo. O chumbo presente no solo está sob a forma de sais solúveis e insolúveis ou ligado a matéria orgânica (RUBY et al., 1999). O tamanho das partículas do solo, a capacidade de troca catiônica (RUBY et al., 1999), a área de superfície radicular, a exudação de

compostos orgânicos, a micorrização (VOGEL-MIKUS et al., 2006), a taxa de transpiração e o pH do solo podem afetar a disponibilidade e a captação do Pb pelas raízes (DAVIES, 1995).

A toxicidade do chumbo pode causar vários sintomas em plantas como, por exemplo: inibição do crescimento radicular e da parte aérea, clorose e redução da área foliar (BEKIAROGLOU & KARATAGLIS, 2002; SINHA et al., 2006; DEY et al., 2007; ISLAM et al., 2008). Esses sintomas são provocados devido à inibição da atividade de enzimas, distúrbio do “status” nutricional e no balanço hídrico, mudança no padrão hormonal e alteração na permeabilidade das membranas (SHARMA & DUBEY, 2005).

Primeiramente, o Pb é captado pelo sistema radicular, sendo que a sua concentração é geralmente maior nesse órgão do que em outras partes da planta. O Pb liga-se fortemente a grupos carboxil do ácido galacturônico e glucurônico na parede celular, o que restringe o seu transporte via apoplasto (RUDAKOVA et al., 1988). Entretanto, o Pb move-se predominantemente via apoplasto atravessando o córtex e acumulando-se na endoderme (VERMA & DUBEY, 2003). Na endoderme encontra-se a estria de Caspari que é a principal barreira ao movimento do Pb através da endoderme para o cilindro central, promovendo uma diminuição da translocação desse metal para a parte aérea (SEREGIN & IVANOV, 1997). Contudo, o Pb move-se também via simplasto, atravessando a membrana plasmática principalmente através dos canais de cálcio (SINGH et al., 1997).

O acúmulo de Pb na raiz pode afetar o “status” hídrico e nutricional das plantas promovendo uma redução do crescimento tanto da raiz quanto da parte aérea (SHARMA & DUBEY, 2005).

Nas raízes, o Pb interage fortemente com os grupos sulfidrílicos das enzimas e proteínas (VAN ASSCHE & CLIJSTERS, 1990). O Pb liga-se às proteínas dos canais de água e de íons, causando uma obstrução física do fluxo de água e da captação de nutrientes (SHARMA & DUBEY, 2005) e, conseqüentemente, afetando a transpiração das plantas. Yang et al. (2004) relataram que o Pb inibe a captação de água via aquaporinas e o transporte de íons da membrana plasmática de vegetais, ocasionando redução no crescimento.

Eun et al. (2000) relataram que a inibição do crescimento radicular em plantas expostas à elevadas concentrações de Pb é devida à inibição da divisão celular em

células do ápice da raiz induzida por este metal. O Pb altera o alinhamento dos microtúbulos (YANG et al., 2000; LIU et al., 2009) e destrói os microtúbulos do fuso mitótico interrompendo a divisão celular. Além disso, foram observadas alterações cromossômicas e no nucléolo e irregularidades na mitose em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* e *Zea mays* (WIERZBICKA, 1994; JIANG & LIU, 2000; CARRUYO et al., 2008). Em células na fase de interfase observaram-se núcleos deformados e com material nuclear decomposto (WIERZBICKA, 1994). Nos tecidos, a localização do Pb é importante para a determinação da sua toxicidade (SINGH et al., 1997). O Pb acumula-se preferencialmente nos espaços intercelulares, parede celular e nos vacúolos (WIERZBICKA, 1987; ANTOSIEWICZ & WIERZBICKA, 1999; SEREGIN et al., 2002; SHARMA & DUBEY, 2005), não ocasionando nenhum efeito deletério para a planta (SINGH et al., 1997). Entretanto, pequenos depósitos desse metal podem ser encontrados no retículo endoplasmático, núcleo, cloroplastos, mitocôndrias e citoplasma (SHARMA & DUBEY, 2005) podendo interferir na homeostase celular.

Como vários metais pesados, o Pb afeta a atividade de várias enzimas de diferentes rotas metabólicas, ativando-as ou inibindo-as (SHARMA & DUBEY, 2005). Para muitas enzimas, a inibição exercida pelo Pb sobre suas atividades é resultado da interação do Pb com os grupamentos -SH que estão presentes no sítio ativo da enzima, os quais são essenciais para a sua atividade ou com grupos -SH que são necessários para a estabilização da estrutura terciária da enzima (LEVINA, 1972). Além disso, o Pb pode inibir a atividade de metaloenzimas através da substituição do metal essencial (SHARMA & DUBEY, 2005). Em plântulas de milho (*Zea mays*) expostas a diferentes concentrações de Pb (25 – 200 μM) observou-se decréscimo na atividade da enzima δ -aminolevulinato desidrogenase (enzima chave na rota de síntese da clorofila) (GUPTA et al., 2009).

Por outro lado, a atividade de várias enzimas pode ser aumentada em plantas expostas ao Pb (SHARMA & DUBEY, 2005). Esse aumento pode ocorrer devido à síntese de enzimas e a imobilização de inibidores (SHARMA & DUBEY, 2005). Plantas de arroz crescendo em areia contendo 0,5 e 1 mM de nitrato de chumbo demonstraram aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase em raízes e folhas (VERMA & DUBEY, 2003).

O Pb afeta tanto reações fotoquímicas quanto as de carboxilação, durante a fotossíntese. A fotossíntese é considerada um dos processos metabólicos mais sensíveis à toxicidade do Pb (SINGH et al., 1997). Plantas expostas ao Pb demonstraram diminuição da taxa fotossintética como consequência da ruptura da organização do cloroplasto, inibição da síntese de clorofila, plastoquinona e de carotenóides, obstrução do transporte de elétrons, inibição da atividade de enzimas do ciclo de Calvin, bem como deficiência de CO₂ como resultado do fechamento dos estômatos (SHARMA & DUBEY, 2005).

Os efeitos fitotóxicos do chumbo promovem aumento do estresse oxidativo através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SINGH et al., 1997). A produção de EROs induzida pelo Pb em plantas depende da intensidade do estresse, do tempo de exposição, da espécie e do estágio de desenvolvimento da planta (ASADA, 1994; VERMA & DUBEY, 2003).

Contudo, o estresse oxidativo induzido por Pb em plantas pode resultar em peroxidação lipídica, alteração da atividade de enzimas antioxidantes e na indução da síntese de compostos contendo tióis (VERMA & DUBEY, 2003; XIAO et al., 2008b; GUPTA et al., 2009). Estudos recentes têm demonstrado que o Pb pode induzir à expressão de genes codificadores das enzimas glutathione redutase, glutathione S-transferase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase, além de alterar a atividade de várias enzimas, tais como as enzimas catalase, glutathione redutase, superóxido dismutase e peroxidase (MALECKA et al., 2001; VERMA & DUBEY, 2003; BRUNET et al., 2009), enzimas antioxidantes responsáveis pela defesa da planta contra as EROs.

2.4 *Pluchea sagittalis*

O gênero *Pluchea*, pertencente à família Asteraceae, subfamília Asteroideae, tribo Inuleae, abrange cerca de 80 espécies (BREMER, 1994), distribuídas por toda América do Sul. A espécie *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabr. é uma erva ou arbusto perene, aromático, com altura variando de 0,3 a 2,0 m; caule robusto, foliáceo, alado e piloso. Possui folhas sésseis oblongo – laceoladas, levemente dentadas e com

base decurrente. Floresce nos meses de outubro a julho, apresentando inflorescências do tipo composta com capítulo discóides de largura maior que a altura em densas panículas de corimbos (CANCELLI et al., 2006). Os frutos são do tipo aquênio muito pequenos (LORENZI & MATOS, 2002) (Figura 1). Habita preferencialmente campos úmidos e banhados, em solos argilosos ou arenosos úmidos sendo frequentemente encontrada em arrozais (PENG et al., 1998). Essa espécie é conhecida popularmente como lucera, erva-lucera, quitoco, tabacarana e madrecravo (LORENZI & MATOS, 2002). Segundo Dalpiaz & Ritter (1998), ocorre em todo o Brasil. No Rio Grande do Sul ocorre em várias regiões, sendo mais freqüente na Depressão Central.



Figura 1 – *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. 1: ; 2: Porção do caule; 3: Folha; 4: Porção da lâmina folha; 5: Capitulo; 6: Capitulo, seção longitudinal; 7: Brácteas do involucre; 8: Flores externas; 9: Flores centrais; 10: Estames e estiletos das flores centrais; 11: Aquênio, pappus em um deles não demonstrado; 12: Aquênio, seção transversal; 13: Pappus. Barra = 2 cm. (Adaptado de PENG et al., 1998).

A literatura etnofarmacológica registra o uso desta planta como peitoral, carminativa e estomacal, com indicações para o tratamento caseiro de problemas de digestão, dispepsias nervosas, inflamação no útero, rins e bexiga, reumatismo, resfriados e como estimulante do crescimento capilar (LORENZI, 2000).

Outros estudos demonstraram que extratos de *P. sagittalis* apresentaram efeitos antiinflamatórios (PÉREZ-GARCÍA et al., 1996; PÉREZ-GARCÍA et al., 2005) e antioxidantes (PÉREZ-GARCÍA et al., 2001; FERNÁNDEZ & TORRES, 2006), anticancerígenos (QUEIROZ et al., 2001) e antimicrobianos (ZANI et al., 1994; QUEIROZ et al., 2000; SOUZA et al., 2004).

Recentemente, uma nova utilidade tem sido associada ao gênero *Pluchea*. Sampanpanish et al. (2006), ao avaliar um total de seis espécies de plantas daninhas visando à escolha destas para emprego em programas de fitorremediação em áreas contaminadas com cromo, verificou que uma espécie do gênero *Pluchea* (*P. indica*) acumulou e translocou grandes quantidades de cromo em seus tecidos, cerca de 180, 86 e 90 mg/kg na raiz, caule e folha, respectivamente, podendo ser utilizada como fitoacumuladora em solos contaminados com cromo.

Há, entretanto, um outro aspecto que deve ser observado: a alta concentração de metais em um vegetal representa um grande risco se a planta for utilizada “in natura” como agente medicinal. Sob esse prisma uma planta medicinal pode representar um risco maior à saúde do que um benefício para quem a utiliza.

Assim, estudos são necessários para desestimular o uso dessa planta como medicamento, caso ela apresente capacidade de acumular grandes quantidades de metal pesado.

2.5 Fitorremediação

As técnicas de fitorremediação, ou seja, utilização de plantas para remover, conter ou tornar inofensivos poluentes ambientais, tem sido usadas cada vez mais frequentemente em solos contaminados com poluentes orgânicos e inorgânicos (CUNNINGHAM et al., 1995). O solo contaminado é aquele que apresenta concentrações de determinado elemento químico acima do esperado em condições

naturais (McBRIDE, 1994). A contaminação por metais pesados pode ocorrer por fontes naturais ou através de atividades antropogênicas, como mineração, fundição, técnicas agrícolas (aplicação de pesticidas e fertilizantes) e resíduos urbanos como compostos de lixo e lodo de esgoto (KÄRENLAMPI et al., 2000), aumentando a concentração dos metais poluentes e ocasionando toxidez às plantas e organismos.

No solo, os metais poluentes podem ser adsorvidos às argilas ou complexados à matéria orgânica, representando uma fonte poluidora potencial (CUNNINGHAM et al., 1996).

A maioria das técnicas de remediação utiliza processos de engenharia. Essas técnicas são direcionadas para aumentar a capacidade de extração dos contaminantes, podendo ser aplicadas *in situ* ou *ex situ* (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). A remediação de áreas contaminadas por metais pesados pode ser realizada através de vários métodos, tais como escavação, incineração, extração com solvente ou oxidorredução (CUNNINGHAM et al., 1996). Entretanto, esses processos têm custos elevados e são de difícil execução (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). Em contraste, a fitorremediação apresenta um custo baixo em relação às outras formas de remediação, entre outras vantagens: (a) é uma solução permanente; (b) permite a reciclagem de metais e produção de madeira; (c) pode ser aplicada no local evitando a escavação; (d) ser utilizada em uma grande variedade de contaminantes; (e) usa energia solar, além de ter uma grande aceitação pública (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). Além disso, a vegetação reduz a erosão eólica e hídrica, contribuindo para amenizar a disseminação dos contaminantes para outras áreas, enquanto o processo de remediação está em andamento (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

Esta técnica é ideal para ser aplicada em grandes áreas com solos com contaminação média ou baixa ou quando se empregam amenizantes (EDTA, etc), ao contrário de outras técnicas, que são apropriadas para pequenas áreas com altos níveis de contaminação (WATANABE, 1997).

A fitorremediação pode ser classificada, dependendo da técnica a ser empregada, da natureza química ou da propriedade do poluente e baseada nos processos fisiológicos da planta em fitoestabilização e fitodescontaminação (Figura 2).

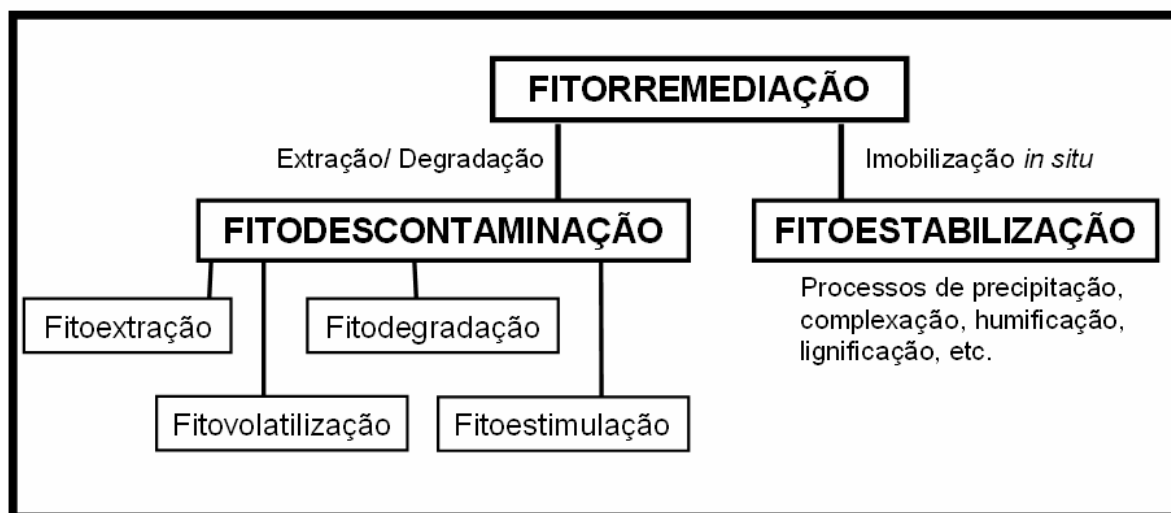


Figura 2 – Processos da fitorremediação do solo. Fonte: Accioly & Siqueira (2000).

- **Fitoestabilização:** visa reduzir a biodisponibilidade dos contaminantes, prevenindo a sua entrada nas águas subterrâneas ou na cadeia alimentar através da imobilização do contaminante no sistema solo-plantas. Os processos de fitoestabilização envolvem a imobilização no solo, humificação e lignificação nos tecidos vegetais (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).
- **Fitodescontaminação:** visa reduzir a concentração dos contaminantes do solo e da água a um nível aceitável, através da ação direta das plantas, da degradação do contaminante pela microflora e/ou da associação destes. Os processos que estão incluídos na descontaminação do solo incluem (ACCIOLY & SIQUEIRA 2000):
 - Fitoextração:* nesse processo o contaminante é absorvido, translocado e acumulado na parte aérea (ACCIOLY & SIQUEIRA 2000);
 - Fitovolatilização:* o contaminante é absorvido pela planta ou pela microbiota associada, passa por diversos processos metabólicos, sendo liberado na superfície das folhas (RASKIN et al., 1997; ACCIOLY & SIQUEIRA 2000);
 - Fitodegradação:* nesse processo as plantas absorvem e metabolizam o contaminante em formas menos tóxicas. Essa técnica é empregada na fitorremediação de compostos orgânicos e ocorre dentro da planta (CUNNINGHAM et al., 1996).

Fitoestimulação: durante esse processo as raízes das plantas excretam produtos estimulando o crescimento da microbiota associada e/ou os produtos excretados na rizosfera decompõem o contaminante (CUNNINGHAM et al., 1996).

De acordo com Watanabe (1997), uma planta para ser considerada hiperacumuladora deve ter as seguintes características: alta taxa de acumulação mesmo em baixas concentrações do contaminante; capacidade de acúmulo concomitante de diversos contaminantes; alta taxa de crescimento e de produção de biomassa; capacidade de absorção, concentração e tolerância ao contaminante.

Entretanto, as plantas exibem comportamentos diferenciados em relação à absorção e translocação dos metais da raiz para a parte aérea, sendo que a distribuição dos metais absorvidos é diferenciada entre os diferentes órgãos da planta (BRUNE et al., 1994), sendo necessário maior conhecimento desse aspecto em espécies destinadas à programas de remediação.

2.6 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorre normalmente durante o metabolismo nas células aeróbicas e a sua produção pode depender de diversas fontes, como por exemplo durante a respiração que ocorre nas mitocôndrias celulares, bem como nas vias relacionadas à fotossíntese nos cloroplastos (MITTLER, 2002). Recentemente, novas fontes de EROs tem sido identificadas em plantas, incluindo NADPH oxidases, amino oxidases, glicolato oxidase e peroxidases ligadas a parede celular (MITTLER, 2002; PARENT et al., 2008) (Figura 3).

Sob condições normais, a produção de EROs na célula é baixa. Entretanto muitos agentes oxidantes promovem uma disruptura da homeostase celular levando ao aumento da produção de EROs e ao estresse oxidativo (MITTLER, 2002). Nesse caso as EROs são citadas como sinalizadores de uma resposta a agentes estressores (MITTLER, 2002).

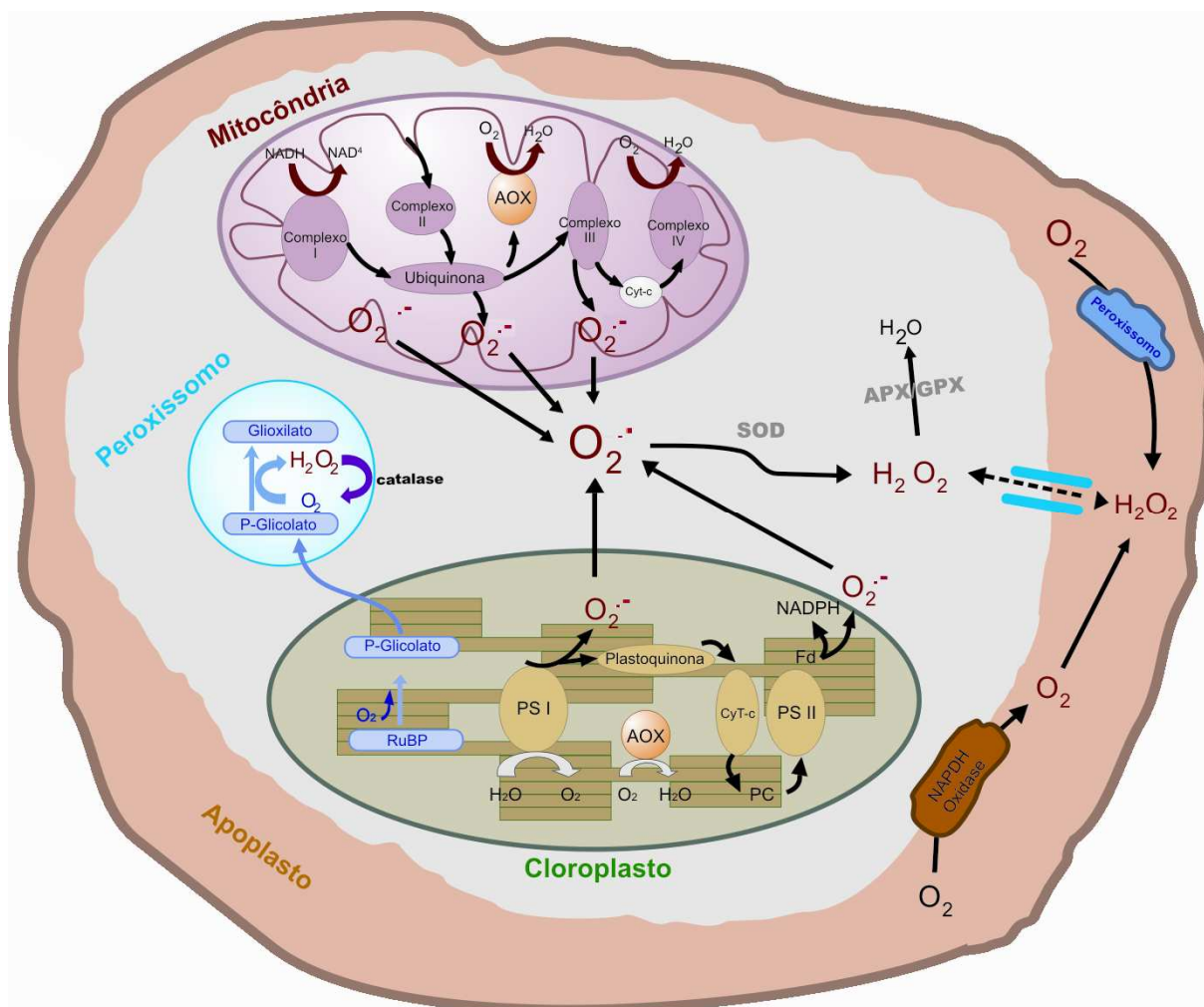


Figura 3 - Sítios de produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Adaptado de PARENT et al., 2008).

As EROs são formas parcialmente reduzidas do oxigênio atmosférico (O_2). Podem resultar a partir da excitação do O_2 para a forma de oxigênio singlete (O_2^1) ou a partir da transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 originando, respectivamente, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou um radical hidroxil (OH^{\cdot}) (GUTTERIDGE, 1995). Por apresentarem um elétron desemparelhado na sua estrutura, as EROs são instáveis, extraordinariamente reativas e não específicas, desencadeando reações peroxidativas e causando danos significativos às membranas e a outras macromoléculas essenciais, tais como os pigmentos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídios (FOYER et al., 1994; GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). A peroxidação lipídica é um dos principais efeitos ocasionados pelo aumento das EROs. Radicais altamente reativos como o OH^{\cdot} frequentemente atacam moléculas biológicas (lipídios) e

abstraem um hidrogênio (H), desencadeando a peroxidação lipídica (NIKI, 2009). A peroxidação lipídica causa danos à estrutura e funcionamento das membranas biológicas alterando a sua fluidez, inativando receptores e enzimas da membrana aumentando a permeabilidade (NIKI, 2009).

Muitos estudos têm relacionado o Pb ao estresse oxidativo, principalmente a peroxidação de lipídios (VERMA & DUBEY, 2003; DEY et al., 2007; GUPTA et al., 2009). O Pb induz a peroxidação lipídica através do aumento da produção de EROs (SHARMA & DUBEY, 2005).

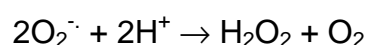
Entretanto, as plantas e todos os organismos possuem um sistema de defesa antioxidante, formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos, o qual é responsável por manter sob controle a produção de EROs, evitando os efeitos tóxicos de agentes tal como o Pb (SHARMA & DUBEY, 2005).

2.7 Sistema antioxidante

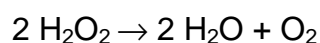
Para o combate da toxicidade do metal e proteção das membranas celulares e organelas dos efeitos danosos das EROs, as células das plantas possuem um sistema de defesa antioxidante, formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos que normalmente mantêm um balanço de EROs dentro das células. Dentre os antioxidantes enzimáticos estão a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) e a ascorbato peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11), bem como antioxidantes de baixo peso molecular não enzimáticos, como o ácido ascórbico, a glutathiona reduzida (GSH) e outros grupos tiólicos não protéicos que removem tipos diferentes de EROs (FOYER et al., 1994) e protegem a célula contra a injúria e a disfunção dos tecidos (MIQUEL, 1989). Além disso, em plantas, os carotenóides também possuem efeito antioxidante importante no sistema fotossintético (SALGUERO et al., 2003).

A enzima superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) constitui a primeira linha de defesa contra as EROs (ALSCHER et al., 2002). São metaloenzimas responsáveis pela dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Tem sido demonstrado que os fosfolipídios das membranas celulares são

impermeáveis as moléculas de O_2^- , sendo de crucial importância que as SODs estejam presentes nos compartimentos onde O_2^- é formado. Existem diferentes isoenzimas de SOD, geralmente presentes em compartimentos celulares distintos: Fe-SOD (localizada no cloroplasto), Mn-SOD (localizada na mitocôndria e peroxisomo) e Cu-Zn-SOD (localizada no peroxisomo, cloroplasto, citosol e possivelmente no espaço extracelular) (ALSCHER et al., 2002). A reação geral da SOD pode ser descrita:



O H_2O_2 gerado na conversão de superóxidos pela SOD também é tóxico e deve ser detoxificado pela catalase e/ou peroxidases. A enzima catalase (CAT) é uma ferrihemoenzima presente principalmente nos peroxissomos, podendo ser encontrada em menor quantidade na mitocôndria, no cloroplasto e no retículo endoplasmático. A catalase presente nas diferentes organelas é responsável pela remoção do H_2O_2 durante a fotorrespiração, β -oxidação dos ácidos graxos e durante o estresse oxidativo (INZÉ & MONTAGU, 1995). A CAT é uma enzima tetrâmerica cuja principal função é dismutar o H_2O_2 formando H_2O e O_2 (FRIDOVICH, 1998). É a única enzima que degrada H_2O_2 sem consumir equivalentes redutores, sendo responsável pela remoção de peróxidos quando em excesso devido a sua baixa afinidade ao H_2O_2 (MITTLER, 2002). Existem três isoenzimas de CAT: CAT1, CAT2 e CAT3 (INZÉ & MONTAGU, 1995). Sua reação pode ser descrita como:



A ascorbato peroxidase (APXs) é um dos grupos mais importantes de enzimas antioxidantes, sendo encontradas cinco isoformas: citosólica, mitocondrial, peroxissomal, glioxissomal e cloroplástica. A APX é uma proteína que contém ferro no seu grupo prostético heme (DABROWSKA et al., 2007). A APX é uma enzima chave no ciclo da glutathiona – ascorbato que reduz o H_2O_2 até H_2O usando o ascorbato como doador de elétrons, com concomitante geração de deidroascorbato. Este é reciclado a ascorbato usando a glutathiona reduzida (GSH) como doadora de elétrons. A glutathiona oxidada (GSSG) formada é convertida a glutathiona reduzida

pela enzima glutationa redutase (GR) (NOCTOR & FOYER, 1998). As figuras 4 e 5 representam as vias de detoxificação do H_2O_2 .

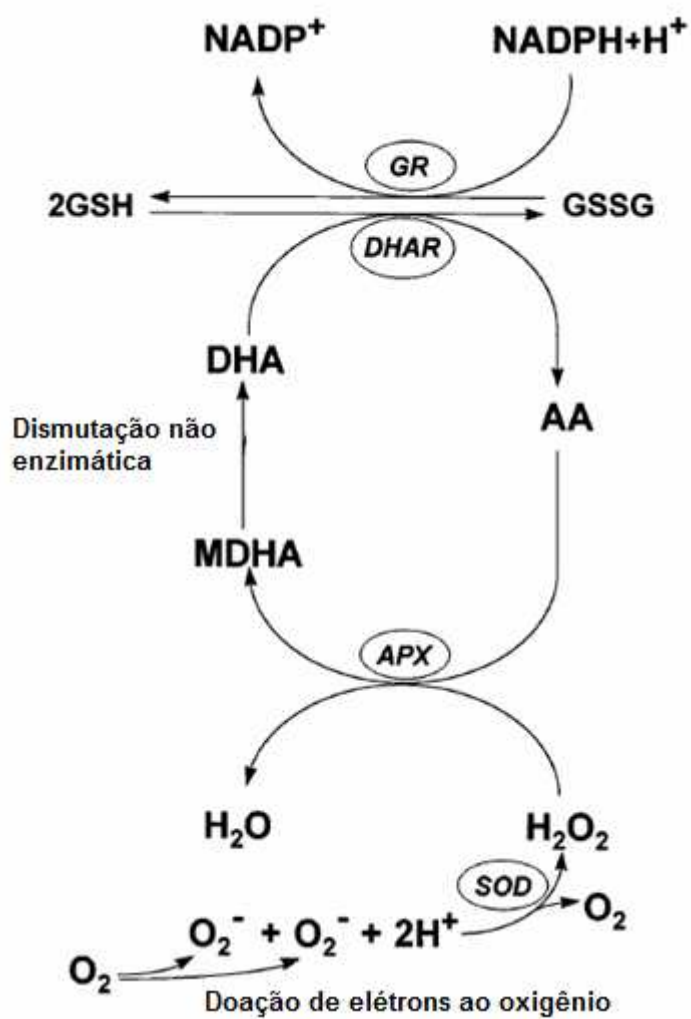


Figura 4 - Ciclo ascorbato – glutathiona. (Adaptado de Noctor & Foyer, 1998)

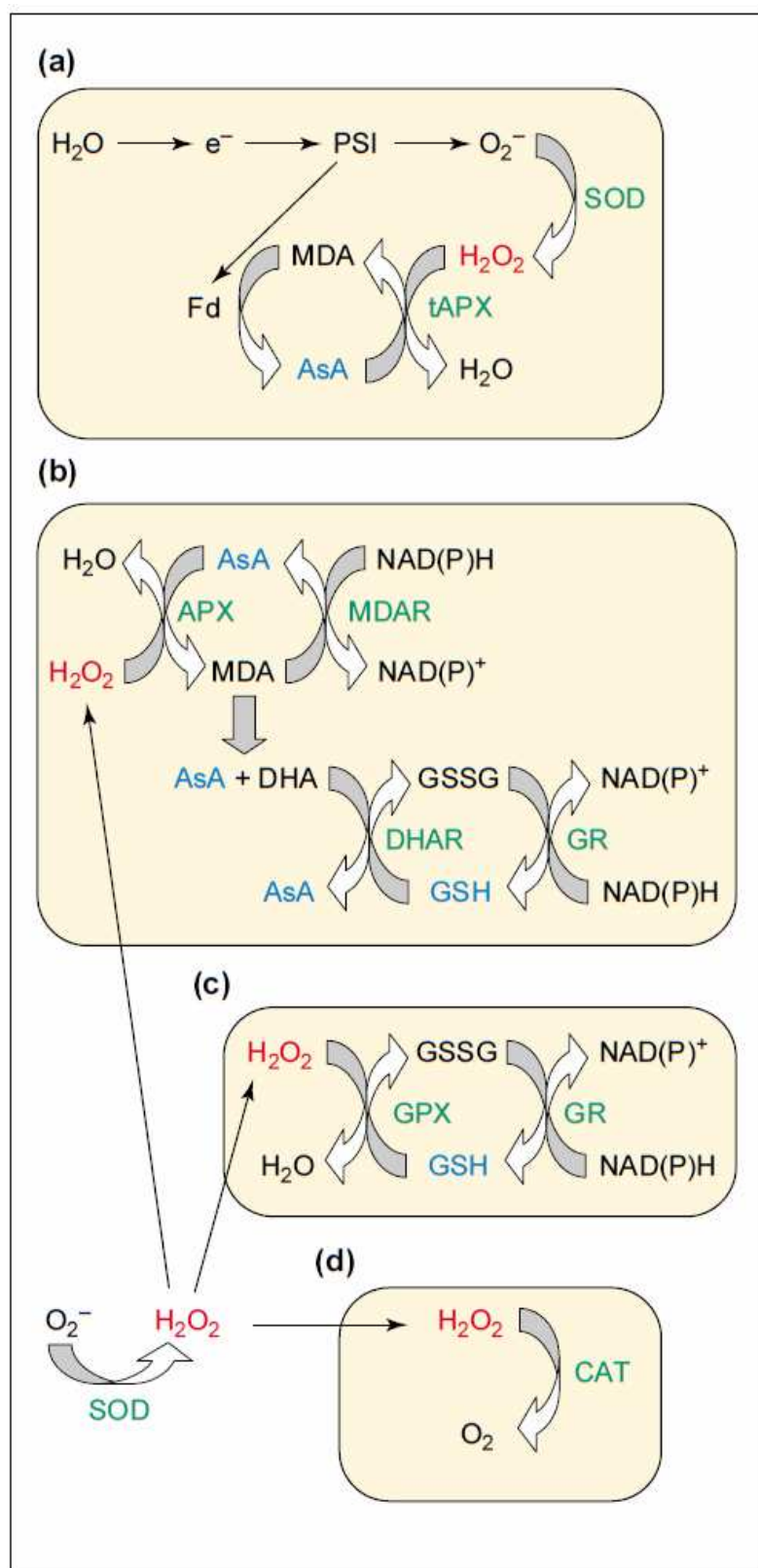


Figura 5 - Caminho das espécies reativas de oxigênio e sua remoção nas plantas (a) Ciclo água-água, (b) Ciclo ascorbato glutatona, (c) Ciclo glutatona peroxidase, (d) Catalase. As EROs estão indicadas em vermelho, antioxidantes em azul e enzimas removedoras de EROs em verde (Adaptado de Mittler, 2002)

Aliado ao sistema de defesa antioxidante enzimático, os organismos também dispõem de defesas antioxidantes não-enzimáticas que são de fundamental importância para as células. Compõem esse sistema não enzimático o ácido L-ascórbico (Figura 6), os grupos tióis não protéicos, entre estes a glutathiona, juntamente com os carotenóides.

O ácido L-ascórbico é o mais abundante antioxidante nas plantas (SMIRNOFF, 2000). Sendo encontrado em concentrações milimolar tanto em tecidos fotossintéticos como não fotossintéticos (NOCTOR & FOYER, 1998), sendo que as maiores concentrações são encontradas nos tecidos fotossintéticos, tecidos jovens e em tecidos em crescimento, como os meristemas (HOREMANS et al., 2000). O ácido L-ascórbico é um antioxidante primário que reage diretamente com radicais hidroxil, superóxido e oxigênio singlete (NOCTOR & FOYER, 1998). Além de apresentar atividade antioxidante, o ácido L-ascórbico também está envolvido na regulação da fotossíntese, na divisão e na expansão celular (HOREMANS et al., 2000).

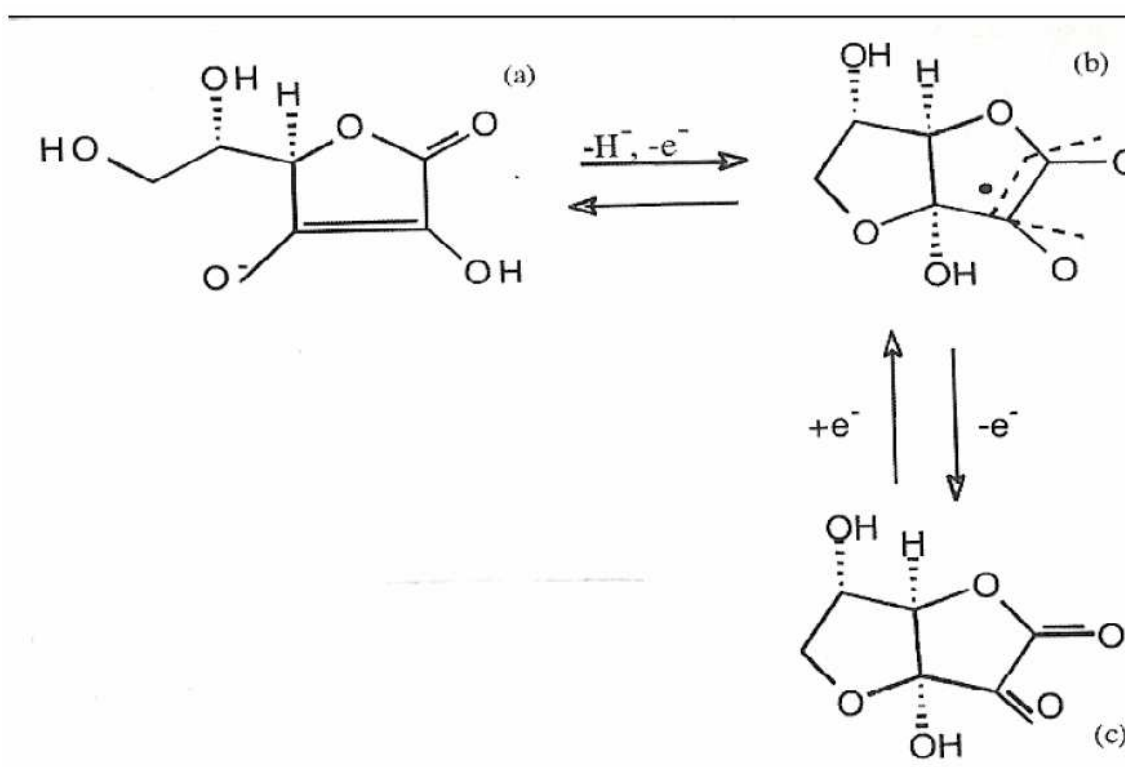


Figura 6 – Estrutura do ácido ascórbico atuando na estabilidade dos radicais livres. a) ascorbato, b) radical ascorbil, c) ácido ascórbico. Adaptado de Machlin (1991).

Dentro do grupo de tióis não protéicos, a glutathiona (GSH) é a forma predominante, sendo encontrada em altas concentrações nos cloroplastos e em outros compartimentos celulares [1-5 mM] (NOCTOR & FOYER, 1998). A GSH pode atuar diretamente ou indiretamente na redução da maioria das espécies reativas de oxigênio sendo de crucial importância para a defesa contra o estresse oxidativo. A GSH pode reduzir as EROs diretamente ou através do ciclo ascorbato-glutathiona (NOCTOR et al., 1998). Além disso, a GSH pode reagir quimicamente com o oxigênio singlete, com o radical superóxido e hidroxila, funcionando como removedor de EROs (NOCTOR & FOYER, 1998). É também a precursora de fitoquelatinas, as quais são peptídeos que tem a capacidade de se complexar com os metais, promovendo a sua detoxificação (ASADA, 1994). Estudos mostram que níveis elevados de GSH celular estão associados à tolerância à metais pesados em plantas (CHEN & GOLDSBROUGH, 1994) ocorrendo um acúmulo de GSH em resposta à geração de EROs (NOCTOR & FOYER, 1998).

Os carotenóides também agem na proteção celular. Em relação às suas propriedades antioxidantes, os carotenóides podem atuar de várias maneiras: reagindo com os produtos da peroxidação lipídica interrompendo a reação em cadeia; removendo o oxigênio singlete e dissipando a energia na forma de calor; reagindo com a clorofila tripleto ou excitada prevenindo a formação de oxigênio singlete (SALGUERO et al., 2003).

Assim, a capacidade do sistema antioxidante de detoxificar as EROs está intimamente ligada à tolerância das plantas aos metais pesados (SCHÜTZENDÜBEL & POLLE, 2002).

3 RESULTADOS

3.1 MANUSCRITO:

***Pluchea sagittalis* has tolerance to Pb stress and this behaviour is related to an efficient antioxidant system and improved water use efficiency**

Liana Veronica Rossato, Fernando Teixeira Nicoloso, Júlia Gomes Farias, Denise Cagnelluti, Luciane Almeri Tabaldi, Fabiane Goldschmidt Antes, Valderi Luiz Dressler, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger.

***Pluchea sagittalis* has tolerance to Pb stress and this behaviour is related to an efficient antioxidant system and improved water use efficiency**

Liana Veronica Rossato^{2,4}, Fernando Teixeira Nicoloso^{1,3}, Júlia Gomes Farias¹, Denise Cargnelluti², Luciane Almeri Tabaldi², Fabiane Goldschmidt Antes², Valderi Luiz Dressler², Vera Maria Morsch^{2,4}, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{2,4}.

Departamento de Biologia¹, Química², Programa de Pós-Graduação em Agronomia³ e Bioquímica Toxicológica⁴, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Abstract

This work aimed to study the process of stress adaptation in root and leaves of different developmental stages (apex, middle and basal regions) of *P. sagittalis* grown under hydroponic conditions under exposure to lead (Pb). Plants were exposed to five Pb levels: 0, 200, 400, 600, and 1000 μM for 30 days. Pb concentration and content in roots, stems, and leaves in different developmental ages increased with external Pb level. Pb concentration and content were higher in roots than in shoot parts. Consumption of nutrient solution and transpiration ratio were both decreased by Pb treatments. Leaf fresh weight, leaf area, and shoot length decreased linearly upon addition of Pb treatments. On the other hand, dry weight of shoot parts and roots did not decrease upon addition of Pb treatments. Both fresh and dry weight of roots increased at 200 μM Pb when compared to control. The index of tolerance of roots and shoots of *P. sagittalis* decrease at higher Pb concentrations. However, the roots were more tolerant to Pb than shoots. δ -aminolevulinic acid dehydratase activity was decreased by Pb treatments, whereas carotenoid and chlorophyll concentrations were not affected. Lipid peroxidation and hydrogen peroxide concentration both in roots and leaves increased with increasing Pb levels. Pb treatments increased ascorbate peroxidase activity in all plant parts, while superoxide dismutase activity increased in leaves and decreased in roots. Catalase activity in leaves from the apex shoot was not affected by Pb, but in other plant parts it was increased. Pb toxicity caused increase in non-protein thiol groups

concentration in shoot parts, whereas no significant difference was observed in roots. Ascorbic acid concentration increased with increasing Pb level. In conclusion, Pb stress triggered a defense mechanism against oxidative stress in *P. sagittalis* showing a protective effect against ROS, depending on the tissue and its physiological status, demonstrating tolerance and possible use of these plants for reclamation of Pb contaminated soils.

Keywords: Antioxidant system, Pb toxicity, *Pluchea sagittalis*, Lipid peroxidation, water use efficiency

1 Introduction

Heavy metal pollution is one major ecological concern due to its impact on human health through the food chain and its high persistence in the environment (SHARMA & DUBEY, 2005). Lead (Pb) is one of the hazardous heavy metal pollutants of the environment that originates from various sources such as mining and smelting of lead-ores, burning of coal, effluents from storage battery industries, automobile exhausts, metal plating and finishing operations, fertilizers, pesticides and additives in pigments and gasoline (SHARMA & DUBEY, 2005).

Pb-contaminated soils contain Pb concentrations in the range of 400 – 800 mg kg⁻¹ soil, whereas in industrialized areas the level may reach up to 1000 mg Pb kg⁻¹ soil (ANGELON & BINI, 1992). Pb reacts with biomolecules and adversely affects different systems, such as reproductive, nervous, immune and cardio-vascular, as well as developmental processes (JOHNSON, 1998). In plants, it exerts adverse effects on morphology, growth and photosynthetic processes, water imbalance, alteration in membrane permeability and disturbs mineral nutrition (SINGH et al., 1997; SHARMA & DUBEY, 2005). However, some species of plants tolerate the presence of Pb. More interestingly, some have developed the capacity to accumulate large amounts of this element in all parts of the plant body, mostly in root tissues, a feature essential to the development of phytoremediation technologies to clean Pb contaminated sites (SINGH et al., 1997; SHARMA & DUBEY, 2005). The phytoextraction of Pb, however, is often challenged by three factors: (1) low solubility

of Pb in soils, (2) lower Pb translocation to plant parts, and (3) toxicity of Pb to plant tissues (CUNNINGHAM & BERTI, 2000).

Because of severe damages of plant growth and development, considerable attempts have been made in discovering physiological and biochemical processes contributing to the adaptation to heavy metal toxicity in plants (GRATÃO et al., 2005; SHARMA & DUBEY, 2005). At cellular level, Pb induces accumulation of reactive oxygen species (ROS) (VERMA & DUBEY, 2003) as a result of imbalanced ROS production and ROS scavenging processes by imposing oxidative stress (MITTLER et al., 2004; GUPTA et al., 2009). ROS include superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^{\bullet}), which are necessary for the correct functioning of plants; however, in excess they cause damage to biomolecules, such as membrane lipids, proteins, and nucleic acids, among others (MITTLER et al., 2004).

Plants have different defense strategies against the toxicity of heavy metals. The first defense strategy is to avoid the metal entry into the cell excluding it or binding it to a cell wall (MISHRA et al., 2006). The second defense systems constitutes of various antioxidants to combat the increased production of ROS caused by metals (REDDY et al., 2005). This system is comprised of enzymes superoxide dismutase (SOD; E.C. 1.15.1.1), ascorbate peroxidase (APX; E.C.1.11.1.11) and catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6) as well as the non-enzymic constituents α -tocopherol, carotenoids, ascorbate and reduced glutathione, which remove, neutralize, and scavenge the ROS (MITTLER et al., 2004).

The elevated activity of antioxidative enzymes could serve as an important component of the antioxidative defense mechanism against oxidative injury, increasing the tolerance of plants to Pb stress and being utilized for reclamation of Pb contaminated soils (REDDY et al., 2005). However, the response of enzymatic and non-enzymatic antioxidants to heavy metals involves attenuation of ROS and is greatly dependent on the plant species, physiological status of the tissues and culture conditions (GRATÃO et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009; GUPTA et al., 2009).

In view of this, the objective of the present study is to examine the uptake and distribution pattern of Pb and the effect of this metal on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system in different organs (roots, stems and leaves of different

developmental stages) of *P. sagittalis* plants under long exposure time (30 days) and high level of Pb (up to 1000 μM). Besides, we also checked the possible role of the antioxidant system in relation to increased tolerance of *P. sagittalis* to Pb toxicity. According to our knowledge, this is the first study on Pb toxicity inducing physiological and biochemical changes in *P. sagittalis*.

2 Materials and methods

2.1 Plant materials and growth conditions

P. sagittalis (Lam.) Cabrera plants growing in the Botanic Garden of the Universidade Federal de Santa Maria [Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil] were used in this study. Nodal segments (1.0 cm long) without leaves were micropropagated in MS medium (MURASHIGE & SKOOG, 1962), supplemented with 30 g l⁻¹ of sucrose, 0.1 g l⁻¹ of myo-inositol and 6 g l⁻¹ of agar.

2.1.1 Hydroponic experiment

Thirty-day-old plantlets grown in *in vitro* culture were transferred to *ex vitro* condition into plastic vessels (1 l) containing 950 g sand. Evaporated and transpired water was daily replaced with nutrient solution, and the moisture-holding capacity was maintained near 95%. The nutrient solution had the following composition (mg l⁻¹): 85.31 N; 7.54 P; 11.54 S; 97.64 Ca; 23.68 Mg; 104.75 K; 176.76 Cl; 0.27 B; 0.05 Mo; 0.01 Ni; 0.13 Zn; 0.03 Cu; 0.11 Mn and 2.68 Fe. The pH solution was adjusted to 5.5 \pm 0.1 with a 1 M solution of HCl or NaOH. After two months of plant acclimatization, Pb²⁺ was added to nutrient solution as Pb-acetate (Pb (CH₃COO)₂·3H₂O) at concentrations of 0 (control), 200, 400, 600 and 1000 μM . The treatments were applied daily for 30 days obtaining, respectively, final concentrations

of 0, 47, 81, 107 and 162 mg/kg Pb. After 30 days of Pb exposure, three replicates per treatment (each replicate consisted of six plants) were randomly harvested.

Both *in vitro* and *ex vitro* cultured plants were grown in a growth chamber at 25 ± 2 °C on a 16/8 h light/dark cycle with $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of irradiance provided by cold fluorescent lamps. At the end of the experiments, the plants were gently washed with distilled water and then divided into roots and shoots. The shoot was divided in three parts according to the position of leaves on the stem as follows: apex part (from the 1st to 10th leaf), middle part (from the 11th to 16th leaf), and basal part (from the 17th to the last leaf on the base of the stem). Subsequently, growth and biochemical parameters were determined. All chemicals used were of analytical grade purchased from Sigma Chemical Company (USA).

2.2 Pb determination

Pb concentration was determined in roots, leaves and stems. Dried plant tissues, between 0.01–0.25 g, were ground and digested with 5 ml of concentrated HNO₃. Sample digestion was carried out in an open digestion system, using a heating block Velp Scientific (Milano, Italy). Heating was set at 130 °C for 2 h. Plastic caps were fitted to the vessels to prevent losses by volatilization. The Pb content was determined by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-EOS), using a PerkinElmer Optima 4300 DV (Shelton, USA) equipped with a cyclonic spray chamber and a concentric nebulizer. The emission line selected was 220.353 nm. A 1000 mg l⁻¹ Pb (Merck) standard was used and reference solutions were prepared by serial dilution in 5% HNO₃ (v/v).

2.3 Growth parameters

Growth of *P. sagittalis* plants was determined by measuring the fresh and dry weight of shoot and root, shoot length and leaf area. The roots and shoots were

oven-dried at 65 °C to a constant weight for the determination of biomass. For the leaf area, two leaves for each shoot part were scanned and the area was measured using a Sigma Scan Pro v. 5.0 Jandel Scientific software. The index of tolerance (IT) was calculated according to Wu and Antonovics (1976) as below:

$$IT = \frac{\text{mean dry wt produced in solution with lead}}{\text{mean dry wt produced in solution without lead}}$$

2.4 Carotenoid and chlorophyll concentrations

Carotenoid and chlorophyll concentrations were determined following the method of Hiscox & Israelsstam (1979) and estimated with the help of Lichtenthaler's formula (LICHTENTHALER, 1987). Briefly, 0.1 g chopped fresh leaves of different shoot parts (apex, middle and basal) was incubated at 65 °C in dimethylsulfoxide (DMSO) until the tissues were completely bleached. Absorbance of the solution was then measured at 470, 645 and 663 nm to determine the contents of carotenoids, chlorophyll a, and chlorophyll b, respectively.

2.5 Delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D; E.C. 4.2.1.24) activity

The leaves of different shoot parts (apex, middle and basal) were homogenized in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0, at a proportion of 1:2 (w/v). The homogenate was centrifuged at 6,000 rpm at 4 °C for 10 min, using a Hitachi himac CR 21E (Tokyo, Japan). The supernatant was pre-treated with 1% Triton X-100 and 0.5 mM dithiotreitol (DTT). δ -ALA-D activity was assayed as described by Morsch et al. (2002) by measuring the rate of porphobilinogen formation. The incubation medium for the assays contained 100 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0 and 3.6 mM ALA. Incubation was started by adding 100 μ l of the tissue preparation to a final volume of 400 μ l and stopped by adding 350 μ l of the mixture containing 10% trichloroacetic

acid (TCA) and 10 mM HgCl₂. The product of the reaction was determined with the Ehrlich reagent at 555 nm using a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SASSA, 1982) for the Ehrlich-porphobilinogen salt.

2.6 Estimation of lipid peroxidation

The level of lipid peroxidation products was estimated following the method El-Moshaty et al. (1993) by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) as an end product of lipid peroxidation by reaction with thiobarbituric acid (TBA). Both root and leaf (apex, middle and basal) samples were homogenized at 4 °C in 10 ml of 0.2 M citrate-phosphate (pH 6.5) containing 0.5 % Triton X-100 at a proportion of 1:10 (w/v). The homogenate was filtered through two layers of paper and centrifuged for 15 min at 20,000 g, using a Hitachi himac CR 21E (Tokyo, Japan) One milliliter of the supernatant fraction was added to an equal volume of 20% (w/v) TCA containing 0.5% (w/v) TBA. The mixture was heated at 95 °C for 40 min and then quickly cooled in ice bath for 15 min. After centrifugation at 10,000 g for 15 min, using a MTD III PLUS (Servilab), the absorbance of the supernatant was measured at 532 nm. A correction of non-specific turbidity was made by subtracting the absorbance value taken at 600 nm.

2.7 Determination of hydrogen peroxide (H₂O₂)

The H₂O₂ concentration of *P. sagittalis* was determined according to Loreto & Velikova (2001). Approximately 0.1 g of root and leaf (apex, middle and basal) samples were homogenized in 2 ml of 0.1% (w/v) TCA. The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4 °C [Hitachi himac CR 21E (Tokyo, Japan)] and 0.5 ml of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 1 ml of 1M KI. The H₂O₂ concentration of supernatant was evaluated by comparing its absorbance at 390 nm with a standard calibration curve.

2.8 Enzyme activities of antioxidant systems

Fresh root and leaf samples of different shoot parts (apex, middle and basal) were used for enzyme analysis. One gram tissue homogenized in 3 ml of 0.05M sodium phosphate buffer (pH 7.8) including 1 mM EDTA and 2% (w/v) PVP. The homogenate was centrifuged at 13,000 *g* for 20 min at 4 °C, using a Hitachi himac CR 21E (Tokyo, Japan). Supernatant was used for enzyme activity and protein content assays (ZHU et al., 2004).

Catalase (CAT) activity was assayed following the modified Aebi (1984) method. The activity was determined by monitoring the disappearance of H₂O₂ measuring the decrease in absorbance at 240 nm of a reaction mixture with a final volume of 2 ml containing 15 mM H₂O₂ in potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 30 µL extract.

Ascorbate peroxidase (APX) was measured according to Zhu et al. (2004). The reaction mixture, at a total volume of 2 ml, contained 25 mM (pH 7.0) sodium phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 0.25 mM ascorbate, 1.0 mM H₂O₂ and 100 µl enzyme extract. H₂O₂-dependent oxidation of ascorbate was followed by a decrease in the absorbance at 290 nm ($\epsilon = 2.8 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed according to Misra & Fridovich (1972). The assay mixture consisted of a total volume of 1 ml, containing glycine buffer (pH 10.5), 1 mM epinephrine and enzyme material. Epinephrine was the last component to be added. The adrenochrome formation in the next 4 min was recorded at 480 nm in UV- Vis spectrophotometer [Hitachi U – 2001(Shimadzu®)]. One unit of SOD activity is expressed as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of epinephrine oxidation in the experimental conditions. This method is based on the ability of SOD to inhibit the autoxidation of epinephrine at an alkaline pH. Since the oxidation of epinephrine leads to the production of a pink adrenochrome, the rate of increase of absorbance at 480 nm, which represents the rate of autoxidation of epinephrine, can be conveniently followed. SOD has been found to inhibit this radical-mediated process.

2.9 Ascorbic acid (AsA) and Non-protein thiol groups (NPSH) concentrations

Both root and leaf samples of different shoot parts (apex, middle and basal) were homogenized in a solution containing 50 mM Tris-HCl and 10% Triton X-100 (pH 7.5), centrifuged at 6,800 g for 10 min, using a MTD III PLUS (Servilab). To the supernatant obtained was added 10% TCA at proportion 1:1 (v/v) followed by centrifugation (6,800 g for 10 min) to remove protein. The supernatant was used to determine AsA and NPSH contents.

AsA determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001). An aliquot of the sample (300 μ l) was incubated at 37 °C in a medium containing 100 μ l TCA 13.3%, 100 μ l deionized water and 75 μ l DNPH. After 3 h, 500 μ l of 65% H₂SO₄ was added and samples were read at 520 nm. A standard curve was constructed using L(+) AsA.

NPSH concentration in *P. sagittalis* plants was measured spectrophotometrically with Ellman's reagent (ELLMAN, 1959). An aliquot of the extract sample (400 μ l) was added in a medium containing 550 μ l 1M Tris-HCl (pH 7.4). Reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM 5-5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (5 μ l). A standard curve using cysteine was used to calculate the content of thiol groups in samples.

2.10 Protein determination

To all the enzyme assays, protein was measured by the Comassie Blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.11 Statistical analysis

The experiments were performed using a randomized design. The analyses of variance were computed on statistically significant differences determined based on the appropriate *F*-tests. Results are presented as means \pm S.D. of at least three independent replicates. The mean differences were compared using the Tukey test ($P < 0.05$).

3 Results

3.1 Lead concentration and content in plant tissues

Pb concentration and content in both roots and shoots (stem and leaves) increased with Pb treatments (Fig. 1A, B). However, most of the Pb taken up by the plants was accumulated in roots (Fig. 1B).

In general, both leaves and stem from the basal part of the shoot showed greater Pb concentration and content than those from the apex and middle parts. However, this pattern was more evident in leaves. Pb concentration and content in stem from both apex and middle shoot parts were lower at 1000 μ M Pb than at 600 μ M Pb. On the other hand, this behavior was not observed in the leaves from the same shoot parts.

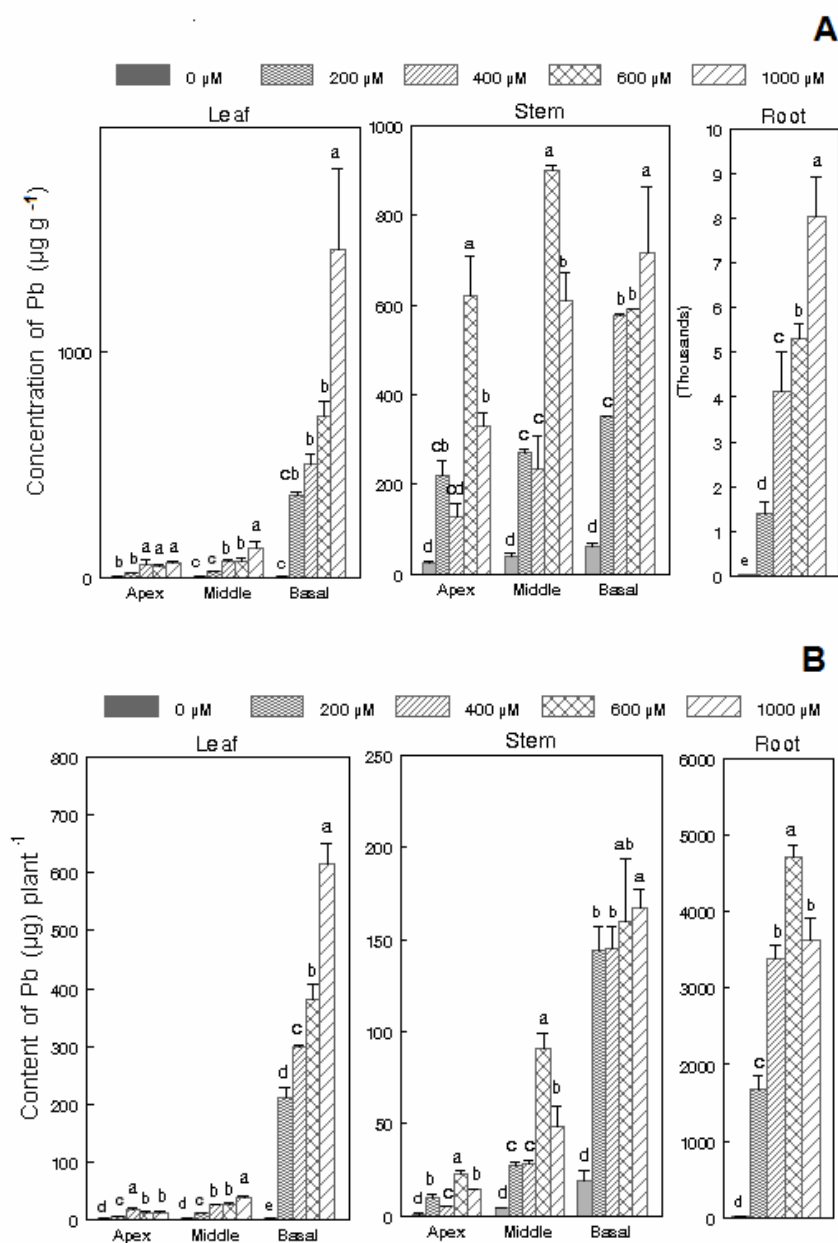


Figure 1. Effect of increasing Pb concentration on the Pb concentration (A) and content (B) in roots as well as in leaves and stems of different shoot parts (apex, middle and basal) of *P. sagittalis* plants. Data represent the mean \pm S.D. of three replicates. Different letters indicate significant differences among the Pb concentrations in the same plant part ($p < 0.05$).

3.2 Effects of Pb on growth parameters

There was a clear decrease in shoot fresh weight upon addition of Pb levels (Fig. 2A). On the other hand, root fresh weight increased at 200 μM Pb and decreased at 1000 μM Pb, when compared to the control.

Shoot dry weight, regardless of the developmental stage of leaves and stem, was not significantly affected by Pb treatments. Conversely, root dry weight increased at 200 μM Pb and was not altered at other Pb levels, when compared to control (Fig. 2B).

Leaf area from different shoot parts was reduced with increasing Pb concentration (Fig. 2C). Despite the decreased shoot length with the increase of Pb concentration, it was only significantly reduced upon addition of Pb levels above 400 μM (Fig. 2D).

The consumption of nutrient solution by plant per day decreased with increasing Pb levels (Fig. 2E). In contrast, the transpiration ratio was decreased by Pb treatments, when compared to control, being that this decrease did not follow a linear pattern as observed for the consumption of nutrient solution per plant. The lowest transpiration ratio was obtained at 200 and 600 μM Pb (32% lower than the control), whereas it decreased only 22% at 400 and 1000 μM Pb (Fig. 2F).

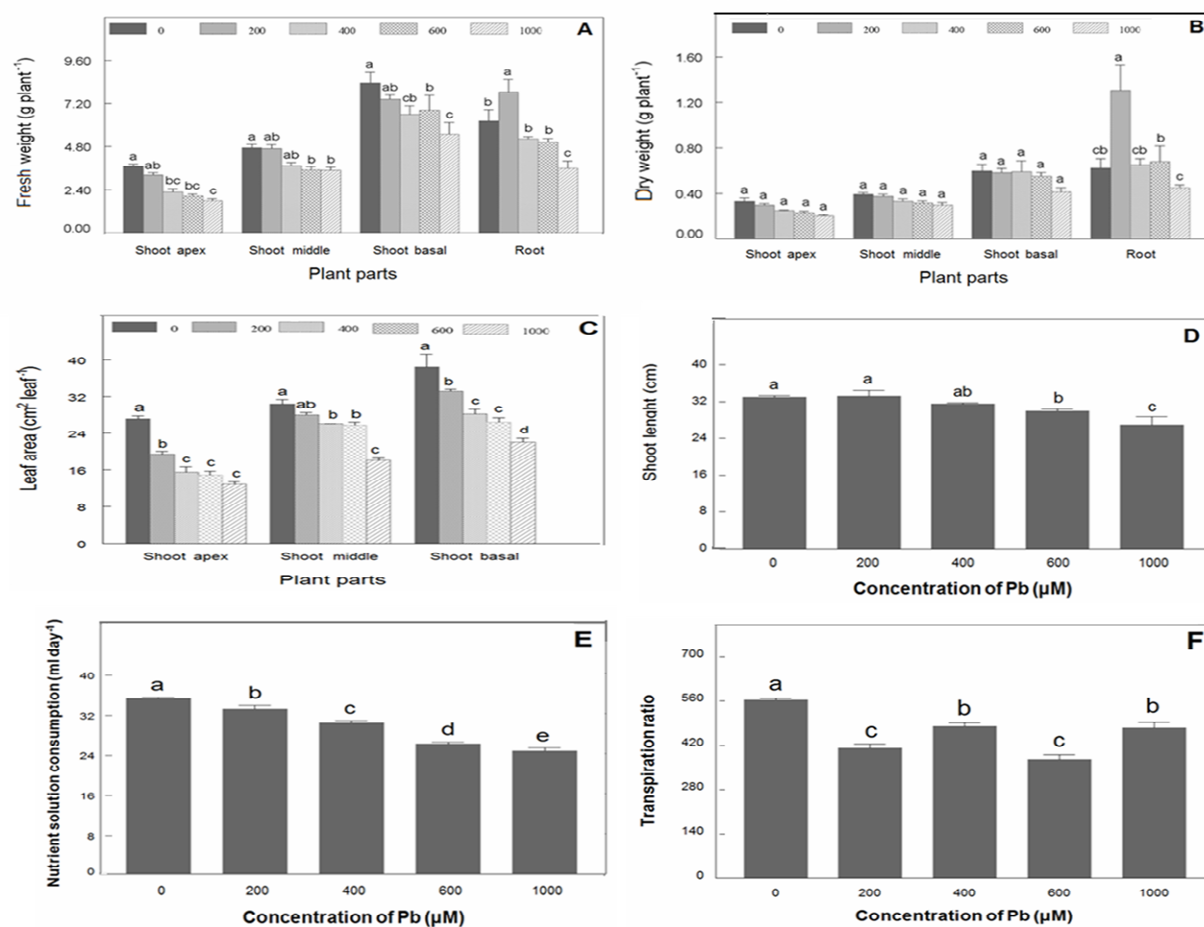


Figure 2. Effect of increasing Pb concentration on fresh (A) and dry (B) weight of different shoot parts (apex, middle and basal) and roots, leaf area (C), shoot length (D), nutrient solution consumption (E), and transpiration ratio (F) of *P. sagittalis* plants. Statistics as in Figure 1.

The root index of tolerance (IT) values of *P. sagittalis* was significantly lower to control only 1000 µM Pb. On the other hand, the shoot IT was reduced upon addition of Pb levels above 200 µM (Table 1). Compared with those of the shoots and roots dws (Fig. 2B) and the IT values, the roots appeared to be a more tolerant than shoots.

Table 1 Effects of various Pb concentrations on the index of tolerance of *P. sagittalis* after 30 days exposure

Parts	Pb treatments (μM)				
	0	200	400	600	1000
Root	1.00c	2.09a	0.95c	1.28b	0.72d
Shoot	1.00a	1.01a	0.92b	0.86b	0.71c

Data with different letters within the same horizontal row indicate significant difference ($P < 0.05$) at the different Pb level

3.3 δ -Ala-D activity and photosynthetic pigments

δ -Ala-D activity in leaves from the apex and middle shoot parts showed a significant decrease in all treatments with Pb addition. The lowest δ -Ala-D activity was observed at 600 μM Pb. In contrast, δ -Ala-D activity in the basal leaves decreased only at 600 μM Pb, and was not significantly altered in the other Pb concentrations, when compared to control (Fig. 3A).

Total chlorophyll and carotenoids concentrations in leaves of different developmental stages were not affected by Pb treatments (Fig. 3B and C).

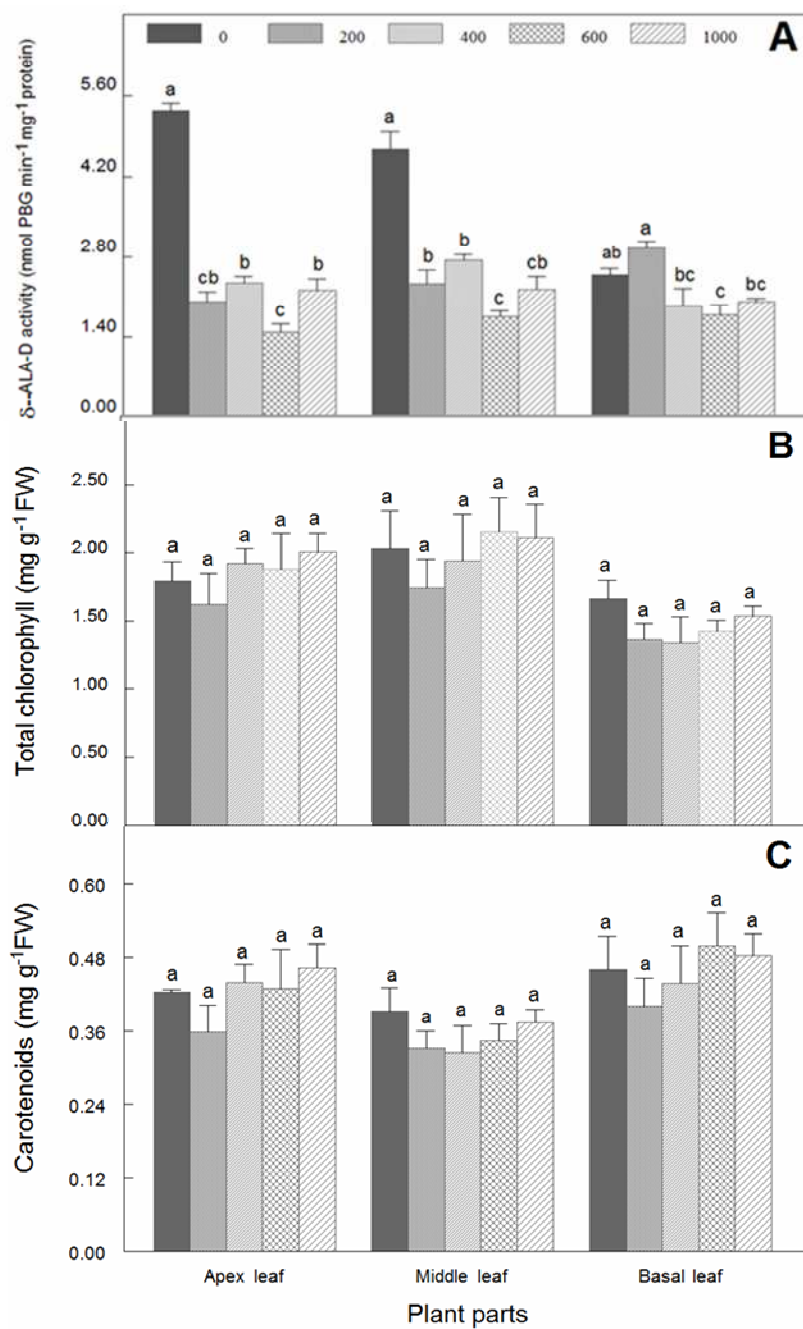


Figure 3. Effect of increasing Pb concentration on the δ -aminolevulinic acid dehydratase activity (A), and chlorophyll (B) and carotenoids (C) concentration in leaves of different shoot parts. Statistics as in Figure 1.

3.4 Hydrogen peroxide concentration and lipid peroxidation

For all evaluated plant tissues, in general, the H₂O₂ concentration increased with increasing Pb levels. However, H₂O₂ concentration in the leaves did not change at 200 µM Pb, when compared to control. Younger leaves (apex part) were the most sensitive to Pb treatments in relation to H₂O₂ concentration (Fig. 4A).

The level of lipid peroxidation was measured in terms of malondialdehyde (MDA) accumulation. As shown in Figure 4B, MDA concentration increased upon addition of Pb levels in leaf tissues from the apex and middle parts, whereas in basal leaves it increased only at Pb levels exceeding 400 µM, when compared to the control. Root MDA concentration increased at all Pb treatments, but no difference were found for Pb treatments ranging from 200 to 1000 µM (Fig. 4B).

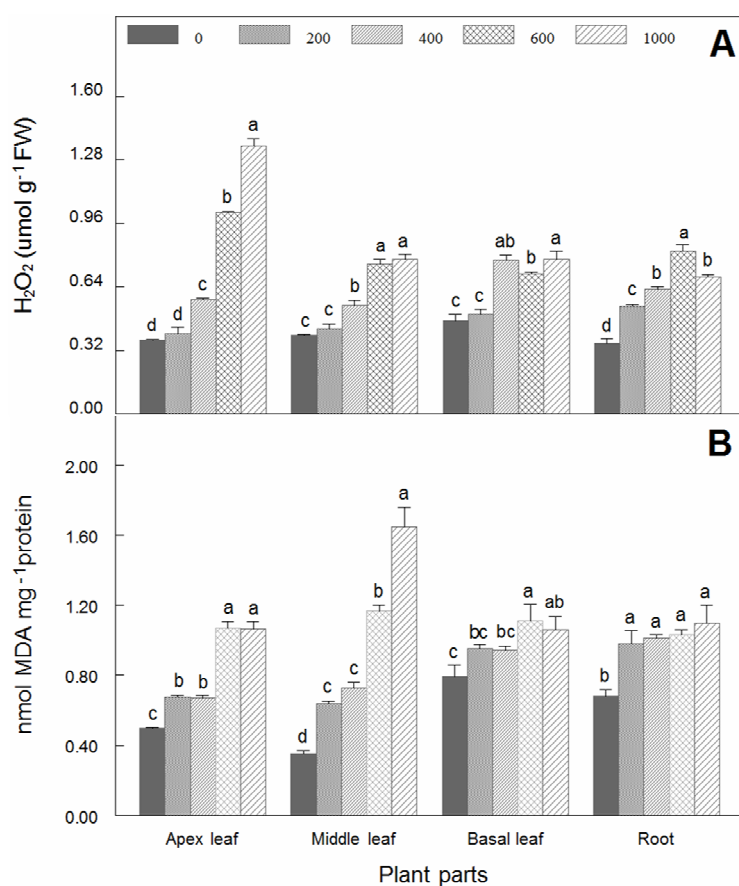


Figure 4. Effect of increasing Pb concentration on the hydrogen peroxide concentration (A), and on lipid peroxidation (B) in roots and leaves of different shoot parts. Statistics as in Figure 1.

3.5 Effects of Pb on antioxidative systems

3.5.1 Enzymes

In general, regardless of the developmental stage of leaves, SOD activity increased with increasing Pb levels. The exception to this pattern was observed at 200 μM Pb where basal leaves showed lower SOD activity than the control (Fig. 5A). SOD activity was higher in leaves than in roots. Root SOD activity was not affected by any of the tested Pb levels. Leaf CAT activity was less affected by Pb treatment than it was for SOD activity (Fig. 5B). Apex leaf CAT activity was not altered by any of the tested Pb levels. On the other hand, CAT activity in the middle leaves was significantly increased at the 400 and 1000 μM Pb levels. At 600 μM Pb treatment, the CAT activity in basal leaves significantly increased compared to control plants. Root CAT activity showed no significant difference upon addition of 400 μM and 1000 μM Pb levels, however, it significantly increased upon addition of 200 and 600 μM Pb levels, when compared to control. Regardless of the plant organ, the APX activity increased at Pb levels above 400 μM (Fig. 5C). The highest increase in APX activity was seen at 1000 μM Pb.

3.5.2 Non-enzymatic antioxidants

In general, the AsA concentration in all plant organs increased with increasing Pb levels (Fig. 5D). Younger leaf tissues (apex part) presented significantly larger AsA concentration when compared with older leaf tissues (middle and basal parts). However, the highest increase in AsA concentration was seen at 1000 μM Pb. NPSH concentration in all shoot parts increased with increasing Pb levels, with exception of that observed at 200 μM Pb level on NPSH concentration in leaf tissues of the apex part, where it decreased when compared to control (Fig. 5E). No significant

difference in root NPSH concentration was found between Pb treatments and the control.

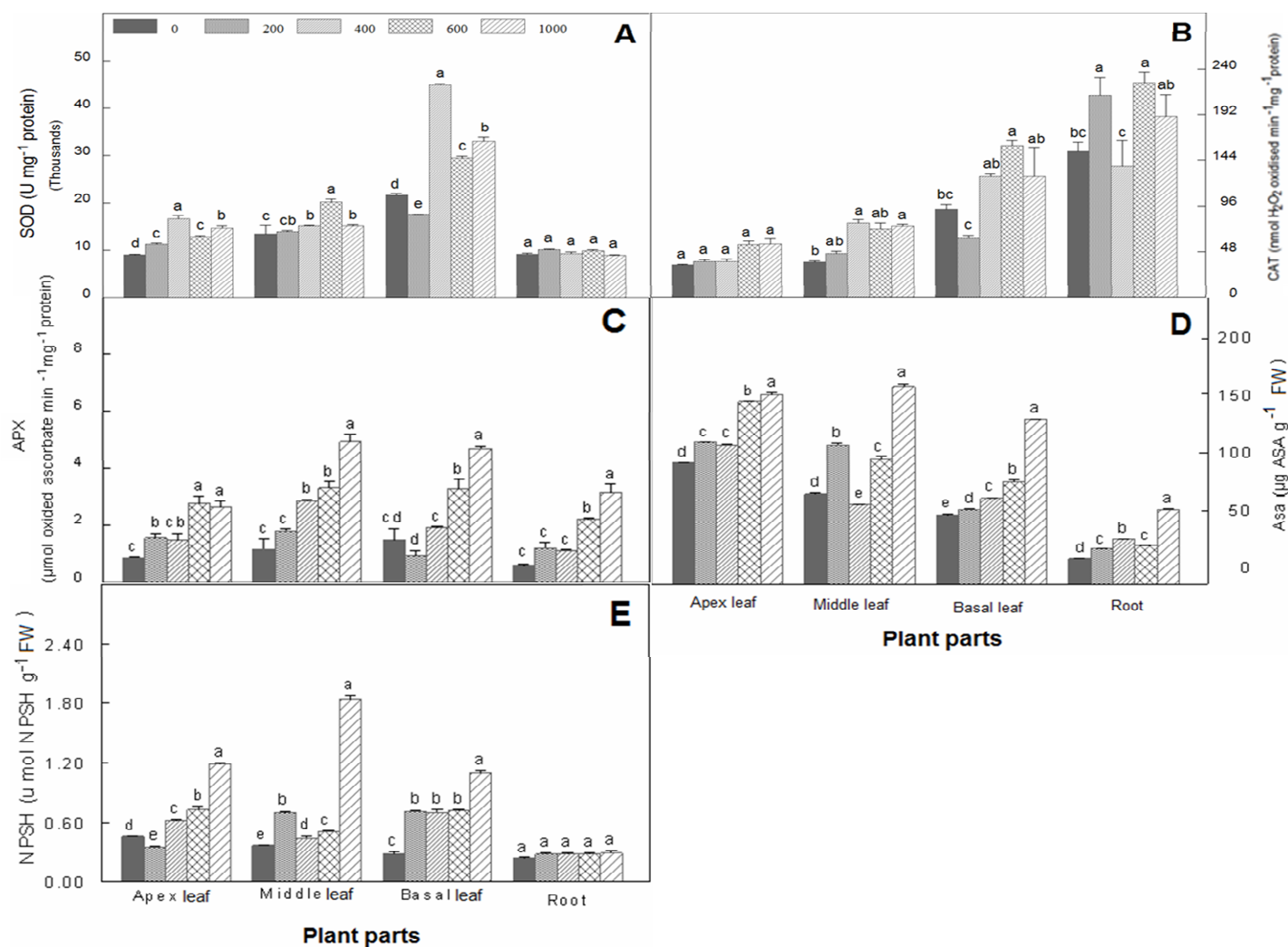


Figure 5. Effect of increasing Pb concentration on the superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase activities (A , B and C, respectively), and ascorbic acid and nonprotein thiol groups concentration (D and E, respectively) in roots and in leaves of different shoot parts. Statistics as in Figure 1.

4 Discussion

4.1 Tissue Pb concentration and content

Our data (Fig. 1) demonstrate that higher Pb exposures lead to remarkable increases in Pb concentration and content in both root and shoot tissues (leaves and stem from apex, middle and basal parts). The same was also reported for distinct plant species by other authors (VERMA & DUBEY, 2003; MISHRA et al., 2006; GUPTA et al., 2009). The accumulation of Pb was mostly pronounced in the roots. Pb moves predominantly into the root apoplast and thereby in a radial manner across the cortex accumulates near the endodermis (SHARMA & DUBEY, 2005). Antosiewicz & Wierzbicka (1999) showed that most of the Pb remains in bound form either in cell wall or in vacuoles. This Pb accumulation in the root system may indicate that roots serve as a partial barrier to Pb transport to the shoot (WIERZBICKA, 1987; SHARMA & DUBEY, 2005), suggesting that uptake and translocation rates of Pb are low (KRATOVALIEVA & CVETANOVSKA, 2001). Interestingly, in the present study, higher Pb concentration and content were observed in older leaves than in younger leaves. Pb concentrations in the three stem parts studied were very similar. This pattern suggests that *P. sagittalis* uses differential partitioning of the excess of Pb taken up to avoid Pb toxicity. Therefore, leaves differ in their abilities to accumulate Pb depending on age.

4.2 Effects of Pb on growth parameters and water status

P. sagittalis plants grown at excess supply of Pb (400, 600 and 1000 μM) showed visual symptoms of Pb toxicity. The first symptoms were noted after 15 days of metal supply, becoming more pronounced at 30 days. Leaves from the apex shoot part presented a slight wilting (data not shown). This result is in accordance with data of shoot fresh weight, which showed a decrease with increasing Pb supply (Fig. 2A)

although the dry weight was not affected. Moreover, leaf area also decreased upon addition of Pb levels (Fig. 2C), whereas shoot length significantly decreased only at Pb levels exceeding 400 μM (Fig. 2D). On the other hand, Pb treatments only reduced root fresh weight at 1000 μM , when compared to control. Therefore, these data indicate that for *P. sagittalis* the primary site of Pb toxicity appeared to be in the shoot. Han et al. (2008) found the same behavior for *Iris* L. treated with 0-10 mmol l^{-1} for 28 days.

Pb toxicity is reported to inhibit the growth of various plant species (SINGH et al., 1997; SHARMA & DUBEY, 2005; MISHRA et al., 2006; GOPAL & RIZVI, 2008), which is partially in agreement with the data of the present study. The dry weight of the three different shoot parts of *P. sagittalis* was not affected by Pb treatment, whereas in the roots it slightly decreased at 1000 μM Pb, and significantly increased at 200 μM Pb, when compared to control (Fig. 2B). Interestingly, as a visual symptom the roots became slightly brownish and/or blackish with increasing Pb supply. Gopal & Rizvi (2007) found that Pb at 1000 μM concentration for 35 days reduced about 30% the growth of radish (*Raphanus sativus*) roots. Similarly, Gupta et al. (2009) reported that 200 μM Pb for 7 days decreased shoot dry weight of maize (*Zea mays*). Therefore, since root biomass of *P. sagittalis* was significantly reduced only upon addition of Pb levels exceeding 600 μM .

The IT is defined as the ratio of average dry weight of roots/shoots in the test solution to the control, which is the reflection of the tolerant ability of a plant under the metal exposure and stress. Han et al. (2008) observed that the IT values of two *Iris* species treated over 7 days were significantly decreased in the higher Pb concentrations. The same has observed in our work. However, our data indicate that this specie has Pb tolerance. Wierzbicka (1999) comparing the lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species observed that plants with index tolerance above 65% were considered highly tolerant.

Pb-treated plants showed a decrease in the consumption of nutrient solution (Fig. 2E), which might be related to a decrease in leaf area ($r = 0.64$) (Fig. 2C) that can per se reduce the transpiration rate (SHARMA & DUBEY, 2005). Moreover, it was reported that Pb affects stomatal movements at least in two different ways through water or ion channels, promoting the closing of stomats (YANG et al., 2004).

In the roots, large amounts of Pb can prevent the water movement to the upper parts through the mechanical blocking at the Caspari strip (WIERZBICKA, 1987).

Based on the significant decrease in fresh weight and area of leaves from different shoot parts, but with no significant alteration in shoot dry weight upon addition of Pb treatments, these data suggest that the most dramatic effect of Pb excess was on the water status of *P. sagittalis* plants. Indeed, plants under Pb stress conditions presented lower transpiration ratios than control plants (Fig. 2F), indicating that Pb-stressed plants produced biomass amounts similar to control plants with lower volume of water. The increase in both dry and fresh weight of roots at the lowest Pb level supply (200 μ M) may be due to the hormetic effect. Growth hormesis represents an over compensation due to a disruption in homeostasis that has been described in relation to different factors (GONÇALVES et al., 2009).

4.3 δ -ALA-D activity and photosynthetic pigments

The level of total chlorophyll and carotenoids was postulated as a simple and reliable indicator of heavy metal toxicity for higher plants (GRATÃO et al., 2005). Carotenoids are essential for photosynthesis acting as secondary photosynthetic pigments, provitamin factors and as photoprotectants which quench free radicals such as singlet oxygen species in damaged tissue (SALGUERO et al., 2003). Results of the present study showed no significant difference in the chlorophyll and carotenoids concentration in leaves of different developmental ages with increasing Pb levels (Fig. 3B, C). This result might be related to the reduction in fresh weight (Fig. 2A), which would lead to an increase in the concentration of cellular components, including chlorophyll and carotenoids. It has been suggested that reduction in chlorophyll content in the presence of heavy metals is caused by an inhibition of chlorophyll biosynthesis (PEREIRA et al., 2006) which may be caused, in part, by the reduction of δ -ALA-D activity. This enzyme catalyzes the condensation of two molecules of δ -aminolevulinic acid (ALA) to porphobilinogen. The synthesis of porphobilinogen promotes the formation of porphyrins, hemes and chlorophylls, which are essential for adequate aerobic metabolism and for photosynthesis

(NORIEGA et al., 2006). In the present study, with exception of the result observed at 200 μM Pb on δ -ALA-D activity of leaves from the basal part of the shoot, the activity of this enzyme in leaves, regardless of their age, was severely reduced upon addition of Pb levels (Fig. 3A). Altered δ -ALA-D activity concomitant with reduced chlorophyll content has been reported in several terrestrial plants exposed to various metals (CARGNELUTTI et al., 2006; SKREBSKY et al., 2008; GONÇALVES et al., 2009). The reduction of the δ -ALA-D activity may be due an interaction of Pb with free – SH groups present at the active site of the enzyme (Van ASSCHE & CLIJSTERS, 1990) or to the decreased tissue hydration (SINGH et al., 1997).

In addition of the absence of a negative effect of Pb treatments on chlorophyll and carotenoids, we observed no significant change in dry weight of the different shoot parts (Fig. 2B), indicating that the photosynthetic rate may not have been altered. In contrast, Gupta et al. (2009) observed a duration-dependent response of Pb stress on photosynthetic pigments and on δ -ALA-D activity of maize seedlings. Therefore, as it seems that *P. sagittalis* is much more tolerant to Pb stress than maize, Pb toxicity effects on *P. sagittalis* were much lower. However, δ -ALA-D activity may be used as a biochemical marker to Pb stress.

4.4 Hydrogen peroxide concentration and lipid peroxidation

In many plant species, heavy metals have been reported to cause oxidative damage due to production of ROS (GRATÃO et al., 2005). The ROS cause a variety of harmful effects in plant cells including lipid peroxidation (ISLAM et al., 2008). In the present study, there was a gradual increase in H_2O_2 and MDA concentrations in roots and leaves from the different shoot parts with increasing Pb levels (Fig. 4A, B). The significant increase in MDA concentration suggests that Pb caused oxidative damage in the plant tissues (REDDY et al., 2005; MISHRA et al., 2006; DEY et al., 2007, GUPTA et al., 2009). Interestingly, we observed that the increase of lipid peroxidation in both root and shoot parts presented a straight correlation with the reduction in shoot length ($r = -0.79$), leaf area ($r = -0.49$), whereas no significant correlation with dry weight ($r = 0.061$) was observed.

In agreement with our results, other studies have showed increased MDA content in Pb-exposed plants (MISHRA et al., 2006; DEY et al., 2007; GUPTA et al., 2008). Pb induced ROS generation may initiate severe lipid peroxidation due to the removal of hydrogen from unsaturated fatty acids leading to formation of lipid radicals and reactive aldehydes (MISHRA et al. 2006). Islam et al. (2008) reported that increased levels of H₂O₂ under Pb stress is a result of action of SOD on superoxide radicals and/or of the direct formation of H₂O₂ in biochemical pathways, such as photorespiration. In the present study, leaves from the apex shoot part showed higher H₂O₂ concentration than older leaves upon addition of Pb levels. Tamás et al. (2004) suggested that the function of this elevated H₂O₂ formation in young tissues may be due to the increase in cell wall loosening. H₂O₂ plays a crucial role not only in the cell wall modification but also in cell wall synthesis and subsequent cell division (de MARCO & ROUBELAKIS, 1996).

4.5 Effects of Pb on antioxidative systems

4.5.1 Enzymes

To cope and repair the damage caused by ROS, plants have evolved complex antioxidant (both enzymatic and non-enzymatic) systems (ISLAM et al., 2008). The enzymic components associated with defense against ROS include SOD, CAT and APX (MITTLER, 2002; GRATÃO et al., 2005). Our results show a significant increase in the activity of SOD in all types of leaves, but those from the basal part of the shoot showed higher activity under Pb-stressed conditions (Fig. 5A). The increase in SOD activity is usually attributed to an increase in superoxide radical concentration. This is due to *de novo* synthesis of enzyme protein (VERMA & DUBEY, 2003), which is attributed to induction of genes of SOD by superoxide mediated signal transduction (FATIMA & AHMAD, 2004). However, the activity of SOD and the concentration of H₂O₂ in roots did not show any correlation ($r = 0.18$) in our experiments, where H₂O₂

concentration significantly increased upon addition of Pb levels. On the other hand, SOD activity showed no significant alteration (Fig. 5A).

According with Mittler (2002), the different affinities of APX (μM range) and CAT (mM range) for H_2O_2 suggest that they belong to two different classes of H_2O_2 - scavenging enzymes: APX might be responsible for the fine modulation of ROS for signaling, whereas CAT may be responsible for the removal of excess ROS during stress. In the present study, in general, the CAT activity was increased upon addition of Pb levels exceeding $200 \mu\text{M}$ in leaves of the middle and basal parts of shoots, whereas it did not change in leaves of the apex shoot, when compared to control (Fig. 5B). On the other hand, regardless of the age of leaves, the APX activity was increased at Pb levels exceeding $400 \mu\text{M}$ (Fig. 5C). The results suggest that the APX activity is better correlated ($r = 0.48$) with leaf H_2O_2 concentration than CAT activity ($r = 0.09$). Moreover, for roots it seems that CAT (Fig. 5B) and APX (Fig. 5C) activities were more important than SOD activity (Fig. 5A) to scavenge the excess of ROS. Therefore, *P. sagittalis* presented a different behavior than that reported for other species. Rice plants grown for 20 days in sand cultures containing 0.5 mM and 1 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ showed increased activities of various antioxidative enzymes as SOD, APX, glutathione reductase and peroxidase in roots and leaves (VERMA & DUBEY, 2003). In the roots, the lower activity of APX may be due the lower concentration of AsA. APXs are extremely sensitive to the ascorbate concentration, in which the enzymes lose stability and their activity declines under low AsA content (SHIGEOKA et al., 2002)

The response of enzymes involved in attenuation of ROS (SOD, APX or CAT) to heavy metals greatly depends on the species, plant age and growth conditions (GRATÃO et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009). Under Pb stress conditions, the analysis of different antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX, etc.) by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis has shown that they present several isoforms in different organs of various plant species (RUCINSKA et al., 1999; VERMA & DUBEY, 2003). Multiple isoforms of CAT and SOD have been reported in higher plants, which are under control of different genes (MITTLER et al., 2004). Rucinska et al. (1999) found five CAT and SOD enzymes in lupin roots treated with Pb concentrations from 50 to 350 mg l^{-1} . These isoforms showed different responses with the increase Pb concentration. Interestingly, here the patterns of total CAT and SOD activities were

significantly different between roots and shoots parts. This may be due to the combined responses of diverse CAT and SOD isoforms, with prevalence of the ones with increased activities.

4.5.2 Effects of Pb on non-enzymatic antioxidants

NPSH are known to be affected by the presence of several metals (XIANG & OLIVER, 1998). Among the NPSH, glutathione (GSH) is the predominant molecule and has important function as redox-buffer, phytochelatin (PCs) precursor and substrate for keeping ascorbate in its reduced form in the ascorbate – glutathione pathway (NOCTOR & FOYER, 1998). In the present study, in general the NPSH concentration increased with increasing Pb levels in the shoots, whereas it showed no significant alteration in roots (Fig. 5E).

Noctor & Foyer (1998) reported that such increase may be due to the stimulation of enzymes of the sulfate reduction pathway. GSH synthesis may be increased by induction of the transcription of genes of GSH biosynthesis such as γ -glutamylcysteine synthetase (*gsh1*) and glutathione synthetase (*gsh2*) and glutathione reductase (*gr1* and *gr2*) under Pb stress condition (SHARMA & DUBEY, 2005). Moreover, GSH is the substrate for PCs synthesis. PCs are involved in the cellular detoxification mechanism due to their ability to form stable metal-PC complexes (SCARANO & MORELLI, 2002). Recently Estrella – Gómes et al. (2009), showed that the accumulation of PC in *Salvinia minima* is a direct response to Pb accumulation, and PCs participate as one of the mechanism to cope with Pb of this Pb – hyperaccumulator aquatic fern.

AsA is the primary antioxidant reacting directly with ROS and also acts as secondary antioxidant by reducing the oxidized form of α – tocopherol and preventing membrane damage (NOCTOR & FOYER, 1998). In the present study, AsA concentration in both root and different shoot parts, altogether, increased with higher Pb concentration (Fig. 5D). In relation to plant parts, the AsA concentration decreased in the order of apex leaves > middle leaves > basal leaves > root. AsA concentrations vary considerably between tissues and depend on the physiological

status of the plant and on environmental factors (SMIRNOFF, 1996). AsA is an essential constituent of higher plants that plays key roles in antioxidant defense, cell division and cell elongation (HOREMANS et al., 2000). Therefore, AsA contents are generally higher in younger tissues than in older ones, and AsA accumulates in actively growing tissues such as meristems. Besides, photosynthetic tissues have high concentration of AsA (HOREMANS et al., 2000).

These results suggest that Pb induces oxidative stress in *P. sagittalis* and that elevated activity of antioxidative enzymes could serve as important components of antioxidative defense mechanism against oxidative injury. In conclusion, Pb stress triggered a defense mechanism against oxidative stress in *P. sagittalis* showing a protective effect against ROS, demonstrating tolerance and possible use of these plants for reclamation of Pb contaminated soils.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for support to this research.

References

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymology**, San Diego, v.105, p.121-126, 1984.
- ANGELONE, M.; BINI, C. Trace elements concentrations in soils and plants of western Europe. In: ADRIANO, D.C., (ed). **Biogeochemistry of Trace Metals**. London, Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. p.19-60.
- ANTOSIEWICZ, D.; WIERZBICKA, M. Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. **Journal of Microscopy**, New York, v.195, p.139 – 146, 1999.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248–254, 1976.
- BRENNAM, M.A.; SHELLEY, M.L. A model of the uptake, translocation, and accumulation of lead (Pb) by maize for the purpose of phytoextraction. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v.12, p.271 – 297, 1999.
- CARGNELUTTI, D. et al. Mercury Toxicity Induces Oxidative Stress In Growing Cucumber Seedlings. **Chemosphere**, Oxford, v.65, p.999-1006, 2006.
- CUNNINGHAM, S.D.; BERTI, W.R. Phytoextraction and phytostabilization: Technical, economic and regulatory considerations of the sil-lead issue. In: TERRY N.; BANUELOS G, (eds.). **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Florida: Lewis Publication, p.359 – 376, 2000.
- De MARCO, A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. The complexity of enzymatic control of hydrogen peroxide concentration may affect the regeneration potential of plant protoplast. **Plant Physiology**, Rockville, v.110, p.137 – 145, 1996.
- ELLMAN, G.G. Tissue sulphhydryl and groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Berlin, v.82, p.70–77, 1959.
- EL-MOSHATY, F.I.B. et al. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.43, p.109 – 119, 1993.

ESTRELLA-GÓMEZ, N. et al. The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatins via changes in *SmPCS* expression and in phytochelatin synthase activity. **Aquatic Toxicology**, Irlanda, v.91, p.320 – 328, 2009.

FATIMA, R.A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.346, p.256-273, 2004.

GONÇALVES, J.F. et al. Cadmium-induced oxidative stress in two potato cultivars. **Biometals**, Oxford, v.22, p.779 – 792, 2009.

GRATÃO, P.L. et al. Making the life of heavy- metal stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v.32, p.481 – 494, 2005.

GOPAL, R.; RIZVI., A.H. Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. **Chemosphere**, Oxford, v.70, p.1539-1544, 2008.

GUPTA, D.K. et al. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.172, p.479 – 484, 2009.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.E. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.57, p.1132–1134, 1979.

HAN, Y.; HUANG, S.; GU, J.; QIU, S.; CHEN, J. Tolerance and accumulation of lead by species of *Iris* L. **Ecotoxicology**, v.17, p.853 – 859, 2008.

HOREMANS, N. et al. Ascorbate function and associated transport systems in plants. **Plant Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v.38, p.531 – 540, 2000.

ISLAM, E. et al. Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, p.154, v.914-926, 2008.

JACQUES-SILVA, M.C. et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology and Toxicology**, v.88, p.119–125, 2001.

JOHNSON, F.M. The genetic effects of environmental lead. **Mutation Research**, Amsterdam, v.410, p.123 – 140, 1998.

KRATOVALIEVA, S.; CVETANOVSKA, L. Influence of different Pb concentrations to some morphophysiological parameters at tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in experimental conditions. **Macedonian Agricultural Review**, Macedonian, v.48, p.35 – 41, 2001.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymology**, San Diego, v.148, p.350 – 382, 1987.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, p.1781-1787, 2001.

MISHRA, S. et al. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. **Chemosphere**, Oxford, v.65, p.1027-1039, 2006.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.244, p.6049 – 6055, 1972.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, London, v.7, p.405-410, 2002.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, London, v.9, p.490-498, 2004.

MORSCH, V.M. et al. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves. **Biol. Plant**, local, v.45, p.85–89, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, Rockville, v.15, p.473 – 497, 1962.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249 – 279, 1998.

NORIEGA, G.O. et al. Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of δ -aminolevulinic acid. **Biometals**, Oxford, v.20, p.841 – 851, 2007.

PEREIRA, L. et al. Effect of aluminum on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) and the development of cucumber (*Cucumis sativus*). **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.57, p.106-115, 2006.

REDDY, A.M. et al. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). **Chemosphere**, Oxford, v.60, p.97-104, 2005.

RUCINSKA, R.; WAPLAK, S.; GWÁZDZ, E.A. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. **Plant Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v.37, p.187 – 194, 1999.

SALGUERO, A. Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella badawil*. **Biological Engineering**, v.20, p.249 – 253, 2003.

SASSA, S. δ -Aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v.28, p.133–145, 1982.

SCARANO, G; MORELLI, E. Characterization of cadmium- and lead phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. **Biometals**, v.15, Oxford, p.145–151, 2002.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.17, p.35-52, 2005.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1305 – 1319, 2002.

SINGH, P.R. et al. Response of higher plants to lead contaminated environment. **Chemosphere**, Oxford, v.34, p.2467-2493, 1997.

SMIRNOFF, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals Botany**, Oxford, v.78, p.661 – 669, 1996.

TAMÁS, L. et al. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.281 – 288, 2004.

Van ASSCHE, F; CLIJSTERS, H. Effects of metal on enzyme activity in plants. **Plant Cell Environmental**, Oxford, v.13, p.195 – 206, 1990.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Watsonville, v.164, p.645-655, 2003.

WIERZBICKA, M. Lead accumulation and its translocation barriers in roots of *Allium cepa* L. – autoradiographic and ultrastructural studies. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.10, p.17 – 26, 1987.

WIERZBICKA, M. Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. **Environmental Pollution**, v.104, p.41- 52, 1999.

XIANG, C.; OLIVER, D.J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.10, p.1539 – 1550, 1998.

YANG, H.M.; ZHANG, X.Y.; WANG, G.X. Effects of heavy metals on stomatal movements in Broad Bean leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v.51, p.516 – 520, 2004.

ZHU Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus*L.). **Plant Science**, Watsonville, v.167, p.527-533, 2004.

4 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou o efeito do Pb em diferentes regiões (basal, mediana e apical) e órgãos (raiz, caule e folha) de plantas de *P. sagittalis*. Avaliou-se o crescimento da parte aérea, a biomassa fresca da raiz e da parte aérea, a área foliar, bem como as atividades enzimáticas e a concentração de antioxidantes não-enzimáticos.

A concentração de Pb nos tecidos da parte aérea e das raízes aumentou com o aumento da concentração deste elemento no substrato (areia) (Fig. 1, pág. 48). A concentração de Pb nas raízes foi significativamente maior do que nas folhas e caules de diferentes regiões da parte aérea. Este fato pode indicar que as raízes podem funcionar como uma barreira parcial para o transporte do Pb aos tecidos da parte aérea (WIERZBICKA, 1987; SHARMA & DUBEY, 2005). Devido a essa capacidade as plantas de *P. sagittalis* podem ser utilizadas como fitoestabilizadoras permitindo a retenção do Pb na raízes evitando a expansão do contaminante para áreas adjacentes.

Apesar disso, pode-se verificar que ocorreu translocação deste metal para a parte aérea, onde foi observada maior concentração de Pb nas folhas mais velhas (região basal) do que nas folhas mais jovens (região mediana e apical). Contudo, a concentração de Pb no caule das diferentes regiões foi bastante similar demonstrando que as plantas de *P. sagittalis* usam diferentes mecanismos de acumulação do excesso de Pb, sendo que nas folhas, essa habilidade pode depender do estágio de desenvolvimento.

O primeiro sintoma visível dos efeitos do Pb foi o murchamento das folhas, principalmente da região apical, e o escurecimento das raízes. Wierzbicka (1987) relatou que o acúmulo de Pb nas raízes pode impedir o movimento da água para as partes superiores da planta através de um bloqueio mecânico na estria de Caspari. Além disso, o Pb se liga às aquaporinas obstruindo os canais de passagem de água, impedindo assim a sua absorção (YANG et al., 2004). Isso pode ser evidenciado através da diminuição no consumo de solução nutritiva e perda de biomassa fresca com o aumento da concentração de Pb (Fig. 2E e A, respectivamente, pág. 50).

O aumento da concentração de Pb nas diferentes regiões da parte aérea ocasionou uma redução na área foliar (Fig. 2C, pág. 50), enquanto o comprimento da parte aérea sofreu redução somente acima de 400 μM . Entretanto, nas raízes ocorreu redução significativa da matéria fresca somente na maior concentração de Pb (1000 μM). Esses dados podem indicar que o sítio primário da toxicidade do Pb pode ser a parte aérea.

Neste estudo também foi evidenciado que plantas tratadas com Pb tiveram o consumo de solução nutritiva reduzido. Isto pode estar relacionado à redução na área foliar, a qual pode ser responsável pela redução da taxa de transpiração, ou ainda devido ao efeito deletério do Pb sobre o movimento dos estômatos, ocasionando o seu fechamento.

Entretanto, os efeitos deletérios do Pb não foram observados na matéria seca da raiz e das diferentes regiões da parte aérea indicando que esta espécie apresenta tolerância ao chumbo. Isto pode ser evidenciado através do índice de tolerância (IT) ao Pb (Tab. 1, pág. 51). Segundo wierzbicka (1999) plantas que apresentaram IT acima de 0,6 foram consideradas altamente tolerantes ao Pb. Sendo que as plantas de *P. sagittalis* apresentaram IT acima de 0,7 nas maiores concentrações, sendo consideradas tolerantes a este metal.

Em vista do significativo decréscimo na matéria fresca das folhas e da área foliar nas diferentes regiões da parte aérea, mas por outro lado sem significativa alteração na matéria seca após a adição de Pb, esses dados sugerem que o efeito predominante do excesso de Pb foi sobre o “status” hídrico das plantas de *P. sagittalis*. Além disso, plantas submetidas a condições de estresse por Pb apresentaram menor taxa de transpiração que as plantas controle (Fig. 2F, pág. 50), isto indica que plantas tratadas com Pb produziram quantidade similar de biomassa às plantas controle, mas utilizando menor volume de água.

O Pb não causou alteração significativa na concentração de clorofila e carotenóides em folhas de diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 3B e C, pág. 52). No entanto, de um modo geral, houve significativa diminuição na atividade da enzima δ -ALA-D de plantas expostas ao Pb, independente do estágio de desenvolvimento (Fig. 3A, pág. 52). A redução da atividade desta enzima pode ser devido a interação do Pb com grupos -SH livres presentes no sítio ativo da enzima ou através da redução da hidratação do tecido (van ASSCHE & CLIJSTERS;

SINGH, 1997). Apesar disso, não ocorreu redução da concentração de clorofilas e carotenóides e da matéria seca de diferentes partes da planta (Fig. 2B, pág. 50), indicando que a taxa fotossintética pode não ter sido alterada.

No presente estudo observou-se um aumento gradual na concentração de H_2O_2 e da peroxidação lipídica em raízes e folhas das diferentes regiões da parte aérea (Fig. 4A e B, pág. 53). O aumento da concentração de H_2O_2 pode coincidir com o aumento da atividade das enzimas CAT, APX e SOD. Entretanto, as atividades dessas enzimas também podem estar relacionadas tanto a concentração de Pb quanto a parte e o estágio de desenvolvimento da planta.

De modo geral, a atividade da CAT aumentou em folhas da região mediana e basal e nas raízes com o aumento da concentração de Pb (Fig. 5B, pág. 55). Entretanto, independente do estágio de desenvolvimento da planta, a atividade da APX aumentou com o aumento da concentração de Pb no meio (Fig. 5C, pág. 55). Estes resultados sugerem que a atividade da APX está melhor correlacionada com a concentração de H_2O_2 que a atividade da CAT.

No presente estudo, a atividade da SOD nas raízes não demonstrou correlação com o aumento da concentração de H_2O_2 , não demonstrando diferença significativa em relação ao controle. Portanto, nas raízes a atividade da CAT e da APX foi mais importante que a atividade da SOD na remoção do excesso de EROs.

Em relação aos antioxidantes não-enzimáticos, em geral, foi observado aumento na concentração de tióis não protéicos (NPSH) na parte aérea com o aumento da concentração de Pb adicionado ao meio. A tolerância das plantas de *P. sagittalis* ao Pb pode estar associada com a acumulação de grupos tióis não protéicos. Os grupos NPSH são peptídeos que agem quelando os íons de chumbo reduzindo a sua biodisponibilidade e seus efeitos tóxicos (SHING et al., 1997). Quanto à concentração de ácido ascórbico (AsA) tanto nas raízes quanto nas folhas das diferentes regiões da parte aérea, de modo geral, aumentou com o aumento da concentração de Pb no meio. Entretanto, a concentração de Asa diferiu entre as partes da planta, sendo maior nas folhas mais jovens (região apical) (Fig. 5D, pág. 55). O AsA é um constituinte chave do sistema de defesa antioxidante, na divisão e alongação celular, sendo encontrado em maior concentração nos tecidos meristemáticos (HOREMANS et al., 2000).

Com base no exposto, apesar do Pb ter induzido estresse oxidativo, o qual pode ser comprovado através do aumento da peroxidação lipídica em plantas de *P. sagittalis* expostas ao metal, o sistema antioxidante desempenhou um papel fundamental contra o dano oxidativo dependendo do tecido e do estado fisiológico da planta. Devido à razoável capacidade das plantas de *P. sagittalis* em acumular Pb nas raízes, e em menor quantidade na parte aérea, esta espécie pode ser utilizada tanto como fitoestabilizadora, promovendo a retenção do Pb nas raízes evitando a expansão do contaminante para áreas adjacentes, quanto como fitoextratora.

5 CONCLUSÕES

A concentração de Pb diferiu entre as partes da planta, sendo que ocorreu maior acúmulo de Pb na raiz. Além disso, plantas de *P. sagittalis* acumularam quantidades razoáveis de chumbo (0,2%) podendo ser utilizadas em programas de fitorremediação.

O aumento da concentração de Pb promoveu diminuição da absorção de solução nutritiva, da massa fresca da parte aérea e da raiz e da área foliar. Entretanto, não foi observada redução na massa seca da parte aérea e da raiz. Apesar disso, ocorreu diminuição do crescimento da parte aérea nas maiores concentrações de Pb.

O Pb inibiu a atividade da δ -ALA-D, entretanto, não afetou a concentração das clorofilas a e b e dos carotenóides em plantas de *P. sagittalis*.

Apesar de o sistema antioxidante estar ativo, o Pb aumentou a peroxidação lipídica e o conteúdo de H_2O_2 , sugerindo que o Pb induziu danos às membranas celulares em plantas de *P. sagittalis*.

O sistema de defesa antioxidante estava ativo e atuando na remoção de EROs. Essas respostas foram dependentes da parte (parte aérea e raiz) e do estágio de desenvolvimento da planta. Sendo que o aumento da concentração de chumbo (Pb), de modo geral, promoveu aumento da atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase. Além disso, o estresse causado pelo chumbo elevou os níveis de ácido ascórbico e -SH total em plantas de *P. sagittalis*.

Através dessas informações pode-se concluir que os danos oxidativos provocados pelo chumbo podem ter sido minimizados pela ativação do sistema antioxidante e que os efeitos deletérios no crescimento estão mais relacionados com o efeito do chumbo sobre o sistema hídrico da planta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.V.; SCHAEFER, C.E.G.R. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, Brasil, 2000. p. 299 – 352.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, S.L. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, 1331-1341, 2002.

ANG, L.H.; NG, L.T. Trace element concentration in mango (*Mangifera indica* L.), seedless guava (*Psidium guajava* L.) and papaya (*Carica papaya* L.) grown on agricultural and ex –mining lands of Bidor, Perak. **Journal of Tropical Agricultural Science**, v.23, n.1; p.15 – 22, 2000.

ANTOSIEWICZ, D.; WIERZBICHA, M. Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. **Journal of Microscopy**, New York, v.195, p.139 – 146, 1999.

ASADA, K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M.(Eds.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.77 – 104.

BAKER, A. J. M. Metal tolerance. **New Phytologist**, London, v. 106, n.1, p.93-111, 1987.

BEKIAROGLOU, P.; KARATAGLIS, S. The effect of lead and zinc on *Mentha spicata*. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v.188, p.201 – 205, 2002.

BOHLMANN, F. et al. *Neue Eudesman-Derivate* aus *Pluchea suaveolens*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.19, n.5, p.969-970, 1980.

BOSSO, S.T.; ENZWEILER, J. Ensaios para determinar a (bio) disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.2, p.394 – 400, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigisolo: identificação de populações sob risco de exposição e priorização de áreas com populações expostas a solo contaminado. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=23900. Acesso em: 24 jul. 2009.

BREMER, K. **Asteraceae. Cladistics and Classification**. Portland, Oregon: Timber Press, 1994. 752 p.

BRUNE, A.; URBACH, W.; DIETZ, K.J. Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanism involved in zinc tolerance. **Plant, Cell Environment**, Oxford, v.17, p.153 – 162, 1994.

BRUNET, J. et al. Accumulation of lead in roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants triggers systemic variation in gene expression in the shoots. **Chemosphere**, Oxford, v. 77, n.8, p.1113 – 1120, 2009.

BÜRGER, M.E. et al. Ação de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabr. Sobre a motilidade do íleo isolado de ratos. **Saúde**, São Paulo, v.23, p.61 – 68, 1997.

CANCELLI, R.R.; SCHNEIDER, A.A.; BAUERMANN, S.G. Morfologia polínica do gênero *Pluchea* Cass. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Paleontologia**, Rio Grande do Sul, v.9, p.149 – 156, 2006.

CARRUYO, I. et al. Correlation of toxicity with lead content in root tip cells (*Allium cepa* L.). **Biological Trace Element Research**, Totowa, v.125, p.276 – 285, 2008.

CETESB - Companhia de Tecnologia Ambiental do Estado de São Paulo. **Decisão de diretoria nº 195-2005 para valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**, São Paulo, CETESB, 2005.

CHEN, J.; GOLDSBROUGH, P.B. Increased activity of γ -glutamyl cysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.106, p.233 – 239, 1994.

CHLOPECKA, A. et al. Forms of cadmium, lead, and zinc in contaminated soils from southwest Poland. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 25, p. 69-79, 1996.

COTTA, J.A.O.; REZENDE, M.O.O.; PIOVANI, M.R. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio Betari no parque estadual turístico do Alto Ribeira- Petar, São Paulo, Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v.29, p.40 -45, 2006.

CROSS, C.E. et al. Oxidative Stress and Antioxidants at Biosurfaces: Plants, Skin, and Respiratory Tract Surfaces. **Environmental Health Perspectives**, Cary, v.106, p. 1241 – 1251, 1998.

CUNNINGHAM, S. D. et al. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advance in Agronomy**, New York, v. 56, p.55-114, 1996.

CUNNINGHAM, S.D.; BERTI, W.R.; HUANG, J.W. Phytoremediation of contaminated soils. **Trends in Biotechnology**, Limerick, v.13, p.393 – 397, 1995.

CZOC, V.G.; SCHULZE, P.J. Die wirkung von Chlorogensäure, Kaffeesäure und Chinasäure nach i.v. Applikation auf den Gallefluss der Ratte. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, Berlin, v.12, p.224 – 236, 1973.

DABROWSKA, G. et al. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracow, v.49, p.7 – 17, 2007.

DALPIAZ, S.; RITTER, M.R. O gênero *Pluchea* Cass. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v.50, p.3 – 20, 1998.

DEY, S.K. et al. Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.19, p.53 – 60, 2007.

EUN, S.; YOUN, H.S.; LEE, Y. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 110, p. 357 – 365, 2000.

FERNÁNDEZ, F.; TORRES, M. Evaluation of *Pluchea carolinensis* extracts as antioxidants by the epinephrine oxidation method. **Fitoterapia**, Milan, v.77, p.221 – 226, 2006.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 92, p. 696 – 717, 1994.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal Experimental Biology**, Sydney, v.201, p.1203 – 1209, 1998.

GUILHON, G.M.S.P.; MÜLLER, A.H. Eudesmane derivatives from *Pluchea quitoc*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.43, p.417-421, 1996.

GUILHON, G.M.S.P.; MÜLLER, A.H. Eudesmanolides and epoxycauthemones from *Pluchea quitoc*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.49, p.1347-1351, 1998.

GUPTA, D.K. et al.. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.172, p.479 – 484, 2009.

GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, Washington, v.41, p.1819 – 1828, 1995.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American Society for Clinical Nutrition**, Rockville, v.57, p.715 – 725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. New York : Oxford. 2000. 370p.

HOREMANS, N. et al. Ascorbate function and associated transport systems in plants. **Plant Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v.38, p.531 – 540, 2000.

HUANG, J.W.; CUNNINGHAM, S.D. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. **New Phytologist**, Lancaster, v.134, p. 75 – 84, 1996.

INZÉ, D.; MONTAGU, M.V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.6, p.153 – 158, 1995.

ISLAM, E. et al. Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 154, p.914 – 926, 2008.

JIANG, W.; LIU, D. Effects of Pb²⁺ on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* L. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, New York, v. 65, p.786 – 793, 2000.

KÄRENLAMPI, S. et al. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. **Environmental Pollution**, Oxford, v.107, p.225 – 231, 2000.

LIU, D. et al. Pb/Cu effects on the organization of microtubule cytoskeleton in interphase and mitotic cells *Allium sativum* L. **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, p.695 – 702, 2009.

LEVINA E.N. **Obshchaya tosikologiya metallov (General metal toxicology)**. Leningrad: Meditsyna, 1972.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas parasitas e tóxicas**. 3.ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.

LORENZI H., MATOS F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

MACHLIN I. **Handbook of Vitamins**. 2.ed. Marcel Derek Inc., New York: Marcel Dekker Inc., 1990. p. 14 -16.

MALECKA, A.; JARMUSZKIEWICZ, W.; TOMASZEWSKA, B. Antioxidantive defense to lead stress in subcellular compartments of pea roots cells. **Acta Biochimica Polonica**, Poland, v.48, p.687 – 698, 2001.

MARTINO, V.S. et al. Determinación espectrofotométrica del contenido de ácidos cafeoilquínicos em espécies argentinas de compoestas usadas em medicina popular. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.8, p.3 -9, 1989.

McBRIDE, M. D. **Environmental Chemistry of Soils**. New York: Oxford University, 1994. 406 p.

MISHRA, S. et al. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. **Chemosphere**, Oxford, v.65, p.1027 – 1039.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Plant Science**, Watsonville, v.7, p.405 – 410, 2002.

MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos a saúde. **Química Nova**, São Paulo, v.27, p.251 – 260, 2004.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, London, v.47, p.469–484, 2009.

NOCTOR, G. et al. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.623 – 647, 1998.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249 – 279, 1998.

NRIAGU, J. O. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. **Nature**, London, v. 338, p. 47-49, 1989.

OLIVEIRA, L.P.; MORITA, D.M. Tratabilidade de solos tropicais contaminados por resíduos da indústria de revestimentos cerâmicos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v.13, p.97 – 108, 2008.

PAOLIELLO, M.M.B.; DE CAPITANI, E.M. Occupational and environmental human lead exposure in Brazil. **Environmental Research**, USA, v.103, p.288 – 297, 2007.

PARENT, C.; CAPELLI, N.; DAT, J. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v.331, p.255 – 261, 2008.

PENG, C. et al. *Pluchea* Cass. (Asteraceae: Inuleae) in Taiwan. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Shanghai, v.39, p.287 – 297, 1998.

PÉREZ-GARCÍA, F. et al. Activity of plant extracts on the respiratory burst and the stress protein synthesis. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.8, p.31 – 38, 2001.

PÉREZ-GARCÍA, F. et al. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis*: involvement of an antioxidant mechanism. **Life Science**, Alexandria, v.59, p.2033 – 2040, 1996.

PÉREZ-GARCÍA, F. et al. Activity of taraxasteryl acetate on inflammation and heat shock protein synthesis. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.12, p.278 – 284, 2005.

PIECHALAK, A. et al. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 60, p. 212 – 218, 2002.

PIERANGELI, M. A. P. **Chumbo em latossolos brasileiros: adsorção e dessorção sob efeito de pH e força iônica**. Lavras, 1999. 108 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

QUEIROZ, M.L.S. et al. Stimulatory action of *Pluchea quitoc* extract on the hematopoietic response during murine listeriosis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, USA, v.33, p.721-740, 2000.

QUEIROZ, M.L.S. et al. Adjuvant effect of *Pluchea quitoc* extract on the resistance of tumor-bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, USA, v.23, p.215 – 228, 2001.

RASHID, A.; CAMM, E.L.; EKRAMODDOULLAH, K.M. Molecular mechanism of action of Pb and Zn²⁺ on water oxidizing complexo of photosystem II. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 350, p.296 – 298, 1994.

RASKIN, L.; SMITH, R.D.; SALT, D.E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Plant Biotechnology**, USA, v.8, p.221 – 226, 1997.

RUBY, M.V. et al. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. **Environmental Science & Technology**, Washington, v.33, p.3697 - 3705, 1999

RUDAKOVA, E.V.; KARAKIS, K.D.; SIDORSHINA, E.T. The role of plant cell walls in the uptake and accumulation of metal ions. **Fiziologiya i Biokhimiya Kulturnykh Rastenii**, v.20, p.3 – 12, 1988.

SALGUERO, A. et al. Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p.249 – 253, 2003.

SALT, D.E. et al. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plant. **Biotechnology**, New York, v. 13, p.468 – 474, 1995.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal – induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1351 – 1365, 2002.

SEREGIN, I.V.; IVANIOV, V.B. Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. **Fiziologiya Rastenii**, Moscow, v.44, p.915 – 921, 1997.

SEREGIN, I.V.; PEKHOV, V.M.; IVANIOV, V.B. Plasmolysis as a tool to reveal lead localization in the apoplast of root cells. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v.49, p.283 – 285, 2002.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.17, n.1, p. 35 – 52, 2005.

SINGH, R.P. et al. Response of higher plants to lead contaminated environment. **Chemosphere**, Oxford, v.34, p.2467 – 2493, 1997.

SINHA, P. et al. Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead. **Chemosphere**, Oxford, v.65, p.651 – 656, 2006.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi – faceted molecule. **Plant Biology**, Victoria, v.3, p.229 – 235, 2000.

SOUZA, G.C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.90, p.135-143, 2004.

STEFANOV, K. et al. Accumulation of lead, zinc and cadmium in plant seeds growing in metalliferous habitats in Bulgaria. **Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 311–313, 1995.

TALENTI, E.C.J.; ORELLANA, J.A.; PRIANO, L.J.J. Aceite esencial de la *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabr: Sus componentes. **Anales da Sociedad Científica Argentina**, Buenos Aires, v.199, p.31 - 45, 1972.

Van ASSCHE, F; CLIJSTERS, H. Effects of metal on enzyme activity in plants. **Plant Cell Environmental**, Oxford, v.13, p.195 – 206, 1990.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Watsonville, v.164, p.645 – 655, 2003.

VOGEL-MIKUS, K. et al. Colonization of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. **Environmental Pollution**, Oxford, v.139, p.362 – 371, 2006.

WATANABE, M.E. Phytoremediation on the brink of commercialization. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 31, p. 182-186, 1997.

WIERZBICKA, M. Lead accumulation and its translocation barriers in roots of *Allium cepa* L. – autoradiographic and ultrastructural studies. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.10, p.17 – 26, 1987.

WIERZBICKA, M. Resumption of mitotic activity in *allium cepa* root tips during treatment with lead salts. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.34, p.173 – 180, 1994.

WIERZBICKA, M. How lead loses its toxicity to plants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Poland, v. 64, p.81 – 90, 1995.

WIERZBICKA, M. Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. **Environmental Pollution**, v.104, p.41- 52, 1999

WOWK, G.I.T.H. **Avaliação da contaminação do solo por chumbo proveniente da reciclagem de sucatas de baterias em área de várzea no município de Paula Freitas (PR)**. 2003. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

XIAO, W. et al. Effects of lead on activities of photochemical reaction and key enzymes of carbon assimilation in spinach chloroplast. **Biological Trace Element Research**, USA, v.126, p.269 – 279, 2008a.

XIAO, W. et al. Oxidative stress induced by lead in chloroplast of spinach. **Biological Trace Element Research**, USA, v. 126, p.257 – 268, 2008b.

XIONG, Z.T. Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. B. **Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 60, p.285 – 291, 1998.

XU, H.N.; XU, J.L. The effect of wheat by heavy metal pollution in soil ecosystem. **China Environmental Science**, v.13, p.367 – 371, 1993.

YANG, H.M.; ZHANG, X.Y.; WANG, G.X. Effects of heavy metal on stomatal movements in broad bean leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 51, p.464 – 468, 2004.

YANG, Y. et al. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, p.1019 – 1026, 2000.

ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A. Trypanocidal components of *Pluchea quitoc* L. **Phytotherapy Research**, West Sussex, v.8, p.375 – 377, 1994.