

RESPOSTA ANTIOXIDANTE, FORMAÇÃO DE FITOQUELATINAS E COMPOSIÇÃO DE PIGMENTOS FOTOPROTETORES EM *Brachiaria decumbens* Stapf SUBMETIDA À CONTAMINAÇÃO COM Cd E Zn

Fabiana Soares dos Santos

Departamento de Engenharia de Agronegócios, Universidade Federal Fluminense, Av. dos Trabalhadores, 420, 27255-125 Volta Redonda – RJ, Brasil

Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho e Nelson Mazur*

Departamento de Solos, Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 7, 23890-000 Seropédica – RJ, Brasil

Carlos Garbisu

Departamento de Ecosistemas, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Berreaga 1, E-48160 Derio, Bizkaia, Espanha

Oihana Barrutia y José María Becerril

Departamento de Biología Vegetal Y Ecología, Universidad del País Vasco, PO Box 644, E-48080 Bilbao, Espanha

Recebido em 4/11/09; aceito em 13/7/10; publicado na web em 16/11/10

ANTIOXIDATIVE RESPONSE, PHYTOCHELATIN PRODUCTION AND PHOTOPROTECTIVE PIGMENTS COMPOSITION OF *Brachiaria decumbens* Stapf PLANTS EXPOSED TO Cd AND Zn. In order to evaluate the response of *Brachiaria decumbens* Stapf to Cd and Zn, plants were hydroponically exposed to 50 and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cd and 500 and 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Zn. Metal content of shoots and roots was determined, as well as alterations in photosynthetic and photoprotective pigments, antioxidant metabolites and phytochelatin synthesis. Plants concentrated elevated levels of Cd and Zn, especially in roots. Zinc exposure negatively affected chlorophyll and β -carotene content, whereas the highest dose of Cd reduced VAZ cycle pigments and tocopherol levels in plant shoots. Cadmium was the maximum inducer of the phytochelatin synthesis pathway.

Keywords: phytoremediation; phytochelatin; tocopherol.

INTRODUÇÃO

As plantas diferem na sua habilidade em retirar, acumular e tolerar metais pesados, podendo ocorrer diferenças marcantes entre as espécies, entre variedades de uma mesma espécie e, também, nos tecidos da planta.¹ As plantas tolerantes a metais pesados têm mecanismos eficientes para restringir o excesso de metais pesados livres nos compartimentos celulares,² incluindo a exclusão, formação de peptídeos ricos em grupos tiólicos (fitoquelatinas e metalotioneínas), quelação por ácidos orgânicos e aminoácidos, compartimentalização de metal em estruturas subcelulares,³ além de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de proteção contra o estresse oxidativo.⁴ Alguns dos mais importantes antioxidantes são a glutatona reduzida (GSH), ascorbato (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E) e os carotenoides, que são encontrados nas plantas em altas concentrações.⁵

O aparato fotossintético é extremamente sensível a metais pesados.^{2,6} Os pigmentos primários são os que têm como principal finalidade a captação de energia luminosa, como a clorofila *a*, sendo também acompanhados de outros pigmentos acessórios como os carotenoides, que incluem os carotenos e as xantofilas, cuja função é, por um lado, ampliar o espectro de absorção dos pigmentos primários e, por outro, servir de proteção na dissipação de energia excedente.⁵

Brachiaria decumbens Stapf é uma espécie de planta nativa da África e amplamente cultivada nos trópicos. É caracterizada pela sua alta produção de biomassa, uso intensivo e elevada resistência a altas concentrações de alumínio no solo.⁷ Esta espécie apresenta potencial para se desenvolver em solos contaminados com Cd, Zn e Pb.⁸

Este trabalho teve como objetivo determinar a indução da resposta antioxidante, conteúdo de clorofila e de pigmentos fotoprotetores

em amostras de *B. decumbens* cultivadas e que foram submetidas a diferentes concentrações de Cd e Zn.

PARTE EXPERIMENTAL

Sementes de *B. decumbens* foram colocadas para germinar em mistura de perlita e vermiculita. Sessenta dias após a germinação, as plantas foram transferidas para vasos contendo solução nutritiva de Hoagland⁹ a metade da força iônica e modificada, conforme composição (em $\mu\text{mol L}^{-1}$): KNO_3 , 5044; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 1490; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 10; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 98,8; H_3BO_3 , 23,12; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 4,58; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,16; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,22; FeEDDHA, 10. Cinco dias após o transplante, a solução nutritiva foi enriquecida com 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd e 500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn, na forma de nitrato. As diferenças do conteúdo de nitrato entre os tratamentos foram compensadas pela adição de KNO_3 . O pH da solução nutritiva foi mantido em 5,5.

Raízes e folhas dessas plantas foram coletadas antes da contaminação e após 1, 3 e 6 dias da aplicação dos metais. Após a colheita, raízes e folhas foram pesadas e separadas. As raízes foram colocadas em solução aquosa de CaCl_2 10 mmol L^{-1} por 10 min e posteriormente lavadas com água desionizada. Parte do material foi separado para determinação de metais e o restante foi congelado em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenados a -80°C em ultrafreezer, até serem liofilizados.

O material separado para determinação de metais foi levado à estufa a 70°C até peso constante e foi feita digestão nitro-perclórica 6:1.¹⁰ As concentrações de Cd e Zn foram medidas em espectrômetro de absorção atômica, empregando-se chama de ar-acetileno e equipamento modelo Varian SpectraAA-250 Plus. As análises foram realizadas com limite de detecção de 0,0022 e 0,0012 mg L^{-1} para Cd e Zn, respectivamente;

*e-mail: nelmazur@ufrj.br

limite de quantificação de 0,025 para Cd e Zn; e comprimento de onda de 228,8 e 213,9 nm para Cd e Zn, respectivamente.

A extração e estimativa do conteúdo dos compostos tiólicos foi realizada de acordo com Hernández-Allica *et al.*¹¹ Fitoquelatinas (PC) e tioles de baixa massa molar, como glutatona reduzida (GSH), foram analisados por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE), usando um equipamento Waters (Milford, MA, USA) equipado com um autoinjeter 717 Plus, detector de fotodiodos PDA 996 e detector de fluorescência SFD 474. Todo o sistema cromatográfico foi controlado pelo software Milenium, com longitude de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 470 nm. A cromatografia foi realizada em uma coluna Nova-Pak C18 (3,9 mm x 150 mm, 4 µm).

A fase móvel foi composta por solvente A, metanol (100%) e solvente B, água:metanol:ácido acético (89,75:10:0,25). PC e GSH foram separadas a uma temperatura de 25 °C em 36 min, usando-se o seguinte gradiente de eluição da fase móvel: 0-15 min, 0-4,5% de solvente A; 15-22 min, 4,5-40% de solvente A; 22-26 min, 40-100% de solvente A; 26-32 min, 100-0% de solvente A; 32-36 min, 100% de solvente B. O fluxo dos solventes foi de 1,5 mL min⁻¹.

O conteúdo total de fitoquelatinas foi estimado como um total dos sinais individuais de cada fitoquelatina e expresso em nmolGSH g⁻¹PS (peso seco), baseado na área do padrão de glutatona reduzida.¹¹

Para análise de ascorbato reduzido (AsA) e de-hidroascorbato (DHA), 0,15 g de amostra de raízes e folhas foram extraídas com nitrogênio líquido em almofariz de ágata previamente resfriado. Posteriormente, foi homogeneizado em 2,25 mL de uma solução contendo 3% de HCl e EDTA 1 mmol L⁻¹. O extrato foi centrifugado a 15000 g durante 5 min e 200 µL do sobrenadante foram neutralizados com 600 µL de água ultrapura e 200 µL de tampão succinato (succinato 1 mol L⁻¹ + KOH 0,5 mol L⁻¹).¹² A forma reduzida do ascorbato foi medida em espectrofotômetro por um decréscimo na absorvância a 265 nm após adição de 10 unidades mL⁻¹ de ascorbato oxidase, e a forma oxidada (de-hidroascorbato) pelo aumento na absorvância em 265 nm após redução com 20 µL de ditiotreitolo 100 mmol L⁻¹.

Para análise de pigmentos fotossintéticos e tocoferol foram coletadas amostras de folha em discos de 5 mm de diâmetro, antes de amanhecer o dia, sendo congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para análise. A extração foi realizada utilizando-se um homogeneizador elétrico modelo Tissue Tearor 985370 a 5000 rpm com 1 mL de acetona a 100%. Os extratos foram centrifugados a 13200 rpm a 4 °C durante 20 min e o sobrenadante foi recolhido e passado por filtro de 0,22 µm de malha para análise. A quantificação de pigmentos fotossintéticos e tocoferol foi feita por CLAE, controlada pelo programa Empower Pro (Waters Corporation, USA). A cromatografia foi feita em uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS-1 (5 µm, 4,6 mm x 250 mm; Waters, Irlanda) precedida de uma pré-coluna Nova-Pak C-18 (4 µm, 3,9 mm x 20 mm; Waters, Irlanda).^{13,14} A pressão do sistema foi de aproximadamente 800 psi e o volume de injeção foi de 15 µL. A fase móvel foi composta de dois solventes, sendo o solvente A: acetato de etila:metanol:tampão Tris-HCl (0,1 mol L⁻¹; pH 8) (84:2:14) e o solvente B: metanol:acetato de etila (68:32). Os pigmentos e tocoferol foram separados em 16 min, usando-se um gradiente linear de 100% de solvente A até 100% de solvente B nos 10 primeiros min, seguidos de uma eluição de 100% de solvente B por 6 min. Em seguida, se estabeleceu um gradiente linear de 1 min de 100% de solvente B a 100% de solvente A, e se manteve uma eluição de 100% de solvente A durante os próximos 8 min para reequilibrar a coluna até a análise da amostra seguinte. O fluxo dos solventes foi de 1,2 mL min⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento na concentração de metais pesados nas plantas foi cor-

relacionado com a dose e o tempo de exposição aos metais estudados (Figura 1). As plantas apresentaram maiores concentrações de Zn e Cd após 6 dias de exposição a 100 µmol L⁻¹ de Cd e 2000 µmol L⁻¹ de Zn.

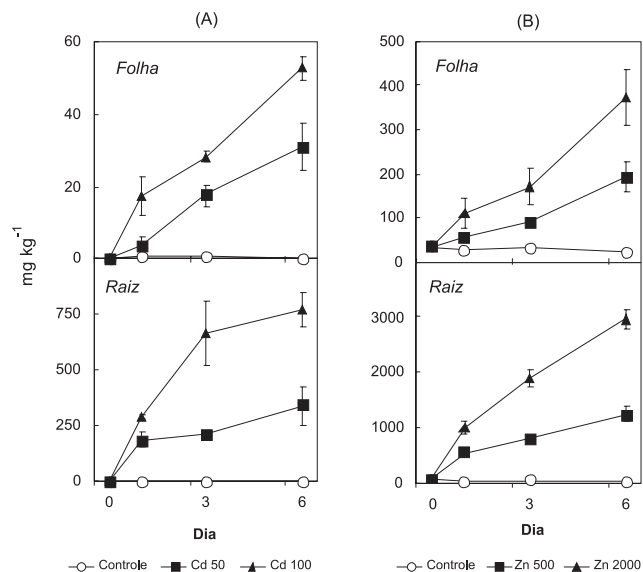


Figura 1. Concentrações de Cd (A) e Zn (B) nas plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes doses de Zn e Cd em solução nutritiva. As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em µmol L⁻¹. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições ± erro padrão

As raízes foram o principal local de acúmulo de metais pesados nas plantas, a partir do primeiro dia de exposição ao metal. Com relação ao Cd, os resultados mostraram que as raízes acumularam aproximadamente 10 vezes mais metal que a parte aérea nas doses estudadas, enquanto que para o Zn, aproximadamente 5 vezes mais. Devido à principal entrada de metais pesados ocorrer pelas raízes, as plantas tendem a concentrar as maiores concentrações de metais pesados nesse órgão.¹⁵

Os níveis de GSH reduziram a partir do primeiro dia de exposição ao metal, tanto na parte aérea (Figura 1S, material suplementar) como nas raízes (Figura 2), com exceção do tratamento Zn 500 µmol L⁻¹, no qual houve uma indução nesses níveis, nas folhas, nas primeiras 24 h de exposição ao metal, reduzindo os níveis após esse período (Figura 1S, material suplementar). Esse decréscimo provavelmente ocorreu devido ao uso desses compostos na formação de fitoquelatinas. A geração de estresse oxidativo por metais pesados pode ser explicada pela redução na capacidade antioxidante da planta, em virtude da redução nos níveis de GSH para a biossíntese de fitoquelatinas.¹⁶⁻¹⁸ A redução nos níveis de GSH pode ser também explicada pela sua ação quelante com metais pesados.¹⁹

A redução de GSH ocorreu de maneira mais acentuada na parte aérea das plantas, principalmente no 6º dia de exposição aos metais estudados (Figura 1S, material suplementar). Considerando que esses compostos podem ser translocados pelos vasos condutores, pode-se considerar que parte desses antioxidantes formados nas folhas pode ter sido translocado para as raízes para a formação de fitoquelatinas, devido aos maiores teores de metais pesados nessa parte da planta (Figura 1).

A síntese de fitoquelatinas foi influenciada pelo tipo e tempo de exposição ao metal (Figura 2). A maior resposta à contaminação relacionada à síntese de fitoquelatinas foi com o Cd, sendo que as plantas desses tratamentos formaram uma maior quantidade de fitoquelatinas em relação aos metais, principalmente na raiz. Cádmio é considerado o mais forte indutor na síntese de fitoquelatinas em muitas plantas²⁰ e o mais efetivo ativador da fitoquelatina sintase.²¹

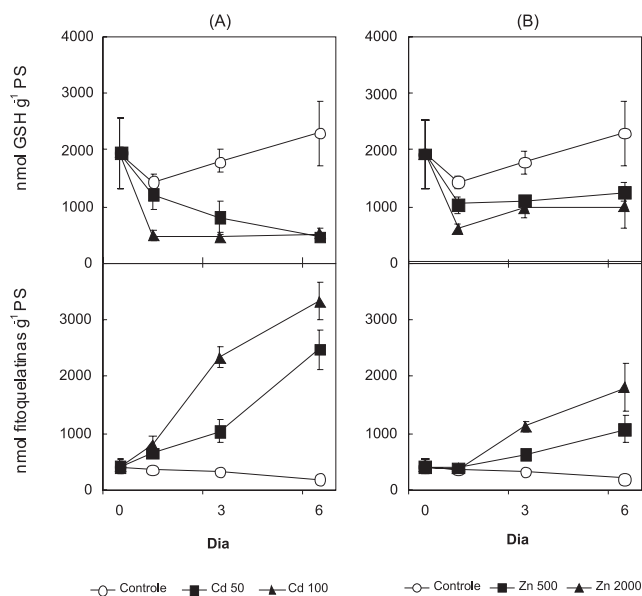


Figura 2. Teores de glutatona reduzida (GSH) e fitoquelatinas nas raízes das plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes tratamentos com Cd (A) e Zn (B). As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão

A produção de fitoquelatinas respondeu à concentração de metal presente na solução nutritiva. As maiores doses de Cd e Zn aplicadas, 100 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, acumularam uma maior quantidade de fitoquelatinas nas raízes quando comparadas às menores doses, 50 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Nas folhas das plantas de braquiária, fitoquelatinas foram induzidas pela exposição aos metais em uma quantidade muito menor que nas raízes, devido provavelmente à maior quantidade de metal acumulado nas raízes. As fitoquelatinas são peptídeos sintetizados enzimaticamente, sendo essa enzima estimulada pela concentração de metal livre presente na célula.²²

Foi observada produção de fitoquelatinas a partir do 1º dia para todos os metais nas raízes, no entanto, a maior produção ocorreu no 6º dia de exposição aos metais. A alta persistência de fitoquelatinas sugere que esses compostos podem ter um papel importante no processo de desintoxicação de íons metálicos nessas plantas. No entanto, os altos níveis de metal acumulados na raiz em relação à capacidade quelante das fitoquelatinas produzidas indicam que esses compostos não seriam suficientes para justificar a quelação de metal nesse órgão.

Em estudos de produção de fitoquelatinas pela hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens* em solução nutritiva contaminada com diferentes doses de Cd, foram encontrados níveis de fitoquelatinas semelhantes aos encontrados em *B. decumbens*. Isso demonstra que o papel das fitoquelatinas pode estar mais relacionado com a tolerância ou homeostase a metais do que com a capacidade hiperacumuladora.¹¹

Tanto na raiz como na parte aérea das plantas foram encontradas elevadas quantidades de um composto não identificado, com tempo de retenção próximo ao da glutatona. Existem claros resultados que plantas da família Poaceae apresentam, além da glutatona, uma substância homóloga chamada hidroximetil-glutatona (hm-GSH), presente em algumas plantas da família Poaceae, como o arroz.²³ Esses dados sugerem que a *B. decumbens* também pode apresentar esse composto, por ser uma planta da família Poaceae.

Com relação aos níveis de ascorbato (Figura 3), observa-se que Cd e Zn induziram a resposta antioxidante pelo aumento de AsA na raiz até o 3º dia de tratamento com os metais, reduzindo os níveis a partir desse dia, provavelmente, devido à redução nos níveis de GSH.

O GSH é o responsável pela reciclagem de ascorbato da forma oxidada para a reduzida pela enzima de-hidroascorbato redutase.²⁴ Assim, os teores de ascorbato oxidado (DHA) foram maiores nos tratamentos com metais quando comparados ao controle, provavelmente, devido ao uso do AsA nos processos antioxidantes, transformando o AsA em monode-hidroascorbato, que irá dismutar para de-hidroascorbato (DHA) e ascorbato. A geração do estresse oxidativo por metais pesados pode explicar a redução da capacidade antioxidante da planta, devido à redução nos níveis de glutatona para a síntese de fitoquelatinas.²⁵

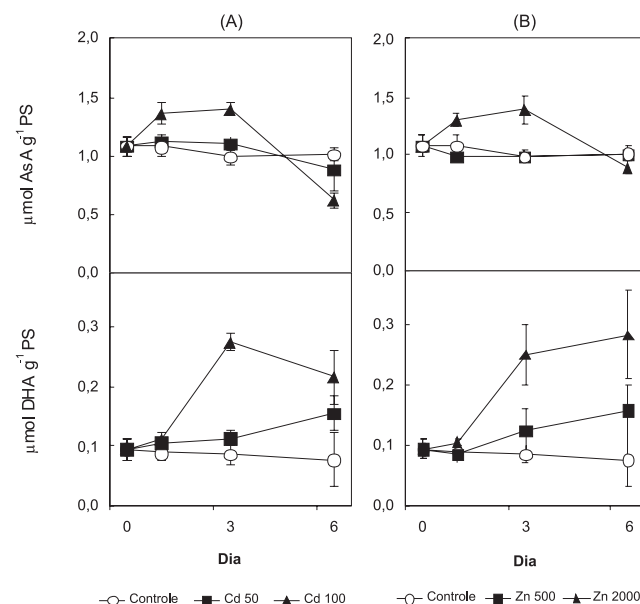


Figura 3. Teores de ascorbato reduzido (AsA) e de-hidroascorbato (DHA) nas raízes das plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes doses de Cd (A) e Zn (B). As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão

No entanto, a depleção de AsA, a partir do 3º dia de exposição ao Zn e Cd, não foi proporcional ao aumento nos níveis de DHA (Figura 3). A depleção de AsA sem mudança no estado redox pelo excesso de metais pesados também já foi observada em plantas de feijão²⁶ e cevada.²⁷

Tem sido reportado que o ascorbato é a principal fonte de ácido oxálico em muitas espécies²⁸ e a imobilização do excesso de metais pesados por oxalato tem sido sugerida como um mecanismo de desintoxicação a metais pesados.²⁹ Dessa forma, uma possível explicação para a redução nos níveis de ascorbato poderia ser um aumento na síntese de oxalato à custa de ácido ascórbico.

A contaminação com Zn e Cd também estimulou a produção de tocoferol (Figura 4) nos diferentes tratamentos, quando comparados ao controle, com exceção do tratamento Cd 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, devido provavelmente à sua grande toxicidade, o que causou grande estresse na planta e, conseqüentemente, uma diminuição significativa nos níveis de tocoferol.³⁰ Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com plantas de *Lemna minor* exposta a Cd e Zn por 9 dias, cujos níveis de α -tocoferol aumentaram, gradualmente, até o 6º dia de exposição aos metais.³¹

O tocoferol é capaz de eliminar peróxidos, formando radicais tocoferoxil. Os radicais tocoferoxil podem ser reciclados em tocoferol mediante ascorbato e GSH; desta forma, a redução nos níveis de tocoferol observada no tratamento Cd 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, possivelmente, deveu-se à rápida e grande redução de GSH nesse tratamento.

Danos no sistema fotossintético estão refletidos na redução dos níveis de clorofila e carotenoides, como de β -caroteno pela contaminação com Cd e Zn (Figura 5).

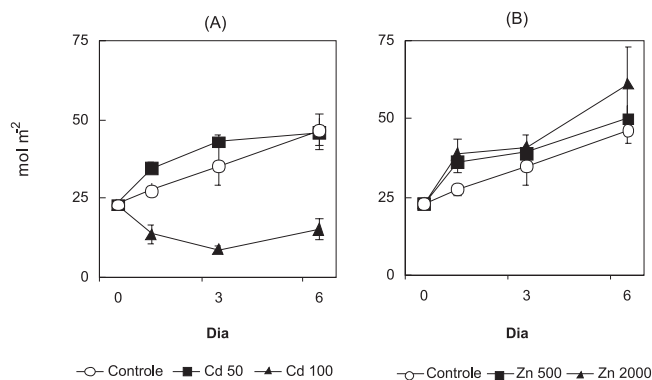


Figura 4. Produção de tocoferol em folhas de *B. decumbens* submetidas a diferentes doses com Cd (A) e Zn (B). As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão

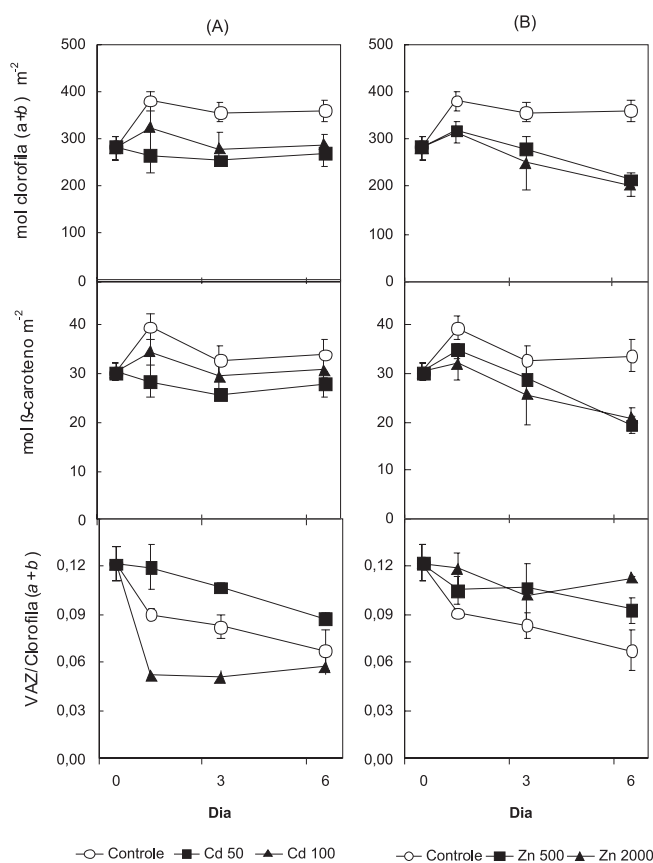


Figura 5. Teores de clorofila (a + b), β -caroteno e VAZ/clorofila (a + b) em folhas de *B. decumbens* submetidas a diferentes doses com Cd (A) e Zn (B). As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão. VAZ: pigmentos do ciclo das xantofilas (violaxantina, anteraxantina e zeaxantina)

Os resultados indicam que o conteúdo de clorofila *a + b* decresceu do controle para os tratamentos. A redução foi maior nos tratamentos contendo Zn quando comparados ao Cd, principalmente no 6º dia de exposição aos metais. Esses resultados confirmam que essa espécie foi mais sensível ao estresse causado pelo Zn do que pelo Cd nas doses estudadas.

O decréscimo do conteúdo de clorofila tem sido observado em várias espécies de plantas devido à contaminação com metais pesados,^{32,33} especialmente Zn que, frequentemente, inibe processos

metabólicos através da inibição da ação de enzimas. O decréscimo no conteúdo de clorofila associado com o estresse de metais pesados pode ser resultado da inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese de clorofila.³⁴

A expressão de sintoma de clorose foi relacionada com o elevado conteúdo de metal nas folhas (Figura 1) e correspondeu a um decréscimo em ambas as concentrações de clorofila *a* e *b* (Figura 5), confirmando que o Zn e o Cd foram danosos ao aparato fotossintético da planta.

A concentração de β -caroteno, que apresentou um comportamento semelhante ao conteúdo de clorofila *a + b*, também foi menor em todos os tratamentos quando comparados ao controle, principalmente nas doses de Zn no 6º dia de exposição ao metal, confirmando danos no sistema fotossintético das plantas após a contaminação. O β -caroteno é um eficiente agente de detoxicação de O₂. Os carotenoides participam do sistema de antenas dos cloroplastos, na absorção de luz e transferência de energia para os centros das reações. Também podem dissipar energia durante o estresse fotooxidativo.³⁵

A relação VAZ (pigmentos do ciclo da xantofila – violaxantina, anteraxantina e zeaxantina)/clorofila aumentou ligeiramente quando comparada ao controle (Figura 5), indicando uma resposta fotoprotetora do sistema fotossintético em resposta ao estresse provocado pela contaminação.³¹ O tratamento com Cd 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi uma exceção, porque apresentou níveis muito baixos desses compostos fotoprotetores, devido provavelmente à toxicidade dessa dose aplicada.

CONCLUSÕES

A produção de fitoquelatinas e compostos antioxidantes (ascorbato e tocoferol) foi superior nos tratamentos com metais pesados quando comparados ao controle, mostrando uma resposta antioxidante dessas plantas quando submetidas à contaminação com metais pesados, sendo que o Cd foi o mais forte indutor de fitoquelatinas. A única exceção foi em relação à glutatona reduzida (GSH), já que seus níveis reduziram, provavelmente, devido à sua utilização para a síntese de fitoquelatinas.

Foram observados danos no sistema fotossintético das plantas após contaminação com Cd e Zn, principalmente pela redução nos níveis de clorofila e β -caroteno.

O estudo demonstrou que a *B. decumbens* foi uma espécie vegetal tolerante aos metais Cd e Zn, acumulando concentrações moderadas dos mesmos em seus tecidos foliares (Figura 2S, material suplementar). No entanto, estudos adicionais são necessários visando melhor compreensão do mecanismo adaptativo da planta em resposta ao estresse provocado pelo excesso de Cd e Zn.

MATERIAL SUPLEMENTAR

O material suplementar, disponível em <http://quimicanova.sbgq.org.br>, em arquivo PDF e com acesso livre, traz figuras que mostram os teores de glutatona reduzida (GSH) e fitoquelatinas nas folhas das plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes tratamentos com Cd e Zn (Figura 1S) e os teores de ascorbato reduzido (AsA) e de-hidroascorbato (DHA) nas folhas das plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes doses de Cd e Zn (Figura 2S).

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro do CNPq e do projeto de pesquisa ETOR-TEK- BERRILUR-III-IE09-242 (Governo Basco, Espanha). Os autores gostariam de agradecer também ao Dr. J. I. García-Plazaola por seu envolvimento na metodologia de CLAE.

REFERÊNCIAS

1. Santos, F. S.; Amaral Sobrinho, N. M. B.; Mazur, N. Em *Nutrição Mineral de Plantas*; Fernandes, M. S., ed.; SBCS: Viçosa, 2006, cap. 16.
2. Pongrac, P.; Zhao, F. J.; Razinger, J.; Zrimec, A.; Regvar, M.; *Environ. Exp. Bot.* **2009**, *66*, 479.
3. Clemens, S.; *Planta* **2001**, *212*, 475.
4. Wang, C.; Zhang, S. H.; Wang, P. F.; Hou, J.; Zhang, W. J.; Li, W.; Lin, Z. P.; *Chemosphere* **2009**, *75*, 1468.
5. Demming-Adams, B.; Adams, W. W.; *Plant Physiol.* **1993**, *103*, 1413.
6. Küpper, H.; Zhao, F.; McGrath, S. P.; *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 305.
7. Wenzl, P.; Patiño, G. M.; Chaves, A. L.; Mayer, J. E.; Rao, I. M.; *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 1473.
8. Santos, F. S.; Hernández-Allica, J.; Becerril, J. M.; Amaral Sobrinho, N. M. B.; Mazur, N.; Garbisu, C.; *Chemosphere* **2006**, *65*, 43.
9. Hoagland, D. R.; Arnon, D. I.; *Col. Agric. Exp. Stn. Circ.* **1950**, *347*, 1.
10. Tedesco, M. J.; Gianello, C.; Bissani, C. A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S. J.; *Análise de solo, plantas e outros materiais*, 2ª ed., UFRGS: Porto Alegre, 1995.
11. Hernández-Allica, J.; Garbisu, C.; Becerril, J. M.; Barrutia, O.; García-Plazaola, J. I.; Zhao, F. J.; McGrath, S. P.; *Plant Cell Environ.* **2006**, *29*, 1422.
12. García-Plazaola, J. I.; Artetxe, U.; Becerril, J. M.; *Plant Sci.* **1999**, *143*, 125.
13. García-Plazaola, J. I.; Becerril, J. M.; *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 1.
14. García-Plazaola, J. I.; Becerril, J. M.; *Australian J. Plant Physiol.* **2001**, *28*, 225.
15. Orroño, D. I.; Lavado, R. S.; *Revista Internacional de Botánica Experimental* **2009**, *78*, 75.
16. Dixit, V.; Pandey, V.; Shyam, R.; *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 1101.
17. Piqueras, A.; Olmos, E.; Martínez-Solano, J. R.; Hellín, E.; *Free Radical Res.* **1999**, *31*, 33.
18. Kubota, H.; Sato, K.; Yamada, T.; Maitani, T.; *Plant Sci.* **1995**, *106*, 157.
19. Pawlik-Skowronska, B.; *Aquat. Toxicol.* **2003**, *62*, 155.
20. Tsuji, N.; Hirayanagi, N.; Iwabe, O.; Namba, T.; Tagawa, M.; Miyamoto, S.; Miyasaka, H.; Takagi, M.; Hirata, K.; Miyamoto, K.; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 453.
21. Zenk, M. H.; *Gene* **1996**, *179*, 21.
22. Cobbett, C.; Goldsbrough, P.; *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 159.
23. Klapheck, S.; Fliegner, W.; Zimmer, I.; *Plant Physiol.* **1994**, *104*, 1325.
24. Loewus, F. A. Em *The Biochemistry of Plants*; Preiss, J., ed.; Academic Press: New York, 1988, cap. 3.
25. Sandalio, L. M.; Dalurzo, H. C.; Gómez, M.; Romero-Puertas, M. C.; del Río, L. A.; *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 2115.
26. González, A.; Steffen, K. L.; Lynch, J.; *Plant Physiol.* **1998**, *118*, 493.
27. Demirevska-Kepova, K.; Simova-Stoilova, L.; Stoyanova, Z.; Hölzer, R.; Feller, U.; *Environ. Exp. Bot.* **2004**, *52*, 253.
28. Smirnov, N.; *Curr. Opin. Plant Biol.* **2000**, *3*, 229.
29. González, A.; Lynch, J.; *Aust. J. Plant Physiol.* **1999**, *26*, 811.
30. Munné-Bosch, S.; Alegre, L.; *Crit. Rev. Plant Sci.* **2002**, *21*, 3.
31. Artetxe, U.; García-Plazaola, J. I.; Hernández, A.; Becerril, J. M.; *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 859.
32. Oncel, I.; Keles, Y.; Ustun, A. S.; *Environ. Pollut.* **2000**, *107*, 315.
33. Mobin, M.; Khan, N. A.; *J. Plant Physiol.* **2007**, *164*, 601.
34. Stobart, A. K.; Griffiths, W. T.; Ameen-Bukhari, I.; Sherwood, R. P.; *Plant Physiol.* **1985**, *63*, 293.
35. Baker, C. J.; Orlandi, E. W.; *Annu. Rev. Phytopathol.* **1995**, *33*, 299.