



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**

---

---

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**TESIS**

**FITORREMEDIACIÓN DE PLOMO POR *Acacia farnesiana* (L)  
Willd EN CULTIVOS *in vitro* Y DETERMINACIÓN DE  
ENZIMAS ANTIOXIDANTES INVOLUCRADAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

E S P E C I A L I S T A E N  
B I O T E C N O L O G Í A

P R E S E N T A

**ASMAVETH SOLIS IBARRA**

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. TANIA L. VOLKE SEPÚLVEDA

LECTOR DE TESIS  
DR. ERNESTO FAVELA TORRES

México D.F. a 31 de julio del 2009

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**FITORREMEDIACIÓN DE PLOMO POR *Acacia farnesiana* (L) Willd**  
**EN CULTIVOS *in vitro* Y DETERMINACIÓN DE ENZIMAS**  
**ANTIOXIDANTES INVOLUCRADAS**

Que presentó

Asmaveth solis Ibarra

Comité tutorial:

Directora: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Lector: Dr. Ernesto Favela Torres

*Gracias Dios por todo lo que me diste en este tiempo, gracias por los días de sol y los nublados tristes. Gracias por las noches tranquilas y las inquietas horas oscuras. Gracias por la salud y la enfermedad. Gracias por las penas y las alegrías. Gracias por todo lo que me prestaste y después me pediste. Gracias por la sonrisa amorosa y la mano amiga. Por el amor y todo lo hermoso y dulce, por los amigos y por esos seres que me dieron vida. Gracias por la Soledad, por el trabajo, por las dificultades, las lágrimas y las tristezas, gracias por todo aquello que me hizo pensar más en ti.*

*Pero sobre todo Gracias por darme la oportunidad de vivir en este mundo maravilloso.*

# *Dedicatoria*

*A mi familia:*

*A mi mamá y papá*

*Por darme la vida*

*A Carlitos*

*Por ser la alegría de la casa*

*A Ana*

*Porque la quiero mucho*

*A Agre y Erick*

*Por darme cariño, apoyo y por consentirme*

*Cuando volteo a mí alrededor veo lo afortunada que soy.*

## *Dedicatoria*

*A mi otra familia:*

*Gaby y Cinthya*

*Por su paciencia, ayuda y consejos  
Por enseñarme a ver la vida  
de otra manera. Por escucharme y  
entenderme.*

*A todos mis amigos*

*Por darme la oportunidad de  
Conocerlos, por su amistad, ayuda  
y apoyo incondicional.*

*Cuando volteo a mí alrededor veo lo afortunada que soy.*

## **Agradecimientos**

*Gracias a mis padres por apoyarme en todo lo que hago y sustentar mis estudios.*

*A mi maestra la Dra. Tania por su gran ayuda, consejos, consideraciones, paciencia y por creer en mí.*

*Al Dr. Mariano por su apoyo, su ayuda y sus consejos, por darme la oportunidad de formar parte de sus estudiantes de laboratorio.*

*Al Dr. Favela por sus críticas y ayuda en la revisión de esta tesis.*

*A mis compañeros del laboratorio: Fátima, Marianela, Cesar, Miri, Areli, Nancy, Oli, Manuel, Pedro, Amalia, Gloria, Lili, Daniel, Chayo, Bety, Guille, Victor y Ady. Por su ayuda cuando la necesite.*

*A mis amigos: Gabyta, Cinthys, Isa, Viole, Yanis, Fatima, Adrys, Toño, Luis, Floresita, Eli, July, Ali, Fatima, Paty, Mari, Cesarin, gracias por estar conmigo en momentos importantes de mi vida.*

*Al ICyTDF por el apoyo brindado a través del otorgamiento de beca*

## Índice

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>9</b>
2.1. Fitorremediación de suelos contaminados con metales	9
2.2. El plomo como contaminante ambiental	12
2.3. Efectos de los metales pesados en las plantas	13
2.4. Acacia farnesiana (L.) Willd.	22
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
3.1. Objetivo general	25
3.2. Objetivos específicos	25
<b>4. MÉTODOS Y MATERIALES</b>	<b>26</b>
4.1. Obtención de plántulas en condiciones in vitro	26
4.2. Obtención de extractos enzimáticos	27
4.3. Determinación de actividades enzimáticas	27
4.4. Cuantificación de metales en tejido vegetal	29
4.5. Potencial de fitorremediación	31
4.6. Análisis estadístico	31
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
5.1. Determinación de las condiciones de digestión ácida	32
5.2. Obtención de extractos enzimáticos	33
5.3. Efecto del plomo en la actividad de enzimas antioxidantes	34
5.4. Efecto del Pb en el crecimiento de A. farnesiana	38
5.5. Acumulación de plomo por A. farnesiana	42
5.6. Actividad de enzimas antioxidantes y acumulación de Pb	44
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Inducción de peroxidasas en diferentes órganos de plantas superiores bajo condiciones de cantidades tóxicas de metales.....	20
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>Acacia farnesiana</i> .....	24
<b>Tabla 3.</b> Mezclas de reacción probadas durante el montaje del método particular para la determinación de la actividad guaiacol-peroxidasa con un extracto enzimático crudo (EEC).....	28
<b>Tabla 4.</b> Mezclas de reacción probadas durante el montaje del método particular para la determinación de la actividad catalasa con un extracto enzimático crudo (EEC).....	29
<b>Tabla 5.</b> Condiciones evaluadas para definir las condiciones de la digestión ácida para la extracción de plomo de muestras vegetales.....	30
<b>Tabla 6.</b> Plomo extraído de muestras de tejidos de <i>A. farnesiana</i> en función de las condiciones de digestión ácida asistida por microondas .....	32
<b>Tabla 7.</b> Efecto del Pb en el crecimiento e Índice de tolerancia (IT) de plantas de <i>Acacia farnesiana</i> en función del tiempo de crecimiento.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema general de los procesos de fitorremediación aplicados a suelos contaminados con metales pesados.....	10
<b>Figura 2.</b>	Diagrama general de las reacciones de enzimas antioxidantes (CAT, POX, POD) y moléculas antioxidantes (GSH y ASC) en presencia de iones metálicos y su ubicación en la célula.....	17
<b>Figura 3.</b>	<i>Acacia farnesiana</i> crecida en condiciones naturales en sitios de disposición de jales de la Mina “De Rayas” ubicada en el Estado de Guanajuato.....	23
<b>Figura 4.</b>	Cantidad de proteína extraída en función del tiempo de tratamiento en un molino de perlas y con N <sub>2</sub> líquido .....	33
<b>Figura 5.</b>	Datos utilizados para la obtención de K <sub>M</sub> y V <sub>max</sub> . (a) Actividad catalasa en función de la concentración de sustrato (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ); (b) tratamiento de datos por el método de Lineweaver-Burk.....	34
<b>Figura 6.</b>	Actividad catalasa medida en función de la cantidad de extracto enzimático crudo adicionado en la mezcla de reacción. ....	35
<b>Figura 7.</b>	Actividad enzimática específica de CAT en la parte aérea (a) y raíz (b) de <i>A. farnesiana</i> en función del tiempo de crecimiento.....	36
<b>Figura 8.</b>	Actividad enzimática específica de GPX en la parte aérea (a) y raíz (b) de <i>A. farnesiana</i> en función del tiempo de crecimiento.....	38
<b>Figura 9.</b>	Efecto del Pb (100 mg·L <sup>-1</sup> ) en el crecimiento de <i>A. farnesiana</i> durante 60 días en condiciones <i>in vitro</i> .....	40
<b>Figura 10.</b>	Acumulación de Pb en brotes y raíz de <i>A. farnesiana</i> del tiempo de cultivo <i>in vitro</i> en una concentración de 100 mg·Pb L <sup>-1</sup> .....	42
<b>Figura 11.</b>	Relación entre el factor de translocación (FT) y la acumulación de Pb en brotes y raíces en función del tiempo de crecimiento en cultivos <i>in vitro</i> .....	44
<b>Figura 12.</b>	Relación entre el factor de translocación (FT) y actividad GPX en parte aérea y raíces en función del tiempo de crecimiento en cultivos <i>in vitro</i> .....	45

## ABREVIATURAS

ASC	Acido ascórbico
APX	Ascorbato peroxidasa
CAT	Catalasa
Cd	Cadmio
Cu	Cobre
EAA	Espectroscopia de Absorción Atómica
EEC	Extracto enzimático crudo
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EPT	Elementos potencialmente tóxicos
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FT	Factor de translocación
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GSH	Glutati6n
GPX	Guaiacol peroxidasa
GPx	Glutati6n peroxidasa
HNO <sub>3</sub>	Acido nítrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Per6xido de hidr6geno
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
IT	Índice de tolerancia
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
Kg	Kilogramo
KOH	Hidr6xido de potasio
Ni	Níquel
N <sub>2</sub>	Nitr6geno liquido
nm	Nan6metros
MDA	Malato deshidrogenasa
mg	Miligramo
mM	Mili molar
MS	Murashige y Skoog (medio de cultivo)
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
Na <sub>2</sub> EDTA	Disodio etilendiaminotetraacético
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de sodio
O <sub>2</sub>	Oxigeno singlete
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ani6n super6xido
•OH	Ion hidroxilo
Pb	Plomo
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Nitrato de plomo
POX	Peroxidasa
ppm	Partes por mill6n (mg·kg <sup>-1</sup> )
V <sub>max</sub>	Velocidad m6xima
Zn	Zinc
ε	Coeficiente de extinci6n molar
μL	Micro litros

## RESUMEN

La fitorremediación surge como alternativa biológica para la limpieza de sitios contaminados. El Pb, junto con otros metales pesados, es un elemento potencialmente tóxico (EPT) que se encuentra dentro de los principales contaminantes ambientales. Los EPT pueden ser degradados, removidos y/o estabilizados por las plantas (fitorremediadoras). Sin embargo, los EPT pueden tener efectos fitotóxicos en las plantas provocando estrés oxidativo mediante la sobre producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que causan graves daños celulares. Las enzimas antioxidantes como las catalasas y las peroxidasas son sistemas de defensa que tienen las plantas para reducir a las ERO a formas menos tóxicas. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de *Acacia farnesiana* para acumular y translocar plomo en cultivos *in vitro*, así como determinar la actividad de enzimas antioxidantes en presencia de plomo. Las semillas fueron sembradas en cultivos *in vitro* en medio Murashige y Skoog (MS) con sacarosa y plomo ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Las plantas fueron cosechadas después de 5, 10, 20, 40 y 60 días de crecimiento y utilizadas para la obtención de extractos enzimáticos y determinar las actividades enzimáticas guaiacol-peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) y para cuantificar el Pb en el tejido vegetal, éste se determinó mediante espectrometría de absorción atómica (EAA). Durante los 60 días de crecimiento de las plantas, se observó mayor acumulación de Pb en la parte aérea de la planta ( $597 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 116$ ) respecto a la de las raíces ( $180 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm 68$ ). Los resultados muestran de 4-6 unidades más actividad GPX en las plantas que crecieron en presencia de plomo respecto a las plantas testigo, tanto en raíz como en la parte aérea obteniendo de 1 a 5  $\text{U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$  y 3 a 6  $\text{U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$  respectivamente, además la actividad presenta un aumento conforme transcurre el tiempo de crecimiento hasta los 40 días. En cuanto a la actividad CAT no se observan diferencias significativas tanto por efecto del Pb como por el tiempo de crecimiento, encontrándose valores de 1 a 6  $\text{U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$  en brotes y de 2 a 7  $\text{U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$  en raíces. El Pb estimula la actividad GPX pero no la actividad CAT. Se considera a *A. farnesiana* como una planta potencialmente fitorremediadora.

# **Capítulo 1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados como Cu, Cd, Ni, Pb y Zn son importantes contaminantes del medio ambiente, y se consideran potencialmente tóxicos, mutágenos y cancerígenos (Sharma *et al.*, 2005). Las fuentes de contaminación por estos elementos potencialmente tóxicos (EPT) son múltiples e incluyen a la industria minera, actividades industriales, metalurgia, fertilización y la eliminación de desechos, entre otras. Todas estas actividades son fuente de riesgos para la salud y el medio ambiente (Gardea-Torresdey, 2005). Una alternativa para el tratamiento de sitios contaminados con EPT es la fitorremediación, que implica el uso de plantas y los microorganismos de su rizósfera para degradar, remover y/o estabilizar contaminantes en suelos, sedimentos y en la atmósfera (Chaney *et al.*, 1997; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Varios autores señalan que el uso de especies vegetales que hiperacumulan EPT en sus partes aéreas y las plantas exclusoras que acumulan altas concentraciones de EPT en sus raíces, puede ser una alternativa económica y ecológica para la remediación de estos sitios (Cosio *et al.*, 2004; Prasad y Freitas, 2003); dichos mecanismos se conocen como fitoextracción y fitoestabilización.

La identificación de nuevas especies tolerantes e hiperacumuladoras demuestra que las plantas tienen potencial genético para la limpieza de sitios contaminados con metales tóxicos. Sin embargo, los avances en este campo son obstaculizados por una serie de factores, entre los cuales se encuentran las estrategias de detoxificación y tolerancia a metales tóxicos por las especies vegetales susceptibles de ser utilizadas.

Los EPT pueden provocar efectos fitotóxicos en las plantas (EPA, 2006). De hecho, se considera que éstos son una fuente potencial de estrés oxidativo debido a que propician la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO incluyen iones, radicales libres y peróxidos tanto orgánicos como inorgánicos; entre éstas se encuentra el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), entre otras. Estas ERO son producidas por la fotorreducción del oxígeno molecular en los cloroplastos, produciéndose el radical superóxido ( $O_2^-$ ); la dismutación de este anión produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y la reacción del superóxido y el peróxido puede crear radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). Estos radicales causan la inactivación de enzimas, blanqueo de pigmentos, peroxidación de lípidos y degradación de proteínas (Olivares *et al.*, 2002). Para evitar que las ERO produzcan daños las plantas han desarrollado, en el curso de la evolución, una serie de mecanismos de defensa a través de sistemas antioxidantes. Dichos sistemas están compuestos por metabolitos, como ascorbato, glutatión y tocoferol, así como por enzimas,

como la superóxido dismutasa, la catalasa y las peroxidasas, que atacan las ERO (Schützendübel y Polle, 2002).

Por las razones anteriores, en el presente estudio se propuso como objetivo general evaluar, en un sistema *in vitro*, el efecto de la adición de plomo sobre la presencia y actividad de enzimas antioxidantes (peroxidasa y catalasa) en *Acacia farnesiana* L Willd.

En el segundo capítulo de este trabajo se desarrolla una revisión bibliográfica acerca de aspectos generales de la fitorremediación de suelos contaminados con metales, así como, los mecanismos de fitorremediación aplicables a dichos suelos, los efectos de los metales pesados en las plantas y sus respuestas fisiológicas y, finalmente, los aspectos de mayor relevancia relacionados con la especie de estudio (*Acacia farnesiana*). Enseguida, se plantea el objetivo general y los objetivos particulares propuestos en el trabajo. En el cuarto capítulo se describen los materiales y métodos empleados para cumplir con los objetivos establecidos. Los resultados obtenidos y su discusión, se describen el capítulo quinto. Finalmente, en el capítulo sexto se presentan las conclusiones finales del trabajo.

## **Capítulo 2.**

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fitorremediación de suelos contaminados con metales

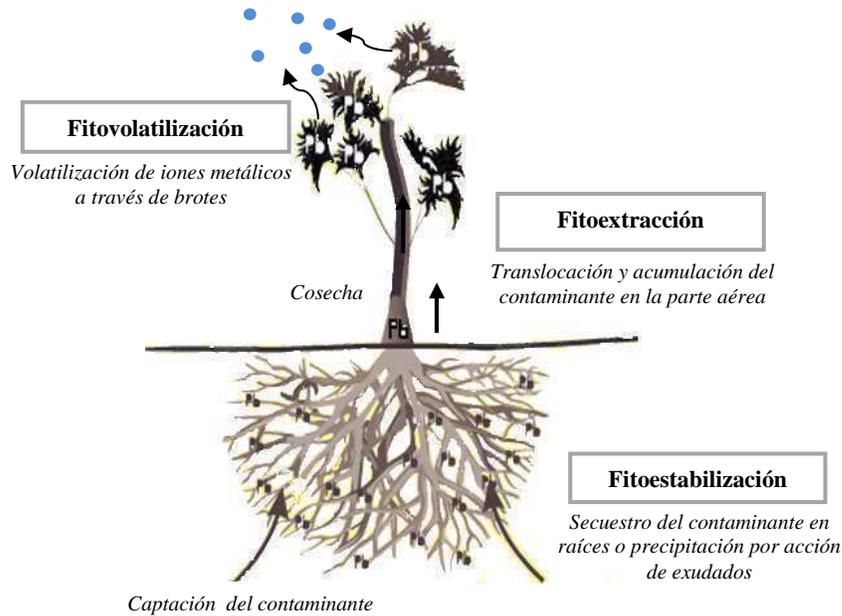
En las últimas décadas del siglo XX surgieron tecnologías basadas en el empleo de organismos vivos para descontaminar suelos y recuperar los ecosistemas afectados. Cuando estas tecnologías se basan en el uso de plantas reciben el nombre de fitorremediación.

El término fitorremediación se refiere a una tecnología novedosa que utiliza plantas vivas y los microorganismos asociados a su rizósfera para la remediación *in situ* y *ex situ* de suelos, lodos, sedimentos y aguas contaminados. Ésta puede llevarse a cabo a través de la remoción, degradación o estabilización de los contaminantes (Chaney *et al.*, 1997; Raskin *et al.*, 1997; Prasad y Freitas, 2003). Se trata de una técnica más limpia, simple, efectiva y de menor costo, en relación con los métodos fisicoquímicos que se usan en la actualidad, tales como la solidificación, el lavado o la incineración (Cox, 2000; Vassilev *et al.*, 2004).

La fitorremediación, por sí misma, muestra una serie de limitaciones como: (i) el contaminante debe encontrarse cercano a la rizósfera; (ii) las condiciones físicas y químicas del suelo, tales como el pH, la salinidad y el contenido de nutrientes, pueden limitar el crecimiento vegetal; (iii) la concentración del contaminante debe estar dentro de los límites tolerables para la planta; (iv) riesgos de lixiviación de los contaminantes más móviles; (v) accesibilidad a la zona contaminada, y (vi) tiempos largos (> 1 año) de remediación. Por lo anterior, esta tecnología debe considerarse como un proceso de recuperación a largo plazo. Entre las ventajas que presentan estas técnicas, destaca (1) que se pueden realizar *in situ*, es decir, sin necesidad de transportar el suelo o sustrato contaminado, (2) son de bajo costo, (3) permiten su aplicación tanto en suelos como en aguas, (4) sólo requieren prácticas agronómicas convencionales, (5) actúan positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas, y (6) son ambientalmente aceptables, debido a que se basan en la formación de una cubierta vegetal (Carpena y Bernal, 2007).

Sin embargo, la fitorremediación no es un remedio para todos los suelos contaminados. Antes de que esta tecnología pueda volverse técnicamente eficiente y económicamente viable, hay algunas limitaciones que necesitan ser superadas; por ejemplo, el conocimiento acerca de mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos involucrados, los cuales a la fecha, son pocos conocidos e insuficientemente entendidos (Freitas *et al.*, 2004).

La fitorremediación aplicada a suelos contaminados con elementos o compuestos inorgánicos incluye, básicamente, la fitoextracción, la fitoestabilización y la fitovolatilización (Figura 1) (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Esquema general de los procesos de fitorremediación aplicados a suelos contaminados con metales pesados (Salt *et al.*, 1995).

### 2.1.1. Fitoextracción

La fitoextracción se refiere a la absorción, a través de raíces, y translocación de contaminantes metálicos presentes en el suelo hacia diferentes partes de la planta (tallos y hojas), dando como resultado la limpieza permanente del sitio contaminado (Figura 1) (Chaney *et al.*, 1997; Prasad y Freitas, 2003). En principio, todas las plantas poseen un potencial para absorber una amplia variedad de metales del suelo, pero la mayor parte tiende solamente a absorber los que son esenciales para su supervivencia y desarrollo. Existe una notable excepción a esta regla, de un pequeño grupo de plantas que pueden tolerar, absorber y translocar altas concentraciones de ciertos metales, estas plantas reciben el nombre de hiperacumuladoras (Chen *et al.*, 2003). Se han encontrado plantas hiperacumuladoras que pueden acumular, de forma natural, en su biomasa aérea, metales como zinc (Zn), níquel (Ni), selenio (Se), manganeso (Mn) y plomo (Pb) en concentraciones de 1%, ó bien cobalto (Co), cobre (Cu) y cromo (Cr) en concentraciones de 0.1% en sus hojas, sobre una base del peso seco, independientemente de la concentración del metal en el suelo (Salt *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2003).

La fitoextracción de contaminantes metálicos de suelos es, hasta la fecha, uno de los campos con mayores avances científicos y tecnológicos. Durante este proceso, el contaminante debe encontrarse biodisponible para que la absorción por la raíz pueda ocurrir. Para mejorar el proceso de fitoextracción, la biodisponibilidad del contaminante en el suelo puede incrementarse a través de la adición de agentes acidificantes o quelantes y de fertilizantes (Prasad y Freitas, 2003). Bajo este principio, existen dos estrategias básicas: (i) la fitoextracción asistida por la adición de agentes quelantes, los cuales incrementan la solubilidad de metales en el suelo y por consiguiente favorecen su acumulación en partes cultivables de una planta; (ii) la fitoextracción continua de largo plazo, que se basa en procesos fisiológicos especializados que permiten la acumulación de metales durante todo el ciclo de crecimiento (Salt *et al.*, 1998).

El éxito de la fitoextracción depende principalmente de la capacidad de la especie para acumular grandes cantidades (1-3% en peso seco) del contaminante en sus tejidos y de la capacidad para producir grandes cantidades de biomasa en corto tiempo. De esta manera, la fitoextracción debe considerarse como una tecnología de largo plazo, que puede requerir de varios ciclos de cultivo para reducir la concentración de los contaminantes a niveles aceptables. El tiempo requerido depende de la concentración y tipo de contaminante(s), de la duración del periodo de crecimiento y de la eficiencia de remoción de la especie utilizada, y puede tomar entre uno y 20 años (Prasad y Freitas, 2003). La disposición de la biomasa contaminada es una preocupación; sin embargo, es importante recalcar que este tipo de contaminantes no se degrada. Algunos grupos sugieren la incineración del material vegetal para reducir significativamente el volumen del material contaminado a disponer. En algunos casos es posible recuperar metales valiosos de las cenizas ricas en dichos elementos (Prasad y Freitas, 2003). Este mecanismo es usado primordialmente en tratamientos de suelos, sedimentos y lodos y también puede usarse, en menor grado, para el tratamiento de aguas contaminadas (EPA, 2006).

### **2.1.2. Fitoestabilización**

En la fitoestabilización, las plantas limitan la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo, debido a la producción de compuestos químicos (como ácidos orgánicos) por las raíces, que pueden adsorber o formar complejos con los contaminantes, inmovilizándolos así en la interfase raíz-suelo (Figura 1) (Chaney *et al.*, 1997). Dichos compuestos, puede cambiar la solubilidad y movilidad del metal o afectar a la disociación de compuestos orgánicos mediante la reducción de su valencia (Salt *et al.*, 1995).

La fitoestabilización parece ser una alternativa prometedora principalmente para elementos tóxicos como el cromo y el plomo. Por ejemplo, el cromo puede ser reducido de  $\text{Cr}^{6+}$  (peligroso para el ambiente) a  $\text{Cr}^{3+}$  (altamente insoluble) por plantas, esta forma de cromo resulta no dañina para el ambiente y la reacción puede resultar efectiva utilizando plantas de raíces profundas.

El restablecimiento de la vegetación, a través de la fitoestabilización puede reducir la migración de contaminantes por erosión eólica e hídrica, la lixiviación y la dispersión del suelo, además de causar una mínima perturbación al ambiente, en comparación con otras tecnologías para la recuperación de suelos (EPA, 2000). Por lo anterior, este método se considera como una tecnología prometedora para la remediación de suelos contaminados con metales como el Pb (Chaney *et al.*, 1997).

### **2.1.3. Fitovolatilización**

La fitovolatilización implica la captación de contaminantes volátiles orgánicos e inorgánicos (Hg y Se) por plantas y su posterior volatilización ó liberación, en su forma original o modificada, a la atmósfera (Figura 1). La fitovolatilización se aplica generalmente en aguas subterráneas, aunque también puede utilizarse en suelos, sedimentos y lodos contaminados con Se, Hg o As (Chaney *et al.*, 1997). Muchos compuestos orgánicos volátiles, pueden ser volatilizados pasivamente por las plantas. Debido a que la planta remueve completamente el contaminante del sitio, a través de su transpiración, sin necesidad de cortar la planta y disponerla, la fitovolatilización es una tecnología atractiva.

## **2.2. El plomo como contaminante ambiental**

El plomo (Pb) es un metal gris azulino que se presenta en forma natural en pequeñas cantidades (0.002%) en la corteza terrestre. Este elemento, es generalmente obtenido de la galena ( $\text{PbS}$ ), la anglesita ( $\text{PbSO}_4$ ) y la curocita ( $\text{PbCO}_3$ ). El Pb es tóxico para el sistema nervioso y se asocia con la depresión de muchas funciones endócrinas, aunque no hay evidencia de efectos teratogénicos o carcinogénicos. El uso más amplio del Pb elemental es para la fabricación de acumuladores; este elemento también es usado para la fabricación de tetraetilo de plomo, pinturas, cerámicas, forros para cables, elementos de construcción, vidrios especiales, pigmentos, soldadura suave y municiones (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). El plomo se considera un contaminante ambiental ya que, en concentraciones elevadas, suele ser tóxico para muchas especies, incluyendo al ser humano. Su presencia en el

ambiente se debe principalmente a actividades antropogénicas como la industria, minería, fundición y al uso que se le dio como aditivo de gasolinas (Rodríguez *et al.* 2006).

Desde hace algunas décadas la importancia del plomo como contaminante ecotóxico se conoce bien. El Pb se considera un contaminante ecotóxico debido a que su uso provoca contaminación ambiental y exposición en humanos. La principal vía de biodisponibilidad son el suelo y el polvo, donde se concentra y por medio del cual ingresa a los organismos. El manejo inadecuado de materiales con plomo ha sido causante de numerosos problemas ambientales en todo el mundo; sin embargo, no todo el plomo del suelo presenta el mismo grado de movilidad o biodisponibilidad. La distribución química del plomo en el suelo depende del pH, de la mineralogía, textura, contenido de materia orgánica y de la naturaleza de los compuestos de plomo contaminantes (Alloway, 1995). La contaminación de un suelo con Pb es preocupante, debido al tiempo que éste puede permanecer en el ambiente (1000 a 3000 años en suelos de clima templado), estableciéndose un equilibrio dinámico con la hidrosfera, atmósfera y biosfera, alterando así el ecosistema completo, incluyendo al ser humano (Huang, 1997; Rodríguez *et al.* 2006).

En nuestro país, recientemente (2004) se publicaron límites máximos permisibles para suelos contaminados metales. La Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por metales y metaloides, estableciendo que cuando existe un suelo contaminado con Pb, éste deberá remediarse a una concentración de referencia total (CRT) de 400 mg Kg<sup>-1</sup> para el caso de uso de suelo agrícola, residencial y/o comercial y de 800 mg Kg<sup>-1</sup> para uso industrial.

Para determinar el comportamiento de los metales pesados en los suelos y prevenir riesgos tóxicos potenciales, se requiere la evaluación de la disponibilidad y movilidad de los mismos. La toxicidad de un metal depende no sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema (Abollino *et al.*, 2002).

### **2.3. Efectos de los metales pesados en las plantas**

#### **2.3.1. Estrés oxidativo**

La interacción directa de un elemento potencialmente tóxico (EPT) con los componentes celulares de una planta puede iniciar una variedad de respuestas metabólicas que, finalmente provocan cambios en el desarrollo de la planta. En general, los EPT pueden ser fitotóxicos cuando son captados en exceso por las plantas (Van Assche y Clijsters, 1990). La

acumulación de cantidades fitotóxicas de EPT por plantas superiores puede provocar una serie de efectos negativos como son: retardo o inhibición del crecimiento, reducción de la producción de biomasa, pérdida de la integridad de la membrana celular, inhibición de enzimas que contienen grupos sulfhidrilo, reemplazo de metales esenciales, interferencia con la estructura y funcionamiento de proteínas y también pueden provocar estrés oxidativo (Schützendübel y Polle, 2002; Ali *et al.*, 2003).

En la naturaleza las plantas están frecuentemente expuestas a distintos tipos de estrés biótico (por acción de virus, bacterias, nematodos, hongos e insectos), abiótico o ambos. Estos tipos de estrés pueden alterar el metabolismo normal de las plantas propiciando la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Aunque, las ERO son producidas de manera natural en todos los organismos aerobios durante algunos procesos metabólicos y sus implicaciones (en bajas concentraciones) están bien establecidas como moléculas de defensa contra patógenos, muerte celular programada y respuestas al estrés (biótico y abiótico); las condiciones severas de estrés, como ya se ha mencionado, pueden desbalancear el nivel de producción normal de ERO. Las ERO son altamente reactivas, tóxicas y capaces de oxidar diversas biomoléculas (lípidos de membrana, proteínas, ADN) (Rivera *et al.*, 2008). Las ERO incluyen el radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), los cuales son producidos durante el transporte de electrones en la membrana celular, así como por una serie de cambios metabólicos (Martínez-Domínguez *et al.*, 2007).

En el caso de los EPT, su acumulación en el tejido de las plantas, da como resultado una sobre-producción de radicales libres, lo cual provoca la peroxidación de la membrana celular y genera estrés oxidativo (Ali *et al.*, 2003) Helmut Sies (1985) define el estrés oxidativo como una situación de desequilibrio en la que ocurre un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes (Rivera *et al.*, 2008). El estrés oxidativo en presencia de EPT, es generado debido a que éstos intervienen en una serie de mecanismos metabólicos que producen ERO. Algunos metales sin actividad fisiológica conocida ni capacidad de oxido-reducción, como el Pb y el Cd, pueden aumentar el estado pro-oxidante en las células. Los metales pueden también ocasionar la ruptura de la cadena fotosintética de electrones, conduciendo a la producción del anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) (Sharma *et al.*, 2005). El  $\bullet\text{O}_2^-$  es la primera ERO producida por reducción del oxígeno con un electrón. Dos moléculas de  $\bullet\text{O}_2^-$  se dismutan rápidamente generando  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Rivera *et al.*, 2008), el cual resulta tóxico para las plantas y puede tener un efecto tanto oxidante como reductor (Ali *et al.*, 2003). En presencia de

metales de transición como el hierro (Fe), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce el •OH mediante las reacciones de Haber-Weiss o de Fenton (Mishra *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2008).

Una evidencia directa de la inducción de estrés oxidativo por metales pesados, es el aumento en los niveles de peroxidación de lípidos y en la producción de peróxido de hidrógeno en hojas y raíces (Tamás *et al.*, 2007). Debido a que las ERO son tóxicas pero también participan en eventos de señalización, las células vegetales requieren de al menos dos mecanismos diferentes de remoción de ERO para regular su concentración: uno para propósitos de señalización que permita la modulación fina (para niveles bajos de ERO), y otro que permita la desintoxicación del exceso de ERO (Rivera *et al.*, 2008).

### **2.3.2. Respuestas fisiológicas al estrés oxidativo**

Las defensas de las plantas contra la toxicidad por EPT incluyen diferentes estrategias. La primera de ellas implica la evasión de la entrada del metal a la célula, mediante la exclusión o la unión del metal a la pared celular. La unión del metal a la pared celular (compartimentalización) es uno de los principales mecanismos de desintoxicación (Antosiewicz y Wierzbicka, 1999). Otra estrategia de defensa implica la acción de sistemas antioxidantes que combaten el aumento en la concentración de ERO causado por la presencia del metal (Mishra *et al.*, 2006). La modulación de los niveles antioxidantes en las células vegetales constituye una respuesta adaptativa importante para resistir las condiciones adversas generadas por la exposición a metales. Las plantas han desarrollado una serie de mecanismos protectores que sirven para eliminar las ERO antes de que dañen partes sensibles de la maquinaria celular (Lasat, 2002; Sharma *et al.*, 2005).

Los sistemas antioxidantes que regulan los niveles de las ERO en las células, incluyen algunas moléculas como el ascorbato (ASC), glutatión (GSH) y metalotioneínas, así como enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y varias peroxidasas (POX) (Schützendübel y Polle, 2002). Ambos sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, dotan a las células con una maquinaria altamente eficiente para la desintoxicación de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El balance entre las actividades de estas enzimas y moléculas en las células es crucial para determinar el nivel de estado estacionario de •O<sub>2</sub><sup>-</sup> y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este balance, junto con el secuestro de iones metálicos por la ferritina y otras proteínas que unen metales, previenen la formación de •OH, considerado el más agresivo de las ERO (Rivera *et al.*, 2008).

## A. Sistemas no enzimáticos

Las moléculas antioxidantes como el ácido ascórbico y el glutatión (GSH), que se encuentran en altas concentraciones (5 - 20 mM y 1 - 5 mM respectivamente) en los cloroplastos y otros compartimentos celulares, son cruciales para la defensa de las plantas contra el estrés oxidativo.

El glutatión (GSH), un tripéptido ( $\gamma$ -glu-cys-gly) rico en grupos tiol, es un metabolito importante en las plantas, tiene diversas e importantes funciones incluyendo la transducción de señales. En tejidos, es metabólicamente activo, el GSH en concentraciones mili molares actúa como un elemento clave de amortiguación redox formando una barrera entre proteínas de grupos Cys y ERO. Por otra parte, el GSH es un sustrato para varias enzimas de reducción, incluyendo enzimas que reducen peróxidos.

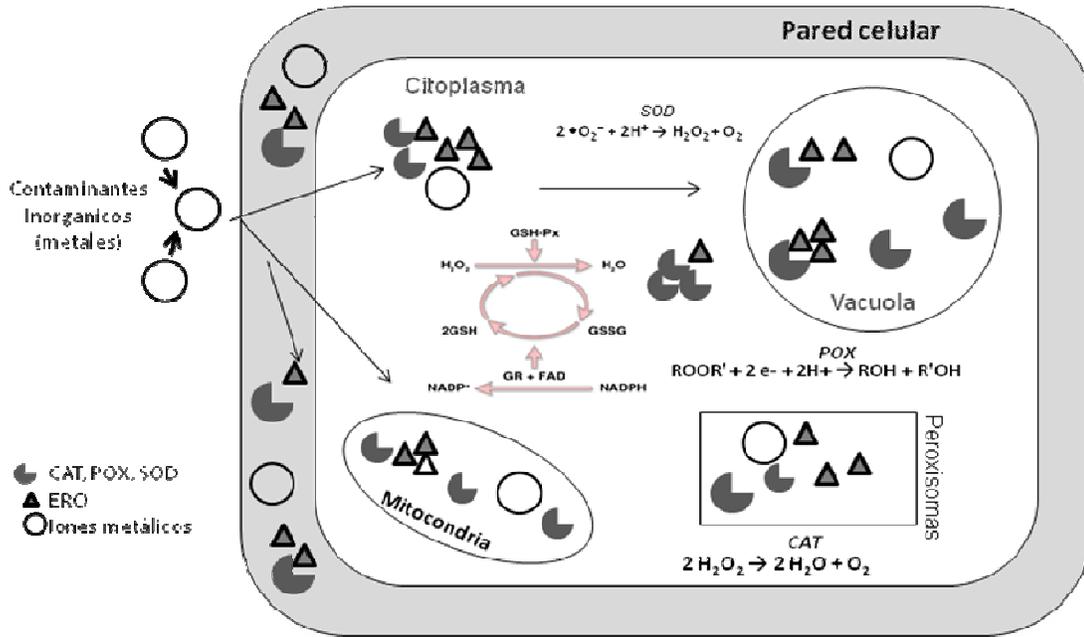
La exposición a las ERO puede dar como resultado el aumento en la capacidad antioxidante (si las ERO son generadas como resultado del metabolismo o de cambios ambientales) o bien decremento en la capacidad antioxidante (si las ERO se generan en torno a la respuesta de la muerte celular). La activación, la síntesis y acumulación de glutatión son características generales de una mayor oxidación del citosol (Foyer y Noctor, 2005).

El *ascorbato* (ASC) se ha señalado como un potente antioxidante hidrosoluble en los fluidos biológicos y como un secuestrador de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, como los radicales hidroxilo ( $\bullet$ OH) peróxido ( $\text{ROO}\bullet$ ), superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), bióxido de nitrógeno ( $\text{NOO}\bullet$ ) y oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), producidas naturalmente en organismos aerobios. Al reaccionar con las ERO y de nitrógeno, el ASC genera la especie radical llamada ascorbilo (A $\bullet$ ). Esta molécula sufre rápidamente una dismutación para transformarse en ASC o en ácido dehidroascorbico (DHA), formas no radicales del ascorbato. Otro mecanismo antioxidante propuesto para el ASC se asocia con su capacidad para generar de manera indirecta, antioxidantes de bajo peso molecular como el  $\alpha$ -tocoferol, glutatión (GSH) y  $\beta$ -caroteno, partiendo de sus especies radicales (Figura 2) (Rivera *et al.*, 2008).

Los *carotenoides* pueden proteger a las células contra daños oxidativos, a través de mecanismos que involucran su capacidad para funcionar tanto como agentes fotoprotectores contra los efectos nocivos de la luz y del oxígeno singulete ( $\text{O}_2$ ), así como moléculas reactivas contra especies químicas generadas dentro de las células, capaces de inducir daños oxidativos (Rivera *et al.*, 2008).

El  *$\alpha$ -tocoferol* es el principal antioxidante liposoluble que protege a la célula contra los radicales libres. Su función principal es destruir la mayor parte de las formas reactivas de

radicales libres del oxígeno, protegiendo a los ácidos grasos saturados de la oxidación y evitando así el daño oxidativo de los lípidos de la membrana, lo que ocasiona fragilidad y lisis celular (Rivera *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Diagrama general de las reacciones de enzimas (CAT, POX, POD) y moléculas antioxidantes (GSH y ASC), en presencia de iones metálicos y su ubicación en la célula. Los contaminantes inorgánicos entran a la célula e intervienen en reacciones que provocan la sobreproducción de ERO ( $H_2O_2$ ,  $\cdot O_2^-$  y  $\cdot OH$ ) altamente tóxicas. Las enzimas y moléculas antioxidantes actúan en diferentes compartimentos celulares. Las peroxidases pueden actuar en la pared celular, en las mitocondrias y en vacuolas. Las catalasas se encuentran en peroxisomas. El ciclo ASC-GSH se encuentra en el citoplasma, la mitocondria y los cloroplastos. Todo este conjunto de sistemas convierten a las ERO en formas menos tóxicas (Rivera *et al.*, 2008).

## B. Sistemas enzimáticos

Los principales sistemas enzimáticos que actúan en la remoción de las ERO incluyen: (i) la SOD, presente en casi todos los compartimentos celulares; (ii) el ciclo ascorbato-glutatión, y todas las enzimas involucradas, que ocurre en cloroplastos, el citosol, la mitocondria, el apoplasto y los peroxisomas y (iii) la GPX y la CAT en los peroxisomas (Figura 2) (Rivera *et al.*, 2008).

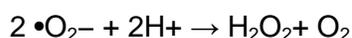
El ciclo ascorbato-glutatión, que ocurre en casi todos los organelos celulares, juega un papel importante en el control de los niveles de ERO en los compartimentos arriba mencionados. El

glutación (GSH), en presencia de la GSH-peroxidasa (GPx), que depende de selenio, reduce al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como resultado, el GSH se oxida a glutatión oxidado (GSSG) por lo que, para volver a tener capacidad antioxidante, éste deberá volver a reducirse a GSH, lo cual ocurre por acción de la enzima GSSG-reductasa a expensas de NADPH, en lo que se conoce como un ciclo redox (Figura 2). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también puede reducirse por acción de la enzima CAT; sin embargo, dentro de la mitocondria, el GSH es particularmente importante debido a que este organelo no posee catalasa. El GSH en la mitocondria, es reconocido como un antioxidante vital que regula las vías de muerte celular. También funciona como coenzima para otras enzimas antioxidantes, como las gluta-redoxinas y las tioredoxinas (Rivera *et al.*, 2008).

Los sistemas enzimáticos antioxidantes se consideran un importante mecanismo de defensa de las plantas ante el estrés oxidativo causado por metales (Alí *et al.*, 2003). Las enzimas antioxidantes que producen las plantas para evitar la fitotoxicidad de tales elementos, catalizan reacciones de óxido-reducción y alteran la química de los iones metálicos, reduciéndolos a formas menos tóxicas (Sharma *et al.*, 2005). Entre las enzimas antioxidantes expresadas por las células vegetales que pueden ser significativamente inducidas por un exceso de metales captados por la planta, se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), varias peroxidases (POX) y la ascorbato peroxidasa (APX). También se ha demostrado la actividad de enzimas como la isocitrato deshidrogenasa (ICDH), la malato deshidrogenasa (MDH) y la glutamato deshidrogenasa (GDH), relacionadas con el ciclo de Krebs (Sharma *et al.*, 2005).

La APX, CAT y POX funcionan en diferentes lugares en el interior de la célula, manteniendo la concentración de peróxidos en niveles constantes (Mishra *et al.*, 2006). La Figura 2 muestra un panorama general de la ubicación de las enzimas antioxidantes en la célula y sus principales reacciones. Aunque los mecanismos precisos de la interacción entre dichas enzimas y metales tóxicos aún no son del todo claros, los cambios enzimáticos en las plantas pueden usarse para evaluar el potencial de fitotoxicidad de suelos contaminados con metales (Van Assche y Clusters, 1990; Sharma *et al.*, 2005). A continuación se presentan las principales características de estas enzimas antioxidantes, así como, la reacción que catalizan cada una de ellas.

La superóxido dismutasa (SOD) pertenece a una familia de enzimas que cataliza la dismutación del superóxido (una de las especies más reactivas de oxígeno) a oxígeno y peróxido de hidrógeno, en presencia de cationes divalentes como el Pb (Figura 2):



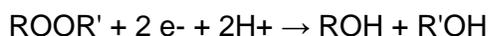
La compartimentalización de las diferentes SOD se explica, en gran medida, por el hecho de que el  $\bullet\text{O}_2^-$  no puede cruzar con facilidad las membranas que separan los compartimentos celulares y mitocondriales. Sin embargo, se ha reportado que, dado que el  $\bullet\text{O}_2^-$  puede reaccionar con otras moléculas, puede formar especies intermediarias que le faciliten la permeabilidad y puedan, en cierta forma, escapar de los efectos protectores de la SOD y ejercer su toxicidad.

La SOD1 o Cu/Zn-SOD se encuentra en el citoplasma, núcleo y peroxisomas y en la membrana mitocondrial externa. La SOD2 (Mn-SOD) se ubica en la mitocondria, de los electrones transportados por la cadena respiratoria el 4 o 5% son desviados para producción de  $\bullet\text{O}_2^-$ , de manera que la SOD2 es de vital importancia para la mitocondria. La SOD3 o EC-SOD es la única proteína extracelular que puede eliminar el  $\bullet\text{O}_2^-$ . Está presente también en el plasma y en el fluido linfático y cefalorraquídeo.

La catalasa (CAT) es la enzima que cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno en  $\text{O}_2$  y agua. Para ello, ocupa dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , una como agente reductor y otra como oxidante:



Las peroxidasas (POX) catalizan reacciones redox, utilizando un peróxido como agente oxidante y un segundo sustrato con características reductoras, que es oxidado por el peróxido:



### ***2.3.3. Función de las peroxidasas durante el estrés por metales***

Las peroxidasas (POX) pertenecen a una gran familia de enzimas capaces de oxidar una serie de sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como agente oxidante (Penel *et al.*, 1992; Vianello *et al.*, 1997). Estas enzimas participan en varios procesos fisiológicos y bioquímicos, tales como el crecimiento de células, la diferenciación y el desarrollo, el catabolismo de auxinas y lignificación, así como en respuesta al estrés biótico (defensa contra organismos patógenos) y abiótico (presencia de contaminantes) (Wei-Ching y Ching, 2000).

Varias peroxidasas que se encuentran en las plantas, se localizan en diferentes compartimentos celulares, principalmente la pared celular y vacuolas, y utilizan numerosos sustratos. De esta manera, los peróxidos de la pared celular, vacuola, citosol, y cloroplastos

pueden ser eliminados por peroxidasas y ascorbato peroxidasas (APX), localizadas en el compartimento celular (Asada, 1992).

La inducción de peroxidasas es una respuesta general de las plantas a la captación de cantidades elevadas de metales tóxicos. Esta respuesta se ha observado en las raíces y hojas de diversas especies después de la aplicación de dosis tóxicas de Zn, Cd, Cu, Ni y Pb (Tabla 1). También parece que el aumento de la actividad de peroxidasas es una respuesta defensiva a la presencia de la mayoría, si no todos, los metales que pueden causar daños o alterar la función normal de las plantas (Yong y Young, 1996). La inducción de estas enzimas está también relacionada con reacciones oxidativas en las biomembranas. Varias enzimas del metabolismo intermediario pueden ser estimuladas para evitar daños por la presencia de un metal en reacciones fotosintéticas. De hecho, la inducción de ciertas enzimas puede ser usada como criterio de diagnóstico para evaluar la fitotoxicidad de suelos contaminados con diversos metales. La desintegración de las biomembranas por peroxidación lipídica o lipoperoxidación implica la inducción de varias isoperoxidasas involucradas en reacciones de peroxidación. En consecuencia la inducción de POX puede ser significativa en la remoción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peróxidos orgánicos formados bajo diferentes condiciones de estrés (Van Assche y Clijsters, 1990). Como ya se mencionó, las peroxidasas están también involucradas en la degradación de ácido indolacético. El incremento en la actividad peroxidasa es generalmente considerado como un indicador de envejecimiento de las plantas (Van Assche y Clijsters, 1990).

**Tabla 1.** Inducción de peroxidasas en diferentes órganos de plantas superiores bajo condiciones de estrés por la presencia de cantidades tóxicas de metales.

Metal	Especie	Organo	Referencia
Cd	<i>Glycine max</i>	Hojas	Lee <i>et al.</i> (1976a)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hojas	Van Assche <i>et al.</i> (1988)
Cu	<i>Lactuea sativa</i>	Semillas	Mukherji y Das Gupta (1972)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Raíces	Van Assche <i>et al.</i> (1986)
Pb	<i>Glycine Max</i>	Hojas	Lee <i>et al.</i> (1976b)
	<i>Medicago sativa</i>	Hojas	Maier (1978)
	<i>Zea Mays</i>	Hojas y raíces	
Zn	<i>Silene cucuhalus</i>	Hojas	Matthys (1977)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hojas	Van Assche <i>et al.</i> (1988)
Ni	<i>Silene Italica</i>	Hojas	Gabrielli <i>et al.</i> (1987)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hojas	Van Assche <i>et al.</i> (1986)

Tabla adaptada de Van Assche y Clijsters, 1990.

Razinger *et al.* (2007) encontraron que varios sistemas antioxidantes, especialmente la molécula de glutatión y la actividad guaiacol peroxidasa, fueron rápidamente inducidos por la presencia de cobre en un cultivo *in vitro* de *Lemna minor*. Este grupo atribuye la inducción de estos sistemas a una estrategia general de defensa de las plantas al estrés oxidativo inducido por la presencia de metales.

Milone *et al.* (2003) observaron una estimulación de la guaiacol peroxidasa (GPX) en hojas de *Triticum durum* en presencia de cadmio a diferentes concentraciones. Sin embargo, en las raíces de *T. durum*, se obtuvo una disminución de la actividad GPX con las mismas condiciones de cadmio.

Sharma *et al.* (2005) reportan un aumento en la actividad GPX en cultivos celulares de *Sesbania drummondii* expuestas a diferentes concentraciones de Cu (20 y 100 mg·L<sup>-1</sup>). Aunque, en presencia de diferentes concentraciones de plomo, *S. drummondii* no mostró diferencias significativas en la actividad GPX.

#### **2.3.4. Función de la catalasa (CAT) durante el estrés por metales**

La catalasa (CAT) está presente en los peroxisomas de la célula, en donde desempeña un papel clave en el equilibrio del nivel de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mediante su descomposición a agua y oxígeno (Igamberdiev y Lea, 2002). La CAT también puede descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado durante la β-oxidación de ácidos grasos en glioxisomas de lípidos (Gratão *et al.*, 2005). Numerosos factores de estrés, tales como la contaminación, radiación, salinidad, cambios climáticos como sequía, frío e intensidad luminosa elevada, entre otros, estimulan esta enzima (Reddy *et al.*, 2005; Teisseire y Guy, 2000).

En un principio se creía que cualquier enzima que tuviera la actividad catalasa pertenecía a este grupo, pero la diferencia estaba en sus propiedades cinéticas y en su estructura y sensibilidad ante diferentes inhibidores. La mayor parte de las catalasas son hemocatalasas porque tienen un grupo hemo asociado a su grupo catalítico. Las llamadas catalasas de magnesio tienen en vez de un grupo hemo un átomo de magnesio en su centro catalítico. Y el último grupo de CAT son las catalasa-peroxidasas. Sin embargo, la clonación de los genes de las catalasa-peroxidasas y las catalasas de magnesio y su comparación con los de la catalasa reveló que estas enzimas no están relacionadas y que presentan grupos de enzimas distintos (Rivera *et al.*, 2008).

La familia de CAT más distribuida es la de las catalasas monofuncionales. Realizan la actividad catalasa más elevada, aunque pueden tener actividad peroxidasa moderada, pero solo en presencia de moléculas pequeñas como agentes reductores (como etanol y

metanol). La mayor parte de estas enzimas está formada por cuatro subunidades idénticas. Las monocatalasas se encuentran dentro de la respuesta antioxidante. Las catalasas peroxidadas, están ampliamente distribuidas en las bacterias, pero solo se han descrito en cuatro géneros de arqueas, y en microorganismos eucariotas solo se han encontrado en hongos. Las manganeso catalasas pertenecen a microorganismos que carecen de hemoproteínas, incapaces de sintetizar el grupo hemo (Rivera *et al.*, 2008).

También se han encontrado isoenzimas de catalasas en plantas superiores (Willekens *et al.*, 1994). Otra clase de CAT está localizada en tejidos vasculares y pueden estar involucradas en la protección contra el estrés ambiental (Willekens *et al.*, 1994). Se ha reportado que la CAT está presente en la matriz mitocondrial (Moller, 2001). De manera similar a la SOD, la actividad CAT varía considerablemente en respuesta al estrés por metales pesados (Gratão *et al.*, 2005).

Dada la afinidad de las CAT por su sustrato, se piensa que su función primordial es eliminar las altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por el contrario, las enzimas que tienen una afinidad mayor por el peróxido como peroxidadas y peroxirredoxinas, actúan ante el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en bajas concentraciones. A su vez las catalasa-peroxidadas y las Mn-catalasas tienen una afinidad mayor por el peróxido que las catalasas, por lo que cuando más de una de éstas está presente en un organismo, puede eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un intercambio amplio de concentración (Rivera *et al.*, 2008).

Al igual que las peroxidadas, se ha reportado que la actividad CAT es estimulada en respuesta al estrés oxidativo provocado por la presencia de metales pesados en una gran variedad de especies vegetales. Teisseire *et al.* (1998) encontraron un aumento en la actividad CAT en *Lemna minor* L. después de 24 h, en un medio nutritivo contaminado con Cu, a medida que aumentó la concentración, la actividad catalasa también aumentó hasta cierto nivel, después se mantuvo (alta) hasta las 24 h.

#### **2.4. *Acacia farnesiana* (L.) Willd.**

El género *Acacia* es un importante género de la familia *Fabácea* (subfamilia *Mimosidaceae*) (Tabla 2) que incluye aproximadamente 1200 especies. *Acacia farnesiana* (L.) Willd, conocida comúnmente como huisache, es un arbusto o árbol pequeño caducifolio de tallos múltiples caracterizado por una copa esparcida y densa, ramas espinosas y flores fragantes (Figura 3). *A. farnesiana* se considera nativa de algunas zonas de Francia, Italia Australia, África, India y América (Vengadesan *et al.*, 2002). Fue introducida al Nuevo Mundo durante

los primeros años de la colonización española. Después fue esparcida por el ganado y por perturbaciones relacionadas al pastoreo, tales como el fuego, la poda de matorrales y el forrajeo. Se encuentra presente en todos los continentes y es la especie de *Acacia farnesiana* la de distribución más extensa (Rzedowski y Rzedowski, 2001).



**Figura 3.** *Acacia farnesiana* crecida en condiciones naturales en sitios de disposición de jales de la Mina “De Rayas” ubicada en el Estado de Guanajuato.

*A. farnesiana* es una especie útil para la reforestación de tierras secas degradadas y se usa también de manera extensa para combustible. En algunos lugares se le considera como una plaga debido a su habilidad para colonizar pastizales y otros hábitats perturbados (Parrota, 1992). Las especies de *Acacia*, en particular, son de gran valor para la reforestación, como madera para combustible y para la recuperación de suelos. Esta especie se utiliza también para la producción de pinturas, tintas, agentes saborizantes, pulpa de madera y goma. Desde el punto de vista ecológico, puede adaptarse a temperaturas extremas, humedad y, además puede crecer en zonas áridas, regiones húmedas y en un amplio rango de suelos tropicales. Algunas especies también tienen relaciones simbióticas con *Rhizobium* y hongos micorrícicos, provocando un incremento en la fertilidad del suelo. También son efectivas para evitar la erosión de suelos y ayudan a la estabilización de dunas arenosas (Vengadesan *et al.*, 2002).

En México, *Acacia* tiene muchos usos en la medicina tradicional. Los extractos de las flores se usan en remedios para los dolores de cabeza y en el tratamiento de la indigestión. La fruta verde es muy astringente y una decocción de la fruta se usa para tratar la disentería e inflamaciones en la piel (Parrota, 1992).

Salas *et al.* (2007) y Solis-Ibarra *et al.* (2008), reportaron a *Acacia farnesiana* como una especie potencialmente fitorremediadora de sitios contaminados con plomo y cadmio,

particularmente a través de mecanismos de fitoestabilización. Salas *et al.* (2007) encontraron hasta 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> en raíces de esta especie cultivada en un suelo modelo con 1000 mg Pb·kg<sup>-1</sup> y 1591 mg Pb kg<sup>-1</sup> en cultivos *in vitro* en presencia de 250 mg·L<sup>-1</sup> de Pb. Solis-Ibarra *et al* (2008) demostraron que *A. farnesiana* acumuló más de 6000 mg Cd kg<sup>-1</sup> en raíces en cultivos *in vitro* con una concentración inicial de cadmio de 150 mg·L<sup>-1</sup>.

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Acacia farnesiana* (Martínez, 1979).

Categoría taxonómica	Nombre
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Género	<i>Acacia</i>
Especie	<i>farnesiana</i>

Otro aspecto de gran relevancia en *A. farnesiana* es que es una especie que frecuentemente se encuentra presente en suelos o sitios contaminados con jales mineros en México. Con base en lo anterior, la conservación de especies capaces de crecer en sitios contaminados con metales (metalofitas y pseudometalofitas) debe ser prioritaria por su posible utilización en fitotecnologías ambientales como la revegetación, fitoestabilización y fitoextracción.

## **Capítulo 3. OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. *Objetivo general*

Evaluar, en un sistema *in vitro*, el efecto de la adición de plomo y del tiempo de cultivo sobre la presencia y actividad de enzimas antioxidantes en *Acacia farnesiana*.

#### 3.2. *Objetivos específicos*

- Implementar la técnica analítica particular para la extracción de plomo de muestras vegetales, por digestión ácida asistida por microondas.
- Establecer las condiciones particulares para la obtención de extractos enzimáticos crudos de raíces y tallos de *A. farnesiana*, que permitan cuantificar la actividad de enzimas antioxidantes.
- Determinar el efecto de la presencia de plomo y del tiempo de cultivo en las actividades catalasa y peroxidasa en raíces y parte aérea de *A. farnesiana*.
- Evaluar la acumulación de plomo en raíces y en la parte aérea de *A. farnesiana* en función del tiempo de cultivo.

# **Capítulo 4.**

# **MÉTODOS Y MATERIALES**

## 4. MÉTODOS Y MATERIALES

### 4.1. Obtención de plántulas en condiciones *in vitro*

Para la producción de plantas para la obtención de extractos enzimáticos a partir de raíces y tejido aéreo, se sembraron semillas de *A. farnesiana* en condiciones *in vitro*. Las plántulas obtenidas fueron cosechadas a los 5, 10, 20, 40 y 60 días después de su germinación (1 - 2 días). Las plántulas producidas se utilizaron para la obtención de extractos enzimáticos y para la cuantificación de Pb en tejidos.

#### 4.1.1. Desinfestación y siembra de semillas

Las semillas de *A. farnesiana* se escarificaron de manera manual, perforando una pequeña parte de la testa de la semilla (Salas *et al.*, 2007). Una vez escarificadas, las semillas se desinfectaron, lavándolas con detergente comercial en polvo 2% (roma) durante 30 min en agitación constante y se enjuagaron con abundante agua de llave hasta eliminar la presencia de burbujas. Posteriormente, en condiciones asépticas, las semillas se sumergieron en una solución de etanol (70%) durante 30 seg, se enjuagaron con agua desionizada estéril y, finalmente, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (10%) por 30 min. Las semillas tratadas se enjuagaron repetidamente con agua desionizada estéril y se sembraron sobre el medio de cultivo.

#### 4.1.2. Condiciones de cultivo

Las semillas tratadas se colocaron en cajas de cultivo (Magenta, *Sigma-Aldrich*) con medio Murashige y Skoog (MS, *Sigma*) con sacarosa ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Phytigel ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  ( $0.37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y plomo ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en forma de Pb ( $\text{NO}_3$ )<sub>2</sub>. El pH del medio fue ajustado a 5.5 con KOH (0.5 M). Como controles, se sembraron semillas en el mismo medio pero sin Pb adicionado. El contenido de nitrato aportado por el Pb ( $\text{NO}_3$ )<sub>2</sub> se igualó con  $\text{NaNO}_3$  en el medio control.

Las semillas (2 por caja) se mantuvieron en la oscuridad a una temperatura de 25°C hasta su germinación (de uno a dos días). Una vez que ésta ocurrió, las plántulas permanecieron en una cámara de crecimiento a 25 °C con un fotoperíodo de 16 h durante 5, 10, 20, 40 o 60 días.

Para evaluar el efecto del plomo a través del tiempo sobre la actividad enzimática y la acumulación de plomo en el tejido de las plantas, se utilizaron ocho plántulas por condición (0 y  $100 \text{ mg Pb}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

## **4.2. Obtención de extractos enzimáticos**

Después del período de incubación, las plántulas fueron extraídas de los medios con y sin plomo. De las ocho plántulas, cuatro se utilizaron recién cosechadas para la obtención de extractos enzimáticos y cuatro se pesaron y secaron para la extracción y cuantificación de Pb. Las raíces empleadas para la obtención de los extractos se enjuagaron con abundante agua de llave y con agua desionizada. Se registró el peso fresco total, así como la longitud del tallo y de la raíz de cada planta.

Con el propósito de estandarizar las condiciones para la ruptura de biomasa para la obtención de extractos enzimáticos crudos, se probaron dos métodos diferentes: (i) ruptura con N<sub>2</sub> líquido; (ii) ruptura con molino de perlas (Biospec Products. Ok USA 74005). Ambos tratamientos se probaron durante diferentes tiempos cuantificando, como variable de respuesta, la concentración obtenida por cada método y cada tiempo probado.

Para obtener los extractos enzimáticos crudos (EEC), se realizó la ruptura de la biomasa de cada plántula (raíces y brotes por separado) con N<sub>2</sub> líquido durante 3 min. La biomasa homogeneizada se resuspendió en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 6.5) frío, utilizando un volumen de 10 mL de buffer por 100 mg de peso húmedo. La mezcla se centrifugó a 12000 g a 4°C por 15 min y el sobrenadante obtenido (extracto enzimático crudo) se almacenó a -20°C en tubos Eppendorf en alícuotas de 1 mL hasta su utilización para la determinación de las actividades enzimáticas descritas a continuación (Santos de Araujo *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005). Todo el procedimiento fue realizado a 4°C.

El contenido total de proteína en los EEC se determinó con el método de Lowry (1951), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

## **4.3. Determinación de actividades enzimáticas**

### **4.3.1. Guaiacol peroxidasa (GPX) EC 1.11.1.7**

La actividad peroxidasa en los extractos libres de células (EEC) se determinó con guaiacol como sustrato reductor (Yong y Young, 1996). La tasa de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por peroxidasas a 27°C, en presencia de guaiacol, se determinó por espectrofotometría midiendo la tasa de formación del producto final a 450 nm ( $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). La mezcla de reacción contenía: 2 mL de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 6.5), 0.4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM), 0.1 mL de guaiacol (1%) y 0.1 mL de extracto enzimático (Santos de Araujo *et al.* 2004).

Con el objeto de determinar la proporción más adecuada de los componentes de la mezcla de reacción, con base en la respuesta en la absorbancia a 450 nm, se analizaron cinco diferentes mezclas de reacción (Tabla 3).

La reacción se inició con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad se midió a través del cambio en la absorbancia a 450 nm durante 5 min a 27°C, usando un espectrofotómetro (Perkin-Elmer UV-Vis, Lambda 2). En el control, se sustituyó el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por agua destilada. Una unidad GPX se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 mmol de guaiacol por min a 27°C (Kim y Yoo, 1996; Santos de Araujo *et al.* 2004; Srivastava *et al.*, 2005).

Se realizaron pruebas control para corroborar la presencia de actividad peroxidasa en los EEC. Dichas pruebas son las siguientes:

- Buffer fosfatos 0.2 mL (0.1 M, pH 6.5), guaiacol 0.1 mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 mL y buffer (0.1 mL) sustituyendo al EE.
- Buffer fosfatos 2 mL (0.1 M, pH 6.5), guaiacol 0.1 mL, EE 0.1 mL y agua destilada (0.4 mL) sustituyendo al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Buffer fosfatos 2 mL (0.1 M, pH 6.5), EE 0.1 mL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 mL y buffer (0.1 mL) sustituyendo al guaiacol.

**Tabla 3.** Mezclas de reacción probadas durante el montaje del método particular para la determinación de la actividad guaiacol-peroxidasa con un extracto enzimático crudo (EEC).

<i>Prueba</i>	<i>Buffer (μL)<sup>(1)</sup></i>	<i>EEC (μL)</i>	<i>Guaiacol (μL)</i>	<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μL)<sup>(2)</sup></i>	<i>Mezcla de reacción (mL)</i>
1	2000	200	800	800	<b>3.8</b>
2	2000	100	400	800	<b>3.3</b>
3	2000	100	200	400	<b>2.8</b>
4	2000	100	100	400	<b>2.6</b>
5	2000	50	100	400	<b>2.5</b>

<sup>1</sup> Buffer de fosfatos 100 mM, pH 6.5

<sup>2</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM, preparado en buffer de fosfatos (100 mM, pH 6.5)

#### 4.3.2. Catalasa (CAT) EC 1.11.1.6

Para determinar la actividad catalasa, se utilizaron los mismos extractos crudos con los que se determinó la actividad GPX.

La catalasa oxida el peróxido de hidrógeno liberando agua y oxígeno como productos. La actividad de esta enzima se determinó en una mezcla de reacción con 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) y 0.4 mL de EEC. Para determinar la composición más adecuada para la cuantificación de la

actividad de esta enzima, se realizaron diferentes pruebas, variando las proporciones de EEC en la mezcla (Tabla 4). Se seleccionó la mezcla de reacción con la que se obtuvo la mayor absorbancia a 240 nm.

La reacción se inició con la adición del EEC y la actividad se determinó midiendo el aumento en la absorbancia 240 nm durante 5 min a 27°C en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 2). En el control se sustituyó el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por H<sub>2</sub>O destilada. La actividad se determina con un  $\epsilon = 0.047 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Stobrowa y Lorenc-Plucinska, 2007). Una unidad CAT se define como cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por min a 27°C (Santos de Araujo *et al.* 2004).

**Tabla 4.** Mezclas de reacción probadas durante el montaje del método particular para la determinación de la actividad catalasa con un extracto enzimático crudo (EEC).

<i>Prueba</i>	<i>EEC (<math>\mu\text{L}</math>)</i>	<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (<math>\mu\text{L}</math>)<sup>(1)</sup></i>	<i>Mezcla de reacción (mL)</i>
1	100	2000	<b>2.1</b>
2	200	2000	<b>2.2</b>
3	400	2000	<b>2.4</b>

<sup>1</sup> Se empleó una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM, preparada en buffer de fosfatos (100 mM, pH 6.5)

Con el objeto de determinar algunos parámetros cinéticos ( $k_M$  y  $V_{\text{max}}$ ) de la catalasa, así como para definir la concentración de sustrato a utilizar en la cuantificación de la actividad enzimática, se probó la actividad de la enzima en el extracto enzimático en función de diferentes concentraciones del sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 30 mM. Las soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se prepararon en buffer de fosfatos (pH 6.5 100 mM). La mezcla de reacción utilizada en esta prueba contenía 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0.4 mL de EEC. Para la obtención de  $k_M$  y  $V_{\text{max}}$  los datos obtenidos se trataron de acuerdo al método de Lineweaver-Burk (Strayer, 1988).

La actividad catalasa en los EEC se demostró verificando que no hubiera cambios en la absorbancia en la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en el EEC, por separado, con las mismas condiciones que en la mezcla de reacción.

#### **4.4. Cuantificación de metales en tejido vegetal**

El contenido total de Pb en muestras de raíces y parte aérea de *A. farnesiana* se cuantificó, después de su digestión ácida, mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) por el método de flama. A continuación se detallan los procedimientos empleados en cada caso.

#### 4.4.1. Digestión ácida asistida por microondas

Las muestras de raíces y brotes por separado se lavaron con una solución de EDTA (10 mM) para eliminar los metales extracelulares y, posteriormente, se enjuagaron con agua desionizada. El tejido vegetal se deshidrató en una estufa a 60°C hasta peso constante (~48 h). Las muestras secas se pulverizaron y homogeneizaron en un mortero para la extracción de Pb por digestión ácida.

Para la digestión de las muestras, se pesó aproximadamente 0.1 g de tejido. Dicha cantidad se colocó en vasos (MARSXpress) y se les adicionó la mezcla de digestión. Para definir las condiciones particulares para la digestión ácida de muestras por microondas, se evaluaron cuatro tratamientos por triplicado (Tabla 5).

**Tabla 5.** Condiciones evaluadas para definir las condiciones de la digestión ácida para la extracción de plomo de muestras vegetales.

Tratamiento	Predigestión	Mezcla de digestión	
		HNO <sub>3</sub> (ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)
1		5	2
2	✓	5	-----
3		5	2
4	x	5	-----

Las muestras predigeridas se mantuvieron durante 12 h en la mezcla de digestión (Tabla 3). Todas las muestras, independientemente de la condición evaluada, se digirieron bajo presión en un horno de microondas MARSXpress (CEM) con el siguiente método: 1600 W, rampa de temperatura (15 min) hasta 200 °C (15 min).

Una vez digeridas, las muestras se enfriaron y se aforaron a un volumen de 10 ml con agua desionizada. Las muestras se filtraron con membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm (Millipore) para eliminar partículas presentes y se analizaron por espectrometría de absorción atómica (EAA) mediante aspiración directa (US-EPA, 1992; Keller, 2003).

#### 4.4.2. Cuantificación de plomo

El contenido total de Pb en muestras de plantas se cuantificó después de su digestión ácida, por EAA utilizando una longitud de onda de 283.3 nm, de acuerdo con el método EPA 7420.

Para la cuantificación de plomo, se preparó una curva de calibración con una solución estándar (*Sigma*) de plomo ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

#### **4.5. Potencial de fitorremediación**

El potencial fitorremediador de *Acacia farnesiana* se evaluó con base en los siguientes criterios, determinados al tiempo final del cultivo:

- Tolerancia a metales. Para cuantificar la tolerancia a Pb se determinó el peso seco total, la longitud y número de tallos, y la longitud de las raíces. El índice de tolerancia (IT) fue determinado a través de la siguiente ecuación (Deng *et al.*, 2004):

$$\text{IT (\%)} = \frac{\text{Elongación de raíces en medio + Pb} \times 100}{\text{Elongación de raíces en medio} - \text{Pb}}$$

- Abundancia del sistema radicular, mediante el peso seco de raíces.
- Tasa de crecimiento y producción de biomasa, a partir del peso seco total de la planta.
- Potencial de fitoextracción, mediante la cuantificación de metales en las raíces y la parte aérea de la planta (hojas y tallos).
- Factor de translocación mediante la acumulación de metal en raíz y tallos.
- Potencial de fitoestabilización mediante la cuantificación de metales en raíces, hojas y tallos (Deng *et al.*, 2004).

#### **4.6. Análisis estadístico**

Todas las pruebas fueron realizadas al menos por triplicado. Para establecer diferencias significativas entre las medias de las variables analizadas se realizó un análisis de varianza y una prueba de Duncan con el paquete estadístico SAS (Thomas *et al.*, 1964).

## **Capítulo 5.**

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Determinación de las condiciones de digestión ácida

Los resultados obtenidos de la digestión ácida de muestras de *A. farnesiana* no mostraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de plomo extraído del material vegetal por efecto del método de digestión. Independientemente del tratamiento de digestión, la eficiencia para la extracción de plomo no varió significativamente (Tabla 6). Cabe decir que las plantas contenían plomo en sus tejidos debido a que fueron previamente sembradas en medio de cultivo (MS) contaminado con plomo.

**Tabla 6.** Plomo extraído de muestras de tejidos de *A. farnesiana* en función de las condiciones de digestión ácida asistida por microondas.

Condiciones para digestión ácida	Pb (mg•kg <sup>-1</sup> )*
HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P	529.7 ± 56.4 <sup>a</sup>
HNO <sub>3</sub> P	537.0 ± 10.7 <sup>a</sup>
HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	534.8 ± 29.3 <sup>a</sup>
HNO <sub>3</sub>	546.1 ± 42.6 <sup>a</sup>

P= con predigestión: 12 h en la mezcla de digestión. \* Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ( $\alpha < 0.05$ ).

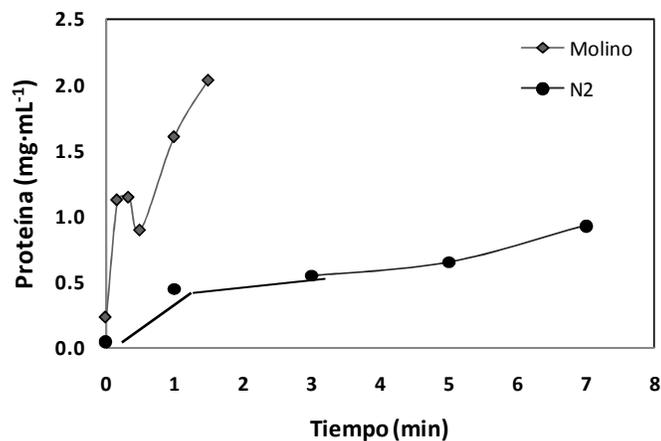
Durante la digestión de muestras vegetales, el ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) es usualmente empleado para oxidar la materia orgánica, aunque la adición de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) acelera el proceso de oxidación (Ndung'u *et al.*, 2004). En contraste con lo anterior, los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron una oxidación total de todas las muestras digeridas, aún sin adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto puede deberse a una mejora en las condiciones de temperatura, presión y tiempo, lo que incrementó la eficiencia de extracción de plomo, independientemente de los agentes de extracción empleados.

El tratamiento con predigestión (adición de la mezcla de digestión a la muestra 16 h antes de digerir en microondas) tampoco tuvo un efecto significativo ni en la degradación del tejido vegetal ni en la cantidad de plomo recuperada. De este modo, se determinó que no es necesaria una predigestión de muestras, lo cual facilita el tratamiento de las muestras y minimiza el tiempo de digestión. Por los resultados obtenidos, se estableció que la digestión de muestras de *A. farnesiana* en los experimentos realizados en este trabajo se llevaría a

cabo empleando solamente ácido nítrico (69-70 % Baker industrial analized) sin predigestión, durante 15 minutos a 200°C.

## 5.2. Obtención de extractos enzimáticos

Con el propósito de estandarizar las condiciones para la ruptura de biomasa para la obtención de los extractos enzimáticos crudos (EEC), se probó la ruptura con N<sub>2</sub> líquido así como con un molino de perlas. En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos, en términos de la cantidad de proteína extraída, de la ruptura de la biomasa fresca por ambos métodos durante diferentes tiempos.



**Figura 4.** Cantidad de proteína extraída en función del tiempo de tratamiento en un molino de perlas y con N<sub>2</sub> líquido.

Se observa que con ambas técnicas, a mayor tiempo de ruptura se obtuvo un incremento en la concentración de proteína. En las plantas tratadas con el molino de perlas se obtuvo una mayor concentración de proteína (hasta 2.03 mg·mL<sup>-1</sup>) desde los 9 seg de tratamiento, que en las plantas tratadas con N<sub>2</sub> líquido. En contraste, las plantas tratadas con N<sub>2</sub> alcanzaron hasta 0.93 mg·mL<sup>-1</sup> en 7 minutos. Sin embargo, se encontró que el uso del molino de perlas no es conveniente para la obtención de extractos enzimáticos debido a que, al aumentar el tiempo del tratamiento, la temperatura del material contenido en los viales aumenta considerablemente, lo que puede provocar la desnaturalización de proteínas y, con ello, la pérdida de actividad enzimática (Strayer, 1988). Por lo tanto la biomasa de las plantas fue pulverizada con N<sub>2</sub> durante 3 min.

### 5.3. Efecto del plomo en la actividad de enzimas antioxidantes

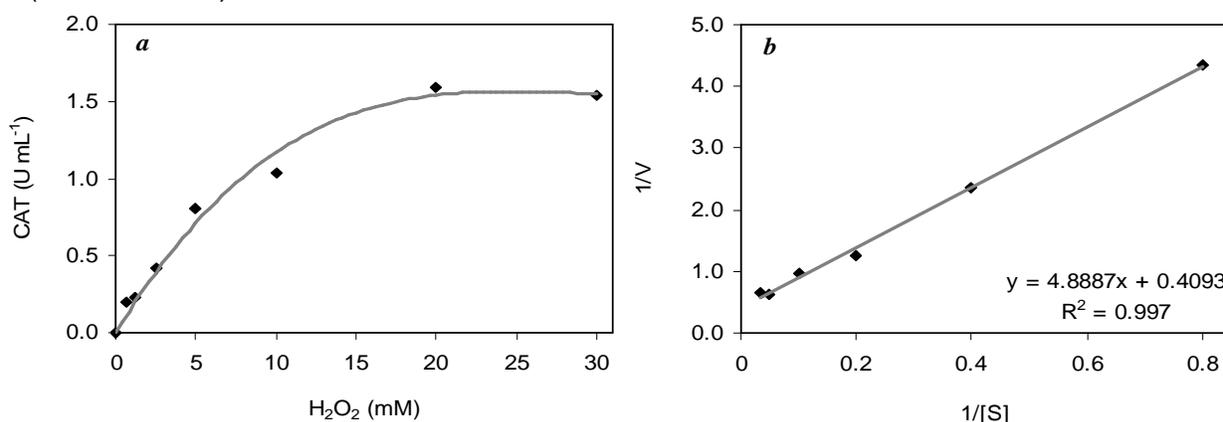
#### 5.3.1. Catalasa (EC 1.11.1.6)

La catalasa es una enzima que cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno como productos:  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . Esta enzima está presente en la mitocondria y en los peroxisomas de las células. A continuación se presentan los resultados estimados de la  $V_{\max}$  y  $K_M$ .

#### A. Estimación de $K_M$ y $V_{\max}$

En la Figura 5 se muestran las velocidades de reacción obtenidas para la catalasa en el EEC de *A. farnesiana*, correspondientes a cada concentración de sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) probada, así como el tratamiento de datos por el método de Lineweaver-Burk.

Con base en los resultados obtenidos, se determinó un valor para  $K_M$  de  $11.9 \text{ mmol L}^{-1}$  y para  $V_{\max}$  de  $2.4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Los valores antes mencionados son mayores respecto a otros obtenidos en diversos trabajos. Tayefi-Nasrabadi (2008) reporta una  $V_{\max}$  de  $0.21 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$  y una  $K_M$  de  $0.64 \text{ mmol L}^{-1}$  para una catalasa de *Brassica oleracea gongylodes* a pH de 6.5. La velocidad máxima de la actividad CAT en *B. oleracea* es muy alta respecto a la obtenida en *A. farnesiana*, lo cual puede deberse a que la actividad de la CAT presente en *A. farnesiana* tenga un pH óptimo y/o requiera una fuerza iónica diferente a los ensayos en este trabajo (6.5 y 0.1 M respectivamente). La actividad de esta enzima es óptima entre valores de pH de 5.3 y 8.0, siendo mayor en valores ácidos y menor en valores alcalinos (Galston, 1955).

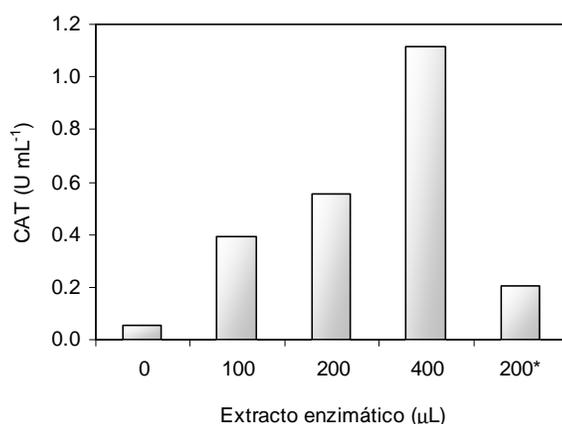


**Figura 5.** Datos utilizados para la obtención de  $K_M$  y  $V_{\max}$ . (a) Actividad catalasa en función de la concentración de sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); (b) tratamiento de datos por el método de Lineweaver-Burk.

Adicionalmente a  $k_M$  y  $V_{max}$ , relacionando los datos de absorbancia (240 nm) con la correspondiente concentración de  $H_2O_2$ , se determinó el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) para la catalasa (240 nm), obteniéndose un valor de  $47.2 \text{ cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$ .

Con base en los datos anteriores, todas las determinaciones posteriores se realizaron con una concentración de sustrato 20 mM. Kim y Yoo (1996) mencionan que en una concentración mayor a 20 mM, el  $H_2O_2$  puede descomponerse rápidamente, debido al contacto con el oxígeno.

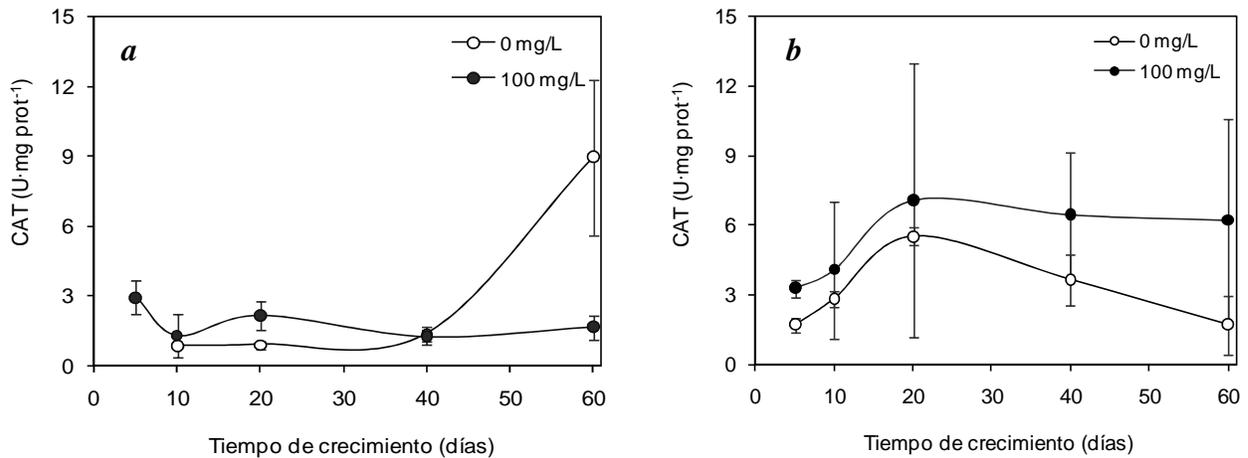
Con el objeto de definir la composición de la mezcla de reacción, se probaron diferentes cantidades (0 - 400  $\mu\text{L}$ ) del EEC en la mezcla, encontrándose la mayor actividad CAT al adicionar 400  $\mu\text{L}$  en la mezcla (Figura 6).



**Figura 6.** Actividad catalasa medida en función de la cantidad de extracto enzimático crudo adicionado en la mezcla de reacción. \* Actividad CAT con adición de 200  $\mu\text{L}$  de extracto en ausencia de  $H_2O_2$ .

## B. Actividad enzimática

En general, se encontró que en las raíces de *A. farnesiana* crecidas en ausencia de plomo, la actividad específica CAT fue más de dos veces mayor que la obtenida en la parte aérea, registrándose valores promedio de  $4.1 \pm 1.1 \text{ U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$  (en raíz) y  $1.6 \pm 0.7 \text{ U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$  (en parte aérea) (Figura 7). En las plantas crecidas en presencia de Pb se registró un ligero aumento en la actividad CAT tanto en brotes ( $2.2 \pm 0.6 \text{ U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ) y raíces ( $5.8 \pm 3.5 \text{ U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ), con respecto a las plantas sin plomo, por efecto de la presencia del metal, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.



**Figura 7.** Actividad enzimática específica de CAT en la parte aérea (a) y raíz (b) de *A. farnesiana* en función del tiempo de crecimiento. Plantas crecidas en un medio de cultivo con 0 y 100 mg Pb·L<sup>-1</sup>.

La actividad CAT obtenida en la parte aérea en presencia y ausencia de plomo, no mostró diferencias significativas a lo largo del periodo de tratamiento, con excepción de la actividad de las plantas testigo que, después de 40 días, se observó un incremento de 5 unidades obteniendo hasta 9 U·mg prot<sup>-1</sup> respecto a la actividad de las plantas con Pb que obtuvieron 2 U·mg prot<sup>-1</sup> (Figura 7a). Seregin e Ivanov (2001), mencionan que cuando las enzimas interactúan con Pb usualmente su actividad se ve inhibida, con lo anterior podría explicarse la inhibición de la actividad CAT de las plantas con Pb después de 40 días.

Durante el periodo de crecimiento (5 - 10 días) la actividad CAT en la parte aérea de plantas con Pb, no mostraron diferencias significativas en su actividad, manteniendo valores de  $1.2 \pm 0.2$  U·mg prot<sup>-1</sup> (Figura 7a). Mishra *et al* (2006) encontraron una disminución en la actividad CAT de *Ceratophyllum demersum* conforme transcurría el tiempo (2 - 7 d) aunada a una disminución de la actividad conforme aumentaba la concentración de plomo (0.2 a 20 mg de Pb·L<sup>-1</sup>). También obtuvieron en sus plantas control actividades mayores (8 U·mg prot<sup>-1</sup>) a las de *A. farnesiana* y actividades similares obtenidas en este trabajo de 2 - 8 U·mg prot<sup>-1</sup> en 20 mg de Pb·L<sup>-1</sup> en 4 y 7 días. Sharma *et al* (2005), encontraron en *Sesbania drumondi*, actividad CAT mayor (de 6 U·mg prot<sup>-1</sup> en 100 mg de Pb·L<sup>-1</sup>) respecto a sus plantas crecidas sin plomo.

En general, no se observan diferencias significativas en la actividad CAT en raíces de plantas que crecieron en un medio de cultivo contaminado con plomo con respecto a las plantas en ausencia de plomo, tampoco hubo variaciones en la actividad a través del tiempo (con excepción de las plantas control en un periodo de 60 días de crecimiento donde se

observó un aumento de tres unidades en la actividad) (Figura 7b). La actividad CAT en las raíces de plantas tratadas con Pb presentó un ligero aumento con respecto a las plantas sin Pb, aunque las diferencias entre ambos tratamientos no fueron estadísticamente significativas. La actividad CAT disminuyó en las plantas sin Pb a partir de los 20 días de crecimiento, alcanzando actividades cercanas a  $1.7 \text{ U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ .

Un aumento en la actividad CAT puede ser explicado por un aumento en su sustrato, es decir, una sobreproducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede provocar un aumento en la actividad de la enzima. Lo anterior, se ha reportado como un mecanismo de adaptación a condiciones de estrés en ciertas especies vegetales, a través del cual pueden reducirse los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las células (Reddy *et al.*, 2005).

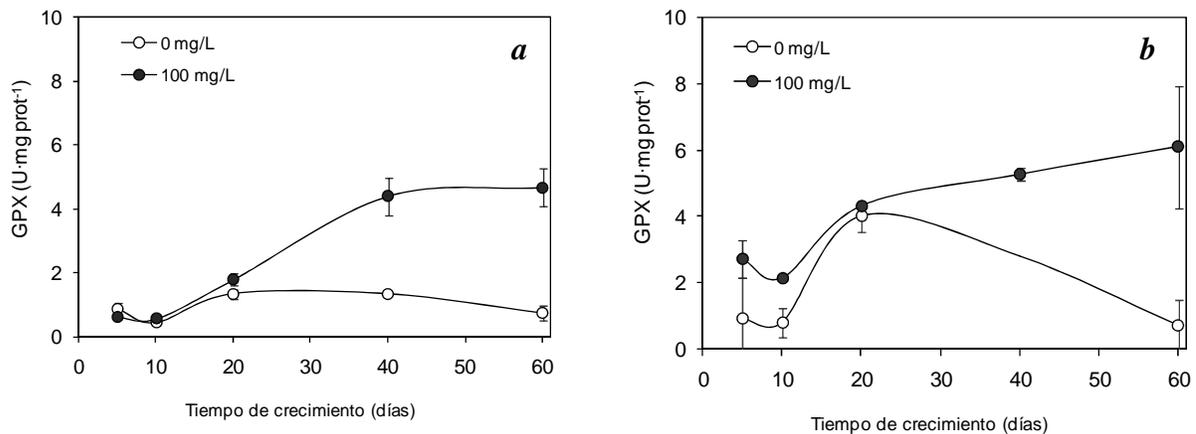
Por otra parte, la disminución en la actividad CAT, podría atribuirse a una inactivación de la enzima por una sobreproducción de ERO (Sandalio *et al.*, 2001; Verma y Dubey, 2003), debida a la disminución en la síntesis de la enzima (Verma y Dubey, 2003), o bien, a que el metal bloquea el centro activo de la enzima (Fátima y Ahmad, 2004). Otra posible razón de la disminución de actividad enzimática puede ser la degradación de la enzima inducida por proteasas peroxisomales (Sandalio *et al.*, 2001).

#### **5.4. Guaiacol peroxidasa (EC 1.11.1.7)**

Las peroxidasas se localizan en diferentes compartimentos celulares, principalmente en la pared celular, vacuola, citosol, y cloroplastos (Asada, 1992). Estas enzimas descomponen el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno pero, a diferencia de las catalasas, las peroxidasas necesitan de un agente oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y otro con características reductoras, como el guaiacol, para llevar a cabo su reacción (Van Assche y Clusters, 1990).

La inducción de algunas enzimas, como las peroxidasas y catalasas, entre otras, juega un papel significativo en el metabolismo del estrés inducido por metales (Van Assche y Clusters, 1990). Entre las estrategias de defensa contra la toxicidad de un metal en los tejidos de una planta, se encuentra la acción de peroxidasas, que combaten el aumento en la producción de ERO causado por dicho contaminante. Reddy *et al.* (2005) mencionan que el Pb puede causar estrés oxidativo en plantas, provocando un incremento en la producción de ERO.

La Figura 8 muestra la actividad de la enzima guaiacol-peroxidasa (GPX) en raíces y parte aérea de plántulas de *A. farnesiana* en función del tiempo de crecimiento. En general, la actividad enzimática tanto en raíces como en brotes fue estimulada por efecto de la presencia de plomo.



**Figura 8.** Actividad enzimática específica de la guaiacol-peroxidasa (GPX) en la parte aérea (a) y raíces (b) de *A. farnesiana* en función del tiempo de crecimiento. Las plantas fueron crecidas en un medio de cultivo con 0 y 100 mg·Pb·L<sup>-1</sup>.

En la parte aérea de las plántulas de *A. farnesiana* crecidas con plomo se detectó entre 1.3 y 6.3 veces mayor actividad respecto a la obtenida en las plantas sin plomo, mientras que en las raíces la actividad aumentó entre 2 y 8.5 veces con respecto a la actividad de las plantas sin plomo. Así mismo, se observó que la actividad GPX de las plantas que crecieron con Pb, aumentó en función del tiempo de crecimiento, encontrándose en brotes hasta 7 veces más actividad que a los 5 días de crecimiento, y en raíces 3 veces más actividad en 60 días con respecto a los 5 días. La actividad enzimática resultante de la parte aérea de las plantas sin plomo no mostró diferencias significativas en función del tiempo de crecimiento (Figura 8a). Después de 20 días no se encontraron diferencias en la actividad de ambos tejidos. La presencia de metales puede ocasionar la inhibición de algunas enzimas e inducción de otras (Van Asseche y Clusters, 1990; Tamas, 2007), en este caso la actividad GPX se mostró claramente estimulada por la presencia del Pb.

Mishra *et al* (2006), encontraron actividades GPX en *Ceratophyllum demersum* entre 10 y 30 U·mg prot<sup>-1</sup>, cuando la planta se sometió a concentraciones de plomo de 0.2 - 20 mg·L<sup>-1</sup>, en un periodo de 7 días. Este grupo reporta que la actividad GPX disminuyó conforme aumentaba la concentración de Pb en el medio de cultivo, así como el tiempo de crecimiento de las plantas (de 0 - 7 d). Sharma *et al* (2005) encontraron en *Sesbania drumondi*, que la actividad GPX disminuyó con el aumento en la concentración de Pb en el medio obteniendo, incluso, actividades menores que en las plantas sin plomo. En contraste con los resultados anteriores, en el presente trabajo se encontró que la actividad GPX aumentó significativamente con el tiempo de cultivo, en presencia de 100 mg Pb·L<sup>-1</sup>.

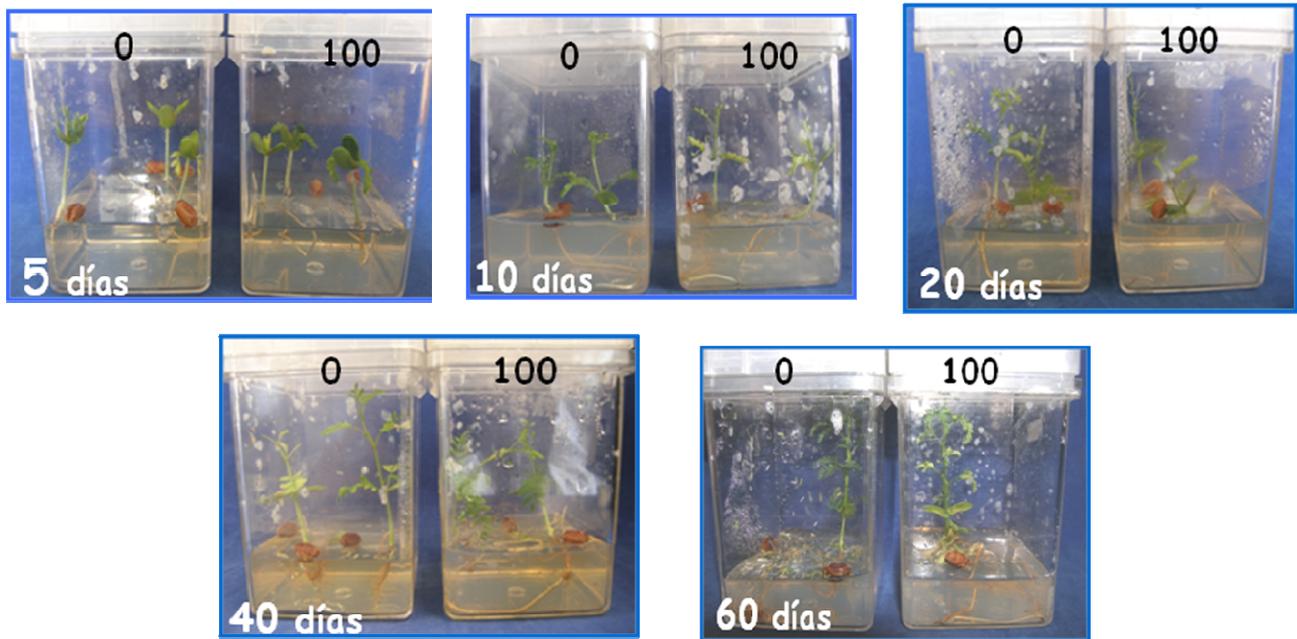
De manera similar a este trabajo, Sgherri *et al* (2001) encontraron actividad GPX mayor en raíces (8 a 15 U·mg prot<sup>-1</sup>) que en brotes (0.3 a 0.4 U·mg prot<sup>-1</sup>) en plantas de *Triticum durum* expuestas en concentraciones de cobre de 0.25 a 20 µM. Este grupo indica que la eliminación del peróxido ocurre dentro de la pared celular, vacuolas, citosol y cloroplastos, en donde estas enzimas están presentes.

### **5.5. Efecto del Pb en el crecimiento de *A. farnesiana***

Se sabe que, en general, los metales pesados provocan alteraciones metabólicas que afectan directamente el crecimiento de las plantas causando su inhibición (Seregin e Ivanov, 2001). Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la presencia de 100 mg Pb·mL<sup>-1</sup> no afectó el crecimiento (medido como peso fresco y seco y longitud de tallos y raíces) de *A. farnesiana* respecto a las plantas crecidas sin plomo. Tampoco se observó un efecto negativo en el crecimiento por el tiempo de exposición de las plantas al metal (Tabla 7 y Figura 9).

*Acacia farnesiana* no mostró efectos negativos en su crecimiento por la presencia de plomo en el medio de cultivo (Tabla 7). El peso fresco y el peso seco de plantas con y sin plomo son similares en cada periodo de crecimiento (Tabla 7). Conforme transcurría el periodo de crecimiento, el peso de las plantas aumentó, tal y como se esperaba.

En trabajos anteriores, *A. farnesiana* fue crecida en medios de cultivo con Cd y alcanzó un peso seco total de 62, 58 y 26 mg, en concentraciones de 50, 100 y 150 mg Cd·L<sup>-1</sup> respectivamente, en un periodo de 35 días. En dicho estudio se encontró que una concentración de 150 mg·L<sup>-1</sup> provocó efectos tóxicos en la planta, afectando significativamente su crecimiento. En el presente estudio, las plántulas de *A. farnesiana* no mostraron efectos negativos en su crecimiento durante 60 días, por efecto del plomo. Incluso, con esta misma especie creciendo en concentraciones de 100, 250 y 500 mg·L<sup>-1</sup> de Pb, Salas *et al.* (2007) no observaron efectos tóxicos aún en 500 mg Pb·L<sup>-1</sup>.



**Figura 9.** Efecto del Pb ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en el crecimiento de plántulas de *A. farnesiana* durante 60 días, en condiciones *in vitro*.

A pesar de que la raíz es el primer órgano expuesto a los metales, además de ser un órgano especializado para absorción (Xion, 1997), no se encontraron efectos tóxicos por efecto de la presencia de plomo, los cuales se cuantificaron a través de su longitud. Se encontró, incluso, que la longitud de las raíces de plantas crecidas con Pb fue de 3 a 5 unidades mayor, después de los 20 días, que la longitud de las plantas sin plomo (Tabla 7). Salas *et al* (2007) reportaron un incremento de 20% en la longitud de la raíz en *A. farnesiana* aún en concentraciones más altas de Pb (100, 250 y 500 mg/L), respecto a las plantas sin el metal, este resultado lo relacionan con el IT que fue mayor al 100% (130, 150 y 160% en concentraciones de 100, 250 y 500 mg  $\text{Pb}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente). Duo (1988) menciona que el Pb no se considera un elemento esencial para el crecimiento de las plantas, pero parece estimularlo en algunas especies cuando se encuentra en pequeñas cantidades. El crecimiento de las raíces es más sensible a la presencia de metales pesados que el crecimiento de los tallos. El Pb puede afectar también la morfología de la raíz (Seregin e Ivanov, 2001). Lane y Martín (1997) indican que los metales pesados afectan la radícula saliente y el crecimiento de la planta. Lo antes mencionado no coincide con los resultados obtenidos en este estudio, ya que como se ha dicho, las plantas crecidas con Pb presentaron mayor longitud que las plantas testigo.

**Tabla 7.** Efecto del Pb en el crecimiento e Índice de tolerancia (IT) de plantas de *Acacia farnesiana* en función del tiempo de crecimiento.

Tiempo (días)	0 mg/L			100 mg/L			IT (%) <sup>a</sup>
	Peso fresco total (mg)	Peso seco total (mg)	Longitud raíz (cm)	Peso fresco total (mg)	Peso seco total (mg)	Longitud raíz (cm)	
5	269.1 ± 39.8	28.6 ± 0.8	5.0 ± 1.0	240.2 ± 7.8	27.0 ± 1.6	5.4 ± 1.3	107 ± 27
10	317.3 ± 20.2	31.2 ± 1.8	8.6 ± 0.5	287.7 ± 6.3	33.2 ± 3.3	7.4 ± 1.5	91 ± 18
20	305.9 ± 24.7	34.9 ± 0.5	7.7 ± 0.2	339.7 ± 59.2	28.4 ± 0.3	10.7 ± 3.0	121 ± 19
40	342.1 ± 53.9	28.1 ± 2.0	13.1 ± 0.4	386.2 ± 24.9	33.4 ± 3.6	18.1 ± 4.7	126 ± 33
60				455.8 ± 48.2	46.0 ± 10.2	19.0 ± 2.9	145 ± 22

<sup>a</sup> IT: el índice de tolerancia, indica la capacidad de una planta para crecer en lugares contaminados sin presentar efectos tóxicos.

La tolerancia puede definirse como las adaptaciones que tienen algunas especies para crecer y reproducirse en lugares fuertemente contaminados (Baker, 1987). La capacidad de una planta para tolerar y acumular metales pesados es específica de cada especie (Seregin e Ivanov, 2001). La Tabla 7 muestra el índice de tolerancia de *A. farnesiana* a una concentración de Pb de 100 mg·L<sup>-1</sup> en diferentes tiempos de crecimiento. En general, las plantas con plomo mostraron un índice de tolerancia mayor al 100% durante todo el periodo de crecimiento en relación al índice de las plantas sin el metal (100% de tolerancia). Los mecanismos de tolerancia de una especie hacia el Pb, se relacionan con su compartimentalización en lugares específicos de las células, como la pared celular (Mengel y Kirkby, 1982), o bien, por su acomplejamiento por proteínas ricas en cisteína como las fitoquelatinas (Rauser, 1995).

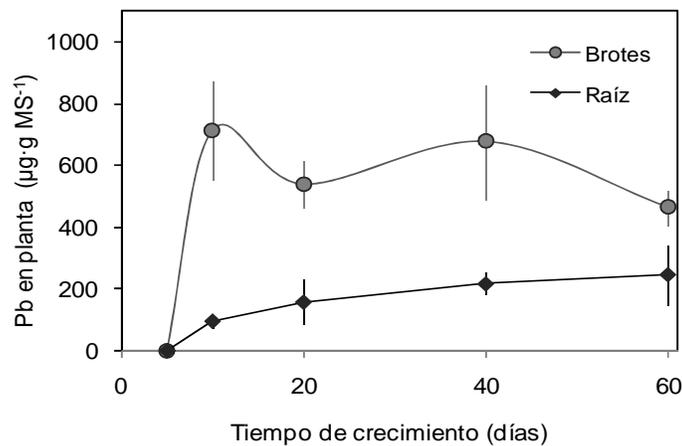
Por otra parte, como se ha mencionado, la presencia de metales en las plantas también provoca un estrés oxidativo. Para tolerar dicha condición, ocurren cambios en la actividad de una o más enzimas antioxidantes, previniendo así el daño a las células y al tejido vegetal (Martínez-Domínguez *et al.*, 2007). Se ha demostrado que las plantas tolerantes sintetizan este tipo de enzimas; en dichas plantas, se activan mecanismos para la eliminación de metales. Algunos de esos mecanismos son constitutivos de la célula y algunos son inducidos por los metales (Seregin e Ivanov, 2001).

### 5.6. Acumulación de plomo por *A. farnesiana*

En general, se ha encontrado que el contenido de metales pesados en organismos vegetales que los acumulan decrece en el siguiente orden: raíces>hojas>tallos>inflorescencias>semillas; sin embargo, este orden puede variar en función de la especie de la planta (Antosiewicz, 1992; Seregin e Ivanov, 2001).

Generalmente, el Pb es mayormente almacenado en el sistema radicular que en la parte aérea de una planta, debido a que primero es absorbido por las raíces y posteriormente es translocado a la parte aérea (Seregin e Ivanov, 2001; Sharma y Dubey, 2005). Una razón de lo anterior, es que este metal tiene muy baja movilidad tanto en suelos como en el tejido vegetal (Fischerová *et al.*, 2006).

En el caso de *A. farnesiana*, se encontró que a la concentración de Pb estudiada, la especie acumula mayor cantidad (2 a 7 veces más) en la parte aérea que en las raíces, y que esto ocurre a partir de los 10 días de crecimiento (Figura 10), encontrando concentraciones entre 464 - 711 mg Pb kg<sup>-1</sup> de materia seca en brotes entre los 10 y los 60 días. En cuanto a las raíces, se observó que la concentración de plomo aumentó en función del tiempo, alcanzando un máximo de 249 mg Pb kg<sup>-1</sup> materia seca a los 60 días.



**Figura 10.** Acumulación de Pb en brotes y raíz de *A. farnesiana* en función del tiempo de cultivo *in vitro* en una concentración de 100 mg·Pb L<sup>-1</sup>.

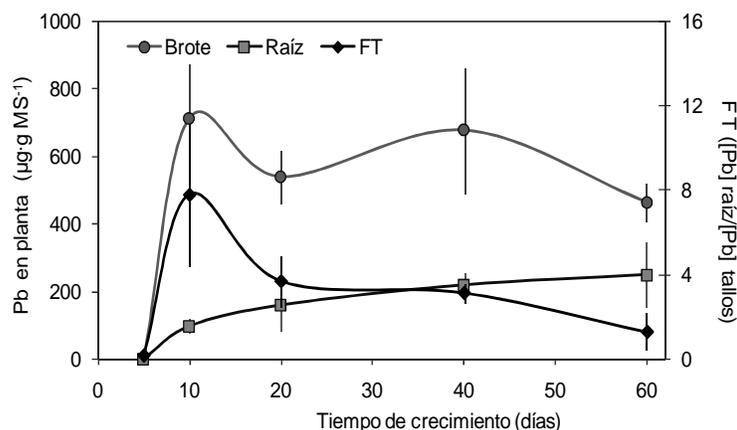
Estos resultados contrastan con lo reportado por Huang y Cunningham (1996), quienes indican que en general, las plantas dicotiledoneas acumulan cantidades significativamente mayores de Pb en raíces que las monocotiledoneas, siendo *A. farnesiana* una planta

dicotiledónea y acumulando mayor cantidad de plomo en su parte aérea en una concentración de 100 mg de Pb·L<sup>-1</sup> (Tabla 7 y Figura 10).

Sharma y Dubey (2005) realizaron un estudio con *Oryza sativa*, la cual fue expuesta a concentraciones de 500 y 1000 μM Pb<sup>-1</sup> durante 10 y 20 días. Sus resultados reportan que encontraron mayor acumulación de Pb en la raíz (0.72 μmol Pb·g<sup>-1</sup> MS-10 días y 0.80 μmol Pb·g<sup>-1</sup> MS-20 días) que en la parte aérea (0.16 μmol Pb·g<sup>-1</sup> MS-10 días y 1.22 μmo Pb·g<sup>-1</sup> MS-20 días) en ambos periodos de crecimiento. En general la raíz acumuló 1.7 y 3.3 veces más plomo comparado con los brotes. Estos autores atribuyen sus resultados a que el Pb se mueve predominantemente dentro del apoplasto de la raíz y atraviesa el córtex de forma radial, acumulándose cerca de la endodermis; esta última actúa como una barrera parcial en algunos movimientos del Pb entre la raíz y el brote.

En trabajos anteriores, *A. farnesiana* fue sometida, en cultivos *in vitro*, a diferentes concentraciones de Pb (100, 250 y 500 mg·L<sup>-1</sup>), encontrándose que la acumulación del metal en los tejidos de la planta depende de la concentración inicial en el medio y que con 100 mg Pb L<sup>-1</sup> la translocación a brotes es más eficiente que con 250 y 500 mg Pb L<sup>-1</sup>. En estas últimas concentraciones, *A. farnesiana* acumuló mayor cantidad de plomo en raíces (1996 y 2240 mg Pb kg<sup>-1</sup> respectivamente) que en brotes (386 y 428 mg Pb kg<sup>-1</sup> respectivamente) (Salas *et al.*, 2007). Estos resultados confirman lo obtenido en este trabajo en lo referente a la concentración de Pb de 100 mg·L<sup>-1</sup>, ya que se obtuvieron mayores cantidades de Pb en la parte aérea de la planta. Estos resultados pueden atribuirse a que en dicha concentración, el Pb se encuentra totalmente soluble. En concentraciones mayores a 100 mg Pb·L<sup>-1</sup> una parte del metal se encuentra precipitada.

Una planta hiperacumuladora, es decir que tiene una alta eficiencia de transporte raíz-brotes, tiene un factor de translocación (FT) generalmente mayor a 1, entre otras características (McGrath y Zhao, 2003). En la Figura 11, se muestra el factor de translocación para *A. farnesiana*, y se observa que a los 10 días la translocación de plomo a brotes fue alta, encontrando un valor para el FT de 7.8 ± 3.4. Posteriormente, con el transcurso del tiempo de crecimiento, el valor del FT disminuyó entre 4 y 7 unidades con respecto a los 10 días. Se observó una relación en función del tiempo entre la disminución del factor de translocación, el aumento en la concentración de Pb en la raíz y la disminución en la concentración de Pb en la parte aérea (Figura 11).

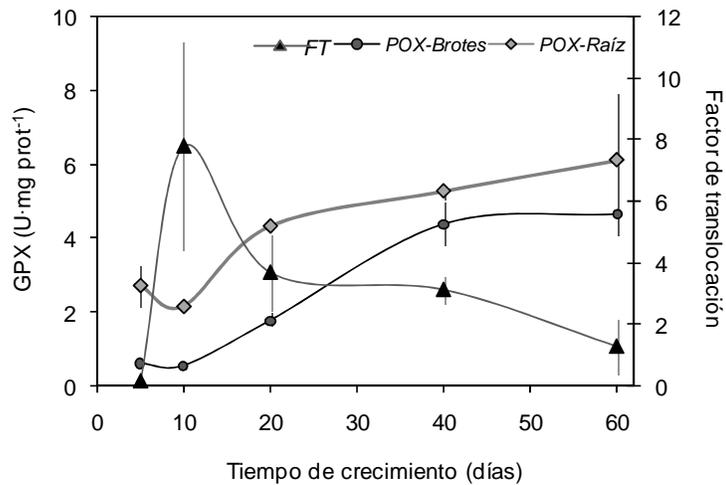


**Figura 11.** Relación entre el factor de translocación (FT♦) y la acumulación de Pb en brotes (●) y raíces (■) en función del tiempo de crecimiento en cultivos *in vitro*. Valores > 1 en el FT indican un transporte eficiente de raíz a brotes.

### 5.7. Actividad de enzimas antioxidantes y acumulación de Pb

Se sabe que el Pb es un causante de estrés oxidativo en plantas, provocando un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Reddy *et al.*, 2005). Los resultados de este trabajo demuestran una relación entre la acumulación de metal y la actividad una enzima antioxidante como la guaiacol-peroxidasa (GPX). La actividad GPX en las raíz de plantas crecidas sin plomo fue menor que la de las raíces de las plantas que crecieron con Pb. En este caso, se observó una relación directa en la acumulación de Pb y la actividad enzimática en función del tiempo, ambas variables aumentaron ligeramente con el tiempo de crecimiento (Figura 12).

La respuesta de la GPX al estrés por metales pesados varía considerablemente dependiendo de la especie de la planta y el metal utilizado; sin embargo, el papel de la enzima en el metabolismo celular de detoxificación de metales aún no es claro (Gratao *et al.*, 2005). Por ejemplo, se ha reportado que plantas de *Glycine max* tratadas con Cd en concentraciones de 0 a 1.35 µM tuvieron un incremento en la actividad GPX (Lee *et al.*, 1976). *Ceratophyllum demersum* mostró un incremento del 41 y 17% en la actividad GPX respecto al control, por efecto de un tratamiento con Cd + Zn (200 µM) y Cd (10 µM) respectivamente (el Zn tienen un papel en la modulación de los radicales libres). Este grupo atribuye sus resultados a que el estrés oxidativo y el daño a la membrana inducido por el cadmio es combatido eficientemente por el Zn como un sistema enzimático antioxidante activo que controla el daño y la peroxidación de la membrana (Aravind y Prasad, 2003).



**Figura 12.** Relación entre el factor de translocación (FT ▲) y actividad GPX en parte aérea (●) y raíces (◆) en función del tiempo de crecimiento en cultivos *in vitro*.

En este sentido, Teisseire y Guy (2000) encontraron que un tratamiento con  $\text{CuSO}_4$  (0-10  $\mu\text{M}$ ) provocó un aumento en la actividad GPX en *Lemna minor*, observando la mayor actividad ( $102.6 \pm 15.1 \text{ nmol mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) en concentraciones de 0.5  $\mu\text{M}$ , aumentando 171% respecto al control (Teisseire y Guy, 2000). En contraste, en plantas de chícharo expuestas a Cd (40-50  $\mu\text{M}$ ) la actividad GPX disminuyó de 30 a 15  $\text{U mg}^{-1} \text{ proteína}$  (en 40  $\mu\text{M}$ ) y de 35 a 22  $\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$  (en 50  $\mu\text{M}$ ) con respecto al control (Sandalio *et al.*, 2001). En *Sesbania drumondi* también se observó una disminución en la actividad GPX de 0.34 a 0.14  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de peso húmedo cuando se aumentó la concentración de 0 a 1000  $\text{mg de Pb} \cdot \text{L}^{-1}$  respectivamente. Sin embargo, esta misma especie, en tratamientos con Cu la actividad GPX aumentó considerablemente (0.35 a 0.42  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de peso húmedo) en concentraciones de 20 y 100  $\text{mg Cu L}^{-1}$  respectivamente (Sharma *et al.*, 2005).

En contraste a lo obtenido para la GPX en *A. farnesiana*, el plomo no tuvo un efecto significativo en la actividad CAT. Otros grupos han reportado una disminución en dicha actividad por efecto de la presencia de metales pesados. Verma y Dubey (2003) observaron una disminución en la actividad CAT en *Oryza sativa* por efecto del plomo. Mishra *et al.* (2006) obtuvieron una baja actividad CAT en *Ceratophyllum demersum* por efecto de la presencia de plomo en una concentración de 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; este resultado fue atribuido a que en esa concentración de Pb, las enzimas pueden inactivarse por el incremento en el nivel de ERO, debido al posible incremento excesivo en el nivel de  $\text{H}_2\text{O}_2$  provocando la inactivación de la CAT. También se demostró que la actividad CAT en raíces de *Triticum durum* disminuyó de 5 a 0.5 y en hojas de 95 a 50  $\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$  por efecto de la exposición a Cu (0 -

4  $\mu\text{M}$ ) (Sgherri *et al.*, 2001). Sandalio *et al.* (2001) reportaron una disminución del 50%, respecto al testigo, en la actividad CAT por efecto del Cd en concentraciones de 40 and 50  $\mu\text{M}$ .

También se ha observado que la actividad CAT puede aumentar considerablemente por efecto de la exposición a metales pesados. Por ejemplo, en *Sesbania drumondi* se encontró un aumento de 3 a 4 unidades por efecto de la presencia de Pb y Cu, en concentraciones de 0 – 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Sharma *et al.*, 2005). En *Lemna minor*, la presencia de  $\text{CuSO}_4$  (0.5 - 1  $\mu\text{M}$ ) provocó un aumento de 156% en la actividad CAT respecto al control (Razinger *et al.*, 2007). Con base en lo anterior, así como en los resultados obtenidos en el presente trabajo, puede verse que no existe una respuesta generalizada en cuanto a la respuesta de esta enzima cuando se favorecen las condiciones para provocar un estrés oxidativo por la presencia de metales como el plomo. La respuesta en la actividad CAT depende, por lo tanto, de la especie de planta, así como del tejido y tipo de metal (Kuo y Kao, 2003).

# **Capítulo 6.**

# **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

- ◆ Se establecieron que las condiciones para la obtención de extractos enzimáticos crudos de *A. farnesiana* fueron los siguientes: (i) ruptura de biomasa con N<sub>2</sub> líquido por 3 min.; (ii) resuspensión del homogeneizado en buffer de fosfatos 100 mM a pH 6.5) y (iii) centrifugación a 12000 rpm a 4°C por 10 min.
- ◆ Se establecieron los métodos para cuantificar la actividad de las enzimas guaiacol-peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) en extractos enzimáticos crudos de tejidos de *A. farnesiana*. Para lo anterior, se utilizó buffer de fosfatos (100 mM, pH 6.5) en una proporción 1:1 tejido:buffer.
- ◆ La presencia de 100 mg Pb·L<sup>-1</sup> estimuló la actividad GPX en brotes y raíces de *A. farnesiana* con respecto a las plantas sin el metal, encontrando un aumento significativo (2 a 6 veces en parte aérea y raíz) en la actividad a partir de los 10 días de cultivo. Este resultado se relaciona con el tiempo en el que la planta comienza a acumular plomo en sus tejidos aéreos.
- ◆ La actividad CAT en raíces y brotes de *A. farnesiana* no mostró cambios significativos por efecto de la presencia de plomo ni por el tiempo de cultivo, en relación con las plantas sin el metal.
- ◆ El índice de tolerancia de las plantas crecidas en presencia de 100 mg Pb L<sup>-1</sup> osciló entre 91 y 145%, lo que indica que *A. farnesiana* es una especie que tolera dicha concentración de plomo e, incluso, la presencia del metal estimula su crecimiento.
- ◆ La acumulación de plomo por *A. farnesiana* inició a los 10 días de crecimiento. La cantidad del metal acumulada en tallos no varió significativamente en el tiempo, permaneciendo entre 464 y 711 mg Pb kg<sup>-1</sup> biomasa seca. Sin embargo, se encontró que el plomo acumulado en raíces (96 - 249 mg Pb kg<sup>-1</sup> BM seca) aumentó con el tiempo de cultivo.
- ◆ Se encontró una relación directa entre la acumulación de plomo y la actividad GPX en *A. farnesiana*. En la parte aérea la actividad GPX aumentó por efecto de la presencia de plomo. En la raíz la actividad GPX se incrementó junto con el aumento de la concentración de plomo en dicho órgano durante el tiempo del cultivo.

**Capítulo 7.**  
**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abollino, O. 2002. Distribution and mobility of metals in contaminated sites. chemometric investigation of pollutant profiles. *Environmental Pollution* 119:177-93.
- Ali M. B., Vajpayee P., Tripathi R. D., Singh S. N., Singh S. N. 2003. Phytoremediation of Lead, Nickel, and Copper by *Salix acmophylla* Boiss: Role of Antioxidant Enzymes and Antioxidant Substances. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*.70:462–469.
- Alloway BJ .1995. The origin of heavy metals in soils. In: Alloway BJ (ed) Heavy Metals in Soils. Blackie Academic & Professional,London. ISBN 0-7514-0198-6, pp 39–57.
- Antosiewicz, D.M. 1992. Adaptation of Plants to an Environment Polluted with Heavy Metals, *Acta.Soc Bot.Polon.* 61: 281–299.
- Antosiewicz, D., Wierzbicka, M., 1999. Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. *J. Microscopy.* 195: 139–146.
- Aravind P y Prasad M.N.V. 2003. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L. a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology Biochemical.* 41 391–397.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxidescavenging enzyme in plants. *Physiology Plant.* 85: 235–41.
- Baker, A.J.M. 1987. Metal Tolerance. *New Phytology.* (106): 93-111.
- Carpena R.O., Berna M. P. 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas.* 16 (2): 1-3 pp.
- Chaney R. L., Malik M., Li Y. M., Brown S. L., Brewer E.P., Scott Angle J., Baker A.J.M. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology.* 8: 279-284.
- Chen Y.X., He Y. F., Yu Y. L., Lin Q., Wong M. H. 2003. Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere* 50: 789-793.
- Cox S. 2000. Mechanisms and Strategies for Phytoremediation of Cadmium. Department of Horticulture Colorado State University.  
Pagina de Internet <http://lamar.colostate.edu/~samcox/index.htm>
- Deng H., Ye Z. H., Wong M. H. 2004. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environmental Pollution.* 132: 29-40.
- EPA 7000A-1 (Environmental Protection Agency). 1992. Atomic Absorption Methods. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods.
- EPA. Introduction to phytoremediation. Washington: U.S. Environmental Protection Agency; 2000. EPA/600/R-99/107.
- EPA-6010 B. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Rev 2. 1996
- EPA/600/R-99/107 (Environmental Protection Agency). 2006. Introduction to phytoremediation.. National Risk Management Research Laboratory. Office of Research and Development U.S. Cincinnati, Ohio 45268.

- Fatima, R.A., Ahmad, M., 2004. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment*. 346: 256–273.
- Fischerová Z., P. Tlustos, J. Száková, K. Sichorová. 2006. A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environmental Pollution*. 144: 93-100.
- Freitas, H., Prasad, M.N.V., Pratas, J., 2004. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of Sao Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *En. vironment Internationa*30: 65–72.
- Foyer, C. y G. Noctor. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. 28: 1056–1071.
- Galston, A.W. 1955. Plant Catalase. *Methods in Enzymology*: 789-791.
- Gardea-Torresdey, J.L.; J.R. Peralta-Videa, G. de la Rosa, J.G. Parsons. 2005. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews*. 249: 1797-1810.
- Gratão P. L., Polle A., Lea P. J., Azevedo R. A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*. 32: 481- 494.
- Huang, J.W., Chen, J., Berti, W. R.; Cunningham, S. D. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology*. 31: 800-805.
- Igamberdiev A.U, Lea P. J. 2002. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. *Phytochemistry*. 60: 651-674.
- Kim Y.H. y Yoo Y.J. 1996. Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. *Enzyme and Microbial Technology*.18: 531-535.
- Keller, C., Hammer, D., Kayser, A., Richner,W., Brodbeck, M., Sennhauser, M. 2003. Root development and heavy metal extraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant Soil*. 249: 67-81.
- Kuo M.C. & Kao C.H. 2004. Antioxidant enzyme activities are upregulated in response to cadmium in sensitive, but not in tolerant, rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 45: 291–299.
- Lane B.S.D. y Martin E.S. 1977. A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. *New Phytologist*. 79:281-286.
- Lasat M.M. 2002. Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality*. 31: 109-120.
- Lee KC, Cunningham BA, Poulsen GM, Liang JM, Moore RB. 1976. Effects of cadmium on respiration rate and activites of several enzymes in soybean seedlings. *Physiology Plant*. 36:4-6.
- Lowry, O.H., Rosenberg, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*. 193: 265–275.

- Martínez-Domínguez D., de las Heras M. A., Navarro F., Torronteras R., Córdova F. 2007. Efficiency of antioxidant response in *Spartina densiflora*: An adaptative success in a polluted environment. *Environmental and Experimental Botany*. 62 (1): 69-77.
- Martínez M., 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 189 pag.
- McGrath, S.P. y F.J. Zhao. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 277-282.
- Mengel K., Kirkby E.A. 1980. Principles of Plant Nutrition, International Potash Institute, Norblaufen-Bern, Switzerland. 198 p.
- Milone M. T., Sgherri C., Clijsters H., Navarilzzo F. 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 50. 265-276.
- Mishra S. Srivastava S., Tripathi R.D., Kumar R., Seth C.S., Gupta D.K. 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*. 65: 1027–1039.
- Moller I.M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. (52): 561-591. Doi: 10.1146/qnnurev.arplant. 52.1.561.
- Ndung'u K., Hibdón S., Russell A. 2004 Determination of lead in vinegar by ICP-MS and GFAAS: evaluation of different sample preparation procedures. *Talanta*. 64: 258-263.
- Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Diario Oficial de la Federación. 02 de marzo de 2007.
- Olivares E, Peña E, Aguiar G. 2002. Nutrición mineral y estrés oxidativo por metales en espinaca y lechuga, en comparación con dos malezas asociadas, en cultivos semi-urbanos. INCI. 27(9).
- Raskin, I., D.S. Smith y D.E. Salt. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*. 8: 221-226.
- Parrotta, J. A. 1992. *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Aroma, huisache. SO-ITF-SM-49. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. p 6.
- Prasad V.M.N. y Freitas de O.H.M. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3 (6): 122-129.
- Rauser, W.E. 1995. Phytochelatins and Related Peptides: Structure, Biosynthesis and Function, *Plant Physiol.*109: 1141–1149.
- Razinger J., Dermastia M., Drinovec L., Drobne D., Zrimec A., Dolenc K. J. 2007. Antioxidative Responses of Duckweed (*Lemna minor* L.) to Short-Term Copper Exposure. *Environmental Science and Pollution*. 14 (3) 194 – 201.

- Reddy, A.M., Kumar, S.G., Jyonthsnakumari, G., Thimmanaik, S., Sudhakar, C., 2005. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*. 60: 97-104.
- Rivera F., Buente L.L.O., Bet., Días de León F., Pérez F. 2008. Especies reactivas de oxígeno en las plantas: En Radicales libres y estrés oxidativo Aplicaciones médicas (Konigsber M.). Manual Moderno. 501-517 pp.
- Robinson B. H, Lombi E, Zhao FJ and McGrath S. P. 2003. Uptake and Distribution of Nickel and other Metals in the Hyperaccumulator *Berkheya Coddii*. *New Phytologist*. 158: 279–285.
- Rodríguez O.J.C., Rodríguez F. H., de Lira R.G., Martínez de la C. J., Lara M. J. L. 2006. Capacity of six plant species to accumulate lead in contaminated soils. *Fitotec*. 29(3): 239-245.
- Rzedowski G. C. de, J. Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México. 358 p.
- Salas S. F. Volke-Sepulveda T. 2007. Selección in vitro de plantas tolerantes a plomo para su uso en fitorremediación. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Posgrado en Biotecnología. Tesis de Especialización en Biotecnología. 24 p.
- Santos de Araujo, B., de Oliveira J.O., Salgueiro-Machado S. y Pletsch M. 2004. Comparative studies of the peroxidases from hairy roots of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Plant Science*. 167: 1151-1157.
- Salt D. E., Prince R. C., Pickering I. J., Raskin I. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in *Indian mustard*. *Plant Physiol*. 109: 4 pp. 1427-1433. NAL Call No. 450-P692.
- Salt D. E., Smith R. S., Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 643-668.
- Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gómez M., Romero P. M. C. Del Río L. A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism-induced Changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 52 (364): 2115-2126.
- Scandalios JG, Acevedo A, Ruzsa S. 2000. Catalase gene expression in response to chronic high temperatures stress in maize. *Plant Science*. 156: 103-110.
- Schützendübel A y A. Polle. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy-metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. 53 (372): 1351-1365.
- Sharma N. C., Sahi S. V., Jain J. C. 2005. *Sesbania drummondii* cell cultures: ICP-MS determination of the accumulation of Pb and Cu. *Microchemical Journal*. 81: 163-169.
- Sharma P y Dubey R. S. 2005. Lead toxicity in plants. (toxic metals in plants. *Plant Physiology*. 17(1): 35-52.
- Sgherri C., Milone M. Teresa A., Clijsters H., Navari-Izzo F. 2001. Antioxidative enzymes in two wheat cultivars, differently sensitive to drought and subjected to subsymptomatic copper doses. *Journal Plant Physiology*. 158: 1439–1447.

- Seregin I. V. e Ivanov V. B. 2001. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 48(4): 523–544.
- Solis-Ibarra A., Volke-Sépúlveda T., Ramírez I.M.E. Vela C.G. 2007. Evaluación de especies vegetales tolerantes y/o hiperacumuladoras para su potencial uso en fitorremediación de suelos. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Informe de servicio social. Departamento El Hombre y su Ambiente. 36 p.
- Srivastava M., Ma L.Q., Singh N. y Singh S. 2005. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *Journal of Experimental Botany*. 56 (415): 1335-1342.
- Stobrawa K y Lorenc-Plucińska G. 2007. Changes in antioxidant enzyme activity in the fine roots of black poplar (*Populus nigra* L.) and cottonwood (*Populus deltoides* Bartr. ex Marsch) in a heavy-metal-polluted environment. *Plant Soil* .298:57–68.
- Strayer L. 1988. Biochemistry. Third Edition. Ed. Reverté, S. A. 1071 p.
- Tamas L., Durcekova K., Haluskova L., Huttova J., Mistrik I., Olle M. 2007. Rhizosphere localized cationic peroxidase from barley roots is strongly activated by cadmium and correlated with root growth inhibition. *Chemosphere*. 66: 1292–1300.
- Teisseire H., Couderchet M., Vernet G. 1998. Toxic Responses and Catalase Activity of *Lemna minor* L. Exposed to Folpet, Copper, and Their Combination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 40, 194-200.
- Teisseire H y Guy V. 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science*. 153: 65–72 pp.
- Thomas J. Santner y Diane E. Duffy. 1964. The statistical analysis of experimental data. John Mandel and Dover. ISBN 0-486-64666-1.
- Tayefi-Nasrabadi H. 2008. Some Biochemical Properties of Catalase from Kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*). *Journal of Biological Sciences*. 8 (3): 649-653.
- Van Assche F. y Clijsters H.1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*. 13: 195-206.
- Vassilev A, Schwitzguebel JP, Thewys T, Van Der Lelie D, Vangronsveld J. 2004. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *Scientific World Journal*.16(4):9-34.
- Vengadesan G., Ganapathi A., Amutha S., Selvaraj N. 2002. Review In vitro propagation of *Acacia* species. *Plant Science*.163: 663-671 pp.
- Verma S y Dubey R.S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plant. *Science citation index*. 164:645-655.
- Volke-Sepúlveda T., Velasco T.J.A. y De la Rosa D. A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología - Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (INE-SEMARNAT). 141 pp.
- Wei-Ching F y Ching H. K. 2000. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Science*. 158: 71–76.

- Willekens H., Langebartels C., Tiré C., Van Montagu M., Inze D., Van Camp W. 1994. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. (91): 10450-10454.
- Xiong Z.T. 1997. Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. *Environmental Pollution*. 97: 275–279.
- Yong H. K. y Young J. Y. 1996. Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Science. 18:531-535.

México D.F. a 31 de julio del 2009

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**FITORREMEDIACIÓN DE PLOMO POR *Acacia farnesiana* (L) Willd  
EN CULTIVOS *in vitro* Y DETERMINACIÓN DE ENZIMAS  
ANTIOXIDANTES INVOLUCRADAS**

Que presentó

Asmaveth solis Ibarra

Comité tutorial:

Directora: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda



Lector: Dr. Ernesto Favela Torres

