

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE GENÓTIPOS DE
TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.) CRESCIDOS NA
PRESENÇA DE CÁDMIO**

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO EM AGRONOMIA

ÁREA DE ATUAÇÃO: FISIOLOGIA VEGETAL

AUTOR: IVAN LUIS ZENZEN

PELOTAS, 2008

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO EM AGRONOMIA

Acadêmico: Ivan Luis Zenzen

Orientador profissional: Prof. Dr. Marcelo Ehlers Loureiro

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Luciano do Amarante

Local do estágio: Universidade Federal de Viçosa

PELOTAS, JUNHO de 2008

Prof. Nei Fernandes Lopes
(Prof. Avaliador)

Prof^a. Denise dos Santos Colares
(Prof. Avaliador)

Prof^a. Beatriz Helena Gomes
Rocha
(Prof. Avaliador)

Prof. Luciano do Amarante
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades, conquistas, conhecimentos e força concedidos ao longo do curso e do estágio.

Aos meus pais Edemir José Zenzen e Ivone Maria Zenzen, pelo apoio, conselhos e principalmente pelas maiores orientações que recebi em minha vida.

À minha irmã Ana Carolina Zenzen, pelo amor e carinho, além das acolhedoras saudações de boas vindas e consternadas despedidas durante todas as “idas e vindas”.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ehlers Loureiro, pela disponibilidade na realização das atividades de estágio, pelos conselhos e pela orientação.

Ao Prof. Dr. Luciano do Amarante, pelo apoio, incentivo, amizade, confiança, e orientação no decorrer de todo curso de graduação.

À Profa. Denise, minha primeira orientadora, quem me apresentou à Bioquímica, tanto em sala quanto em laboratório.

Às grandes amizades firmadas na faculdade, Dani, Gisela, Vanessa(s), Alexandre, Daniel, Felipe, Tironi... e na Casa do Estudante, em especial à Dany, Fer, Silvia, Alan, Alex Piuco, Eduardo, Samuka...

Aos amigos e companheiros de república em Viçosa, Francis, Tiago, Vinícius e Winder, pela acolhida, amizade e apoio prestado no período de estágio.

Ao companheirismo, amizade e profisionalismo dos colegas de estágio da UFPel, Ana Paula, Cecília, Daniela, Gabriela, Giulia, Helen, Marciabela, Marilândia, Milene, Tanize, Arthur, Dênis, Gabriel, Hugo, Pablo, Peruso, Tiago...

Aos demais Professores da Fisiologia Vegetal da UFV, em especial ao Prof. Dr. Fábio Murilo da Matta e ao Prof. Dr. Raimundo Santos Barros, pelo auxílio prestado.

À Mercês, pelo auxílio nas atividades laboratoriais, pela amizade e “puxões de orelha” merecidos e necessários...

Aos amigos e colaboradores de estágio da UFV, Ana Paula, Daniela, Déborah, Elaine, Gisele, Laiany, Liliane, Michele, Viviane, Abelardo, Daniel, Diego, Elton, Ezequiel, Téssio, Valdir, Werner, Samuel..., sem os quais a realização das atividades se tornaria muito mais difícil e onerosa.

À Universidade Federal de Pelotas pelo curso de Agronomia oferecido.

À Universidade Federal de Viçosa pelo estágio de conclusão de curso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Contaminação ambiental e consequências aos organismos.....	17
2.2. Radicais livres e estresse oxidativo.....	20
2.3. Mecanismos de defesa vegetal à metais pesados.....	24
2.3.1. Sistema antioxidante não enzimático.....	25
2.3.1.1. Glutatona.....	25
2.3.1.2. Ascorbato.....	27
2.3.1.3. α -tocoferol.....	30
2.3.1.4. Carotenóides.....	33
2.3.1.5. Fitoquelatinas.....	35
2.3.1.6. Metalotioneínas.....	38
2.3.2. Sistema antioxidante enzimático.....	40
2.3.2.1. Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	40
2.3.2.2. Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	42
2.3.2.3. Glutatona redutase (GR, EC 1.8.1.7).....	43
2.3.2.4. Glutatona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18).....	45
2.3.2.5. Monodeidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4).....	48
2.3.2.6. Deidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1).....	49
2.3.2.7. Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11).....	50
2.4. Ácido Abscísico (ABA).....	52
2.4.1. Histórico, caracterização e compartmentalização.....	52
2.4.2. Síntese do ABA.....	55
2.4.3. ABA e estresse em plantas.....	57
2.4.4. Utilização de mutantes em estudos envolvendo ABA.....	58

2.4.5. Tomateiros (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) ABA-mutantes.....	60
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.1. Material biológico.....	62
3.1.1. Propagação das sementes.....	62
3.1.2. Obtenção das plântulas por cultivo <i>in vitro</i>	63
3.2. Avaliações.....	65
3.2.1. Crescimento.....	65
3.2.2. Determinação de pigmentos.....	65
3.2.3. Obtenção do extrato enzimático bruto.....	66
3.2.4. Determinação de proteínas.....	66
3.2.5. Atividade de enzimas antioxidantes.....	67
3.2.5.1. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	67
3.2.5.2. Determinação da atividade da catalase (CAT).....	68
3.2.5.3. Determinação da atividade da peroxidase (POX).....	68
3.2.6. Determinação da peroxidação de lipídeos (MDA).....	68
3.2.7. Delineamento experimental e análise estatística.....	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1. Crescimento.....	70
4.1.1. Germinação.....	70
4.1.2. Massa fresca total (M _{Ft}), massa fresca da parte aérea (M _{fa}) e massa fresca do sistema radicular (M _{fr}).....	70
4.2. Pigmentos: clorofila- <i>a</i> (C _a), clorofila- <i>b</i> (C _b), clorofilas totais (C _{a+b}) e carotenóides (C _{x+c}).....	73
4.3. Atividade de enzimas antioxidantes.....	77
4.3.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	77
4.3.2. Atividade da catalase (CAT).....	79
4.3.3. Atividade da peroxidase (POX).....	80
4.4. Peroxidação lipídica.....	81
5. CONCLUSÕES.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÊNDICE.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de Fenton.....	22
Figura 2. Reação de Haber-Weiss.....	22
Figura 3. Síntese da glutationa.....	26
Figura 4. Vias de síntese do ácido ascórbico.....	28
Figura 5. Ciclo de regeneração do ascorbato.....	30
Figura 6. Biossíntese de tocoferol e plastoquinona.....	32
Figura 7. Rota biossintética dos isoprenóides em plantas superiores.....	34
Figura 8. Síntese de fitoquelatinas em plantas superiores.....	37
Figura 9. Síntese de fitoquelatinas e mutantes.....	38
Figura 10. Reação catalisada pela SOD.....	40
Figura 11. Reação catalisada pela CAT.....	42
Figura 12. Reação de regeneração de GSH.....	44
Figura 13. Reação catalisada pela GR.....	45
Figura 14. Funções da glutationa S-transferase em plantas.....	46
Figura 15. Estrutura do ácido abscísico (ABA).....	54
Figura 16. Rota biossintética de carotenóides e ácido abscísico em milho.....	56
Figura 17. Semeio e obtenção de mudas de tomateiro.....	63
Figura 18. Cultivo de tomateiros para obtenção de sementes.....	63
Figura 19. Acúmulo de massa fresca total (MFt).....	71
Figura 20. Acúmulo de massa fresca de raiz (MFr).....	71
Figura 21. Acúmulo de massa fresca da parte aérea (MFa).....	72
Figura 22. Teores de clorofila <i>a</i> (Ca).....	73

Figura 23. Teores de clorofila <i>b</i> (<i>Cb</i>).....	74
Figura 24. Teores de clorofila <i>a+b</i> (<i>Ca+b</i>).....	75
Figura 25. Teores de carotenóides (<i>Cx+c</i>).....	76
Figura 26. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD).....	78
Figura 27. Atividade enzimática da catalase (CAT).....	79
Figura 28. Atividade enzimática da peroxidase (POX).....	80
Figura 29. Peroxidação lipídica e formação do complexo TBA-MDA (MDA).....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo da análise de variância da massa fresca total (MFt) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	102
Tabela 2. Resumo da análise de variância da massa fresca de raíz (MFr) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	102
Tabela 3. Resumo da análise de variância da massa fresca da parte aérea (MFa) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	103
Tabela 4. Resumo da análise de variância dos teores de clorofila <i>a</i> (Ca) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	103
Tabela 5. Resumo da análise de variância dos teores de clorofila <i>b</i> (Cb) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	104
Tabela 6. Resumo da análise de variância dos teores de clorofila total (Ca+b) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	104
Tabela 7. Clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> e relação Ca/Cb para diferentes genótipos de tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill), expostos ou não a 50 µM de CdCl ₂	75
Tabela 8. Resumo da análise de variância dos teores de cartenóides totais (Cx+c) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	105
Tabela 9. Resumo da análise de variância da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	105
Tabela 10. Resumo da análise de variância da atividade enzimática da catalase (CAT) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	106
Tabela 11. Resumo da análise de variância da atividade das peroxidases (POX) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	106
Tabela 12. Resumo da análise de variância da peroxidação lipídica (MDA) em plântulas de tomateiro (<i>Lycopersicon esculenum</i> Mill. cv. <i>Ailsa Craig</i> , <i>Notabilis complemented</i> e <i>Notabilis</i>) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl ₂	107

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

γ -EC = γ -glutamilcisteína

$^1\text{O}_2$ = oxigênio “singlet”

ABA = ácido abscísico

ACS = ácido ascórbico

AhNCED1 = *Arachis hypogaea* 9'-cis-epoxicarotenóide dioxigenase

APS = adenosina fosfato enxofre

APSST = adenosina 5'-fosfatosulfato transferase

APX = ascorbato peroxidase

As = arsênio

ATP = adenosina trifosfato

ATP-sulfurilase = ATP:sulfato adenilil transferase

Be = berílio

BSA = soro-albumina bovina

C = carbono

Ca = clorofila *a*

CAT = catalase

Ca+b = clorofilas totais

Cb = clorofila *b*

Cd = cádmio

cDNA = DNA complementar

Co = cobalto

cys = cisteína

Cr = cromo

Cu = cobre

Cx+c = carotenóides

DHA = deidroascorbato

DHAR = deidroascorbato redutase

DMAPP = dimetilalil difosfato

DMSO = dimetilsulfóxido

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

FAD = flavina adenosina dinucleotídeo

Fe = ferro

GGPP = geranilgeranil difosfato

GGPP-C₂₀ = geranilgeranil difosfato 20 carbonos

GGPPS = geranilgeranil difosfato sintetase

glu = glutamato

GPOX = glutationa peroxidase

GPX = guaiacol peroxidase

GR = glutationa redutase

GSH = glutationa reduzida

GSSG = glutationa oxidada

GST = glutationa S-transferase

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

Hg = mercúrio

HGA = ácido homogenístico

HMG-CoA = 3-hidroxil-3metil-glutaril CoA

HMG-CoA redutase = 3-hidroxil-3metil-glutaril CoA redutase

HPP = ácido p-hidroxifenilpirúvico

HPPD = ácido p-hidroxifenilpirúvico dioxigenase

HPT = homogenistato preniltransferase

IPP = isopentenil difosfato

LATD = *lateral defective* normal

not = notabilis

not_{comp} = notabilis complementado

Latd = *lateral defective*

LOX = lipoxigenase

MDA = malondialdeído

MDHA = monodeidroascorbato

MDHAR = monodeidroascorbato redutase

MFa = massa fresca da parte aérea

MFr = massa fresca do sistema radicular

MFt = massa fresca total

MGGBQ = 2-metil-6-geranilgeranilplastoquinol

Mn = manganês

Mo = molibdênio

MPBQ = 2-metil-6-fitolplastoquinol

MS = meio nutritivo Murashige & Skoog

MS $\frac{1}{2}$ = meio nutritivo Murashige & Skoog meia força

MT = metalotioneína

MVA = ácido mevalônico

MVA kinase = ácido mevalônico kinase

MVAPP descarboxilase = ácido mevalônico 5'-difosfato descarboxilase

N = nitrogênio

NADP = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADP(H) = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NCED = 9'-cis-epoxicarotenóide dioxigenase

Ni = níquel

O₂ = oxigênio molecular

O₂[•] = radical superóxido

O₂H[•] = radical perhidroxil

OH[•] = radical hidroxil

OH⁻ = radical hidroxila

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

Pb = chumbo

PC = fitoquelatina

PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfônico

POX = peroxidases

PPi = fosfato inorgânico

PVP = polivinilpirrolidona

ROS = espécies reativas de oxigênio

S = enxofre

Sb = antimônio

Se = selênio

ser = serina

Sn = estanho

SOD = superóxido dismutase

TBA = ácido tiobarbitúrico

TCA = ácido tricloroacético

Te = telúrio

Tl = tálio

U = urânio

U SOD = unidade de superóxido dismutase

UV = ultravioleta

VuNCEDI = *Vigna unguiculata* 9'-cis-epoxicarotenóide dioxygenase

W = tungstênio

V = vanádio

Zn = zinco

RESUMO

O ambiente natural é resultante da interação entre os fatores que dele fazem parte e na natureza há uma tendência de equilíbrio entre estes fatores, possibilitando a coexistência de diferentes formas de vida. A ação humana vêm alterando a homeostase do sistema natural, a exemplo da contaminação ambiental gerada pela disposição inadequada de quantidades elevadas de determinados elementos. Os metais pesados representam uma classe de resíduos presentes em grande parte dos processos produtivos, e nem sempre são tratados corretamente. Sua liberação no ecossistema promove a deterioração dos recursos naturais, e inúmeras vezes restringe o desenvolvimento dos organismos que o habitam. O potencial de geração de estresse oxidativo, através da formação de espécies reativas de oxigênio, promove alterações metabólicas consideradas cruciais na resposta aos agentes estressores em organismos vegetais submetidos a concentrações elevadas de elementos químicos específicos. Sob o âmbito vegetal, estas alterações exibem complexas relações entre o genótipo da planta, o metal em questão e as características ambientais. O conhecimento de mecanismos de tolerância em plantas expostas a elementos tóxicos como o Cd, é fundamental para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético de plantas e para recuperação de áreas contaminadas, pelo emprego de técnicas de fitorremediação. Embora a evolução neste campo tenha progredido muito nos últimos anos, muitas questões são ainda desconhecidas, tais como o envolvimento de fitohormônios na sinalização celular e estímulo aos mecanismos de defesa antioxidantes. O ácido abscísico possui forte correlação com estresses ambientais como a deficiência hídrica ou exposição a baixas temperaturas; entretanto não há estudos indicando possível vínculo com a resistência das plantas a metais pesados e outros elementos potencialmente tóxicos. Informações como esta representam mais uma alternativa na escolha de espécies para recuperação de áreas degradadas e possibilitam aos melhoristas vegetais mais uma ferramenta para o cultivo de áreas consideradas inaptas ao desenvolvimento agropecuário. Genótipos distintos com relação à síntese de ácido abscísico apresentam respostas fisiológicas e perfis enzimáticos diferentes quando expostos ao cádmio, entretanto estudos mais acurados envolvendo os referidos fatores se fazem necessários para prover evidências do envolvimento do fitohormônio nas respostas ao estresse causado pelo metal.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental gerada pela adição de resíduos provenientes das atividades antrópicas vem incrementando consideravelmente os teores de elementos potencialmente tóxicos no solo, na água e no ar em diversas regiões do globo. Os setores agrícola e industrial em especial, vêm atuando como agentes promotores da contaminação.

Os metais pesados representam uma das principais classes de contaminantes. Estas substâncias interferem significativamente nos ecossistemas, onde o grau de influência e persistência é conferido pela natureza da própria substância e o tempo de exposição do organismo à mesma. Esta situação tem atraído a atenção de cientistas ambientais, quanto ao esclarecimento do potencial tóxico destes elementos sobre as plantas.

Ambientes contaminados com elevadas concentrações de metais pesados apresentam uma série de fatores limitantes ao desenvolvimento das atividades agropecuárias, dado o efeito causado por estes metais sobre os organismos animais e vegetais. Entretanto, sob condições específicas, as plantas desenvolveram mecanismos que as permitem reduzir os efeitos tóxicos causados por agentes ambientais. A combinação de diferentes mecanismos adaptativos como a metabolização citosólica e quelação de metais, a atuação do sistema de defesa constituído por um conjunto de moléculas e enzimas antioxidantes capazes de remover ou neutralizar radicais livres formados nos tecidos da planta em função da exposição a metais, ou ainda a interação fitohormonal com o ambiente em questão, resultam em uma combinação de fatores que propiciam diferentes perfis de extração, assimilação e/ou metabolização de elementos inorgânicos do meio pelas plantas, e consequentemente na superação do estresse.

Desta forma, o estudo da atividade enzimática demonstra ser uma ferramenta eficaz na avaliação da fitotoxicidade de metais pesados em plantas. Conhecendo-se as principais vias de destoxificação destes metais pelas plantas, e fatores intrínsecos possivelmente envolvidos, como a influência de metabólitos, é possível traçar estratégias de estudo e melhoramento genético, envolvendo por exemplo a manipulação de enzimas capazes de condicionar tolerância ou mesmo sensibilidade em diferentes genótipos vegetais.

A busca pela compreensão destes mecanismos, principalmente de caracteres correlatos entre si, possibilita a execução de programas de melhoramento vegetal voltados à fitorremediação, focando a recuperação de áreas comprometidas pela presença de elevados níveis de metais pesados e tornando estes ambientes propícios ao desenvolvimento de uma agricultura mais segura.

O estudo aqui proposto visa identificar alguns efeitos causados pelo Cd na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), verificando concomitantemente as vias metabólicas preferenciais de destoxificação utilizadas pelos organismos para auxiliar na distinção dos genótipos e traçar um paralelo à sua capacidade biossintética na produção do ácido abscísico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contaminação ambiental e consequências aos organismos

A execução de processos específicos inerentes às atividades econômicas, demanda um volume elevado de produtos “primários” e envolve a geração de resíduos que, por vezes, são dispostos de forma inadequada no meio ambiente; com isso, há elevação da concentração de determinadas substâncias em pontos localizados e/ou sua dispersão em uma determinada região.

Do ponto de vista ambiental, em relação às concentrações em que se apresentam, os metais pesados requerem atenção especial, pois a possibilidade de contaminação e suas consequências acarretam sérios riscos aos seres vivos. Muitas destas substâncias, como Fe, Cu, Zn, Ni, exercem importantes funções na manutenção dos sistemas biológicos. Por vezes empregado de forma imprecisa, o termo “metal pesado” refere-se a um grupo heterogêneo de elementos incluindo metais, semi-metais e não metais (MELO et al., 1997); estes possuem número atômico maior que 20, ou peso específico maior que 5 g cm⁻³ (MALAVOLTA, 1994).

Mesmo ocorrendo naturalmente no solo, em concentrações variáveis de acordo com sua gênese, a maioria destes elementos, também designados por RESENDE et al. (1997) “elementos traço”, estão em formas não prontamente disponíveis para as plantas e organismos. Normalmente, a natureza disponibiliza quantidades adequadas para a manutenção do ciclo vital. Entretanto, desbalanços na disponibilidade acarretam em desordens proporcionais, em que a presença de concentrações crescentes de metais acima das naturais, passa do meramente tolerável ao tóxico (SILVA, 2006).

Com a intervenção humana em determinadas atividades, as concentrações destes metais tendem a sofrer acréscimos. A agricultura constitui uma das mais importantes fontes não pontuais de poluição por metais (ALLOWAY et al., 1997), através de impurezas contidas em fertilizantes, tais como Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn (a exemplo do Cd e U em fertilizantes fosfatados); utilização de lodos de efluentes industriais; preservativos de madeira (destacando-se As, Cu e Cr); agroquímicos de todas as ordens, que utilizam em sua composição Cu, As, Hg, Pb, Mn, Zn, dentre outros; dejetos oriundos da produção intensiva de suínos e aves, em especial Cu, As e Zn. Já em ambientes urbanos, a combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, produção e descarte de baterias e a incineração de resíduos urbanos

e industriais constituem os principais contaminantes, com acúmulo de Pb, Ni, Cu e Zn (DING et al., 2007). Tanto no meio urbano quanto rural, são desenvolvidas uma série de outras atividades relacionadas à mineração, fundição, galvanoplastia, curtumes e refinamento que contribuem enormemente com resíduos ricos em metais pesados.

Considerando a toxicidade à saúde humana, podem ser elencados cerca de vinte elementos, incluindo Hg, Cd, Pb, As, Mn, Tl, Cr, Ni, Se, Te, Sb, Be, Co, Mo, Sn, W, V. Destes, os dez primeiros são os de maior utilização industrial, sendo por este motivo os mais estudados do ponto de vista toxicológico. A reatividade destes elementos é muito variada, podendo interagir com ligantes difusores, macromoléculas e com ligantes presentes em membranas, o que muitas vezes, lhes conferem as propriedades de bioacumulação, biomagnificação na cadeia alimentar, persistência no ambiente e distúrbios nos processos metabólicos dos seres vivos. As bioacumulações e biomagnificações se encarregam de transformar concentrações consideradas normais em concentrações tóxicas para as diferentes espécies da biota; a persistência garante os efeitos ao longo do tempo ou de longo prazo, mesmo depois de interrompidas as emissões (TAVARES & CARVALHO, 1992).

A importância do estudo destes metais consiste em seus intensos efeitos tóxicos ao homem e outros seres vivos, associados à sua ampla liberação. Com o desenvolvimento dos processos de industrialização, a poluição do ambiente com metais pesados têm ocorrido em todo globo, com consequente degradação dos ecossistemas (DÖNMEZ & AKSU, 1999).

O Cd é um metal de expressão relativamente rara no meio ambiente, ocupando a 67^a posição em ordem de abundância entre os elementos químicos; pertence ao grupo IIb, juntamente com o Zn e o Hg. Apresenta-se como um metal branco, com brilho metálico, bastante mole, dúctil e maleável; quando em contato com o ar, sua superfície escurece rapidamente em função da formação de uma fina camada de óxido (VIEIRA, 2006).

O especial interesse que vêm despertando mais recentemente, e o grande número de pesquisas envolvendo Cd, é conferido pelo seu potencial de causar toxicidade aliado à presença em diversos processos do setor industrial, onde há geração de resíduos carregados do metal. KACHENKO & SINGH (2006), verificaram que a contaminação com Cd na camada superficial em relação ao subsolo salta de 0,01 mg kg⁻¹ para 27,49 mg kg⁻¹ na região oeste da Austrália, sugerindo possíveis fontes de contaminação antropogênicas.

No Brasil, em áreas próximas aos aterros sanitários, o grau de contaminação como metais pesados é muito elevado. PELEGRINI (2006) relata teores de até 0,4 µg L⁻¹ em

percolado de aterro sanitário. De acordo com SILVA (2005), o lodo de esgoto gerado na estação de tratamento de esgotos de Jundiaí, SP, possui 8 mg de Cd por kg de lodo em base seca, podendo este ser disposto em área agrícola.

Por não se tratar de um elemento que apresenta função biológica essencial conhecida, mesmo a presença de pequenas concentrações de Cd no organismo humano podem ser tóxicas, pois sua meia vida é superior a dez anos; conforme LAUWERYS et al. (1994) verificaram em indivíduos sob exposição prolongada ao Cd, o efeito residual na excreção do metal via urinária se estendia, confirmando possíveis disfunções renais. O Cd pode acumular-se em vários tecidos e/ou órgãos; exemplo disto é a utilização de amostras de cabelo para monitoramento biológico da exposição ambiental a este e a outros metais (PILAR et al., 1997). CAPEL et al. (1981) relacionam os altos teores de Cd encontrados em crianças disléxicas com a desordem de aprendizado da mesmas. Outros efeitos como efisemas pulmonares, desmineralização óssea, destruição dos eritócitos e câncer também podem ser atribuídos a presença de quantidades elevadas de Cd no organismo (GHOSHROY et al., 1998).

Inúmeros estudos de toxicidade utilizam modelos que empregam plantas e/ou microorganismos. Sua utilização é justificada por várias razões, dentre as quais podem ser destacadas a grande influência dos metais pesados sobre estes organismos, ampla variação nas respostas de tolerância e a possibilidade de utilização dos mesmos como ferramentas de biorremediação (GRATÃO, 2003). Tratando-se dos aspectos fisiológicos vegetais, a presença de Cd pode diminuir o crescimento, reduzir a taxa fotossintética, além de provocar alterações tanto enzimáticas quanto metabólicas (GALLEGOS et al., 1999).

Os fatores ambientais podem exercer influência significativa na absorção de Cd pela planta. A concentração do metal no meio, o pH e a espécie em questão são exemplos de aspectos que devem ser considerados (BROWN & BECKETT, 1985). A facilidade com que este metal é absorvido pelo sistema radicular e translocado via xilema para a parte aérea da planta, em função da evapotranspiração (PRASAD, 1995), podem levar à rejeição comercial de determinados genótipos em função do acúmulo de Cd nos tecidos (VÖLLEGLANGE & WAGNER, 1996), além de representar riscos à saúde humana (WAGNER, 1993).

MELO et al. (1997), sugerem que o estádio de desenvolvimento da planta e o período de exposição da mesma ao metal, sejam outros fatores responsáveis pela absorção e distribuição do Cd nos diferentes tecidos vegetais. Como as diferentes respostas biológicas aos

metais pesados evidenciam, existe variação genética e ambiental ou mesmo cronológica em relação ao estádio de desenvolvimento das plantas ao estresse.

EKMEKÇI et al. (2007) demonstraram que genótipos distintos de milho, apresentam comportamento diferencial quanto à exposição a doses crescentes de Cd; após oito dias de exposição ao metal, puderam ser observados diferentes padrões de eficiência fotoquímica em relação à fluorescência da clorofila. No mesmo trabalho, verificou-se que o aumento da concentração de Cd provoca perda de pigmentos como as clorofitas e carotenóides, além do aumento da danificação da membrana no tecido foliar em ambos genótipos.

O Cd também influencia na condutância estomática. Conforme LI et al. (2008), observando as respostas ecofisiológicas de *Jussiaea rapens* Linn a diferentes quantidades de Cd, em diferentes tempos de exposição, concluíram que, sob as doses mais elevadas, há um declínio na condutância estomática após dois dias de contato com o elemento, com recuperação após cinco dias de exposição. Tais constatações levam a crer que *Jussiaea rapens* Linn possa apresentar algum grau de tolerância ao Cd.

Em plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.), SANDALIO et al. (2006), constataram a influência do Cd sobre diversos aspectos da morfologia e fisiologia da planta, com inibição significativa no desenvolvimento de raízes e folhas e distúrbios anatômicos, como o aumento do tamanho das células do mesófilo. Além da redução da taxa transpiratória e fotossintética, decréscimo dos teores de clorofila, atribuíram-se ao Cd alterações sobre o estado nutricional dos tecidos vegetais, tanto foliar quanto radicular.

O fechamento estomático é afetado pela presença de Cd. *Brassica juncea*, quando exposta a 0,2 mM de CdCl₂, apresenta redução na velocidade de replicação de células epidérmicas e, consequentemente, menos estômatos e/ou menor número de estômatos abertos (ZHU et al., 2005). Observa-se que, em nível celular, o Cd pode causar incremento no número de mitocôndrios em plantas transformantes de algodão (DAUD et al., 2008), e ainda afetar a fosforilação oxidativa mitocondrial (KESSELER & BRAND, 1995; TIWARI et al., 2002).

2.2. Radicais livres e estresse oxidativo

O O₂ como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, representa uma etapa no processo metabólico comum aos organismos aeróbicos, e essencial à

manutenção da vida. O O_2 é pouco reativo, entretanto possui a capacidade de originar estados excitados reativos na forma de radicais livres e derivados (SCANDALIOS, 1993). O estresse oxidativo, por sua vez, resulta da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que danificam ou mesmo desintegram a célula (BUCHANAN et al., 2000), podendo ter origem tanto a partir de fatores bióticos quanto abióticos (TIWARI et al. 2002).

A denominação “radicais livres” refere-se à configuração eletroquímica dos elementos, incorporando todas espécies de elementos que possuem um elétron não-emparelhado no orbital externo. Esta configuração confere às espécies radicalares a tendência de estabelecer o equilíbrio eletroquímico às custas de elétrons “captados” de outras moléculas, motivo de sua alta reatividade (MATOS, 2006).

A formação de ROS em vegetais ocorre através de certas reações redox e pela redução incompleta do oxigênio ou oxidação da água pelas cadeias de transporte de elétrons mitocondrial e cloroplastídica, respectivamente (BUCHANAN et al., 2000). O processo tem início com a formação de oxigênio “singlet” (1O_2), que subseqüentemente estimula a produção de outras ROS como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxil (OH^{\cdot}) e peridroxil (O_2H^{\cdot}).

Caso ocorra em alguma etapa da cadeia respiratória a perda de elétrons, estes podem ser “capturados” por moléculas de oxigênio circulantes. Com a adição de um novo elétron, estas moléculas transformam-se em $O_2^{\cdot-}$, um radical livre altamente reativo. Quando este é reduzido novamente por mais um elétron, há formação de H_2O_2 . Subseqüentemente, a adição de outro elétron ao H_2O_2 provoca seu rompimento e a liberação de ânions hidroxila (OH^-) de baixa reatividade e radicais hidroxil (OH^{\cdot}), uma das espécies mais reativas atualmente descrita.

O alto potencial reativo atribuído ao radical OH^{\cdot} é proveniente do fato dele ser capaz de reagir com qualquer molécula orgânica de forma quase instantânea, razão pela qual ele é consumido por reações de oxidação praticamente no mesmo local em que se forma (MENEGHINI, 1987). Uma das vias de formação desta ROS na presença de íons metálicos divalentes, é por intermédio da reação de Fenton (Figura 1), em que íons como Fe^{2+} promovem a decomposição do peróxido de hidrogênio, acarretando a formação de Fe^{3+} , OH^- e OH^{\cdot} (NEYENS & BAEYENS, 2003; AGUIAR & FERRAZ, 2007). Outra reação resultante em radicais hidroxil é conhecida como reação de Haber-Weiss, postulada posteriormente à

reação de Fenton. Na reação de Haber-Weiss (Figura 2), a interação entre H_2O_2 e O_2^\cdot promove a formação de O_2 e OH^- (KEHRER, 2000).

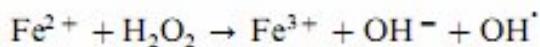


Figura 1. Reação de Fenton
(Fonte: KEHRER, 2000)

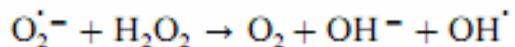


Figura 2. Reação de Haber-Weiss
(Fonte: KEHRER, 2000)

Apesar do risco que representam aos sistemas biológicos, os radicais OH^\cdot são produzidos em menor quantidade, devido a atividade do sistema enzimático antioxidante que atua sobre seus precursores.

ROS apresentam grande versatilidade e são indispensáveis no estímulo de diferentes respostas celulares em plantas, incluindo reações de necrose em resposta ao ataque de patógenos; morte celular programada, promovendo a renovação dos tecidos; processos de desenvolvimento, gravitropismo e sinalização hormonal (ASHTAMKER et al., 2007). Tanto plantas sob condições de estresse quanto aquelas sob condições de não-estresse produzem ROS, tendo desenvolvido ao longo da sua evolução sistemas de defesa e proteção contra a ação tóxica destas substâncias. Entretanto, estes sistemas funcionam mediante um limite de produção de ROS, a partir do qual sua destoxificação passa a ser problemática e deficiente (ALSCHER et al., 2002).

O termo “estresse oxidativo”, amplamente empregado na literatura, está normalmente associado aos radicais livres, entretanto não possui uma conceituação claramente definida. Quanto ao “estresse” propriamente dito, sob o enfoque vegetal, refere-se à uma disfunção ou desordem de caráter metabólico e/ou fisiológico, no qual verifica-se um sério desequilíbrio entre a produção de ROS e o sistema antioxidante de defesa que a planta apresenta (MATOS, 2006).

SCHÜTZENDÜBEL & POLLE (2001), baseando-se nas propriedades físico-químicas dos metais pesados, propuseram três diferentes mecanismos moleculares de toxicidade causada por metais pesados:

1. Produção de espécies reativas de oxigênio através de autoxidação e via reação de Fenton (de ocorrência típica para metais de transição, como Fe e Cu);
2. Bloqueio de grupos funcionais essenciais em biomoléculas (reação descrita principalmente para metais pesados sem atividade redutora, como Cd e Hg);
3. Deslocamento de íons metálicos essenciais a biomoléculas (reação comum a diferentes tipos de metais pesados);

Percebe-se, desta forma, que as propriedades químicas de cada metal determinam mecanismos diferentes de estresse oxidativo, e consequentemente, diferentes respostas à exposição ao mesmo.

É conhecida a capacidade do Cd em gerar estresse oxidativo (CHOUNDHURY & PANDA, 2004; RANIERI et al., 2005). Entretanto, conforme já referido, seu mecanismo de ação é diferente de metais como Fe ou Cu; aparentemente ele não exerce efeito direto na produção de ROS, via reação de Fenton e/ou reações de Haber-Weiss (TOPPI & GABBRIELLI, 1999). Como não está propriamente envolvido, o Cd possivelmente provoca o aumento de ROS por mecanismos indiretos, como a interação com o sistema de defesa antioxidante, o bloqueio da cadeia de transporte de elétrons ou pela indução da peroxidação lipídica.

Posteriormente, por meio destes efeitos causados pelo Cd, aumenta também a atividade de enzimas lipoxigenases (LOX), que catalisam reações de dioxigenação de ácidos graxos polisaturados, produzindo hidroperóxidos de ácidos graxos. Os hidroperóxidos por sua vez, seguem diferentes vias metabólicas secundárias, produzindo compostos bioativos como jasmonato (PORTA & ROCHA-SOSA, 2002). Outra via potencial pela qual o Cd pode causar estresse oxidativo é pela produção de H_2O_2 , resultante da dismutação do superóxido ou independentemente (CHO & SEO, 2005).

MAKSYMIEC & KRUPA (2005), verificaram aumento no acúmulo de radicais O_2^- e H_2O_2 em folhas de *Arabidopsis thaliana* após as primeiras horas de exposição ao Cd e Cu, causando já na primeira hora um incremento substancial na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Os autores ainda relacionam o incremento dos radicais livres

com a atividade da enzima NADPH oxidase, induzida pelo jasmonato, que neste caso atua como sinalizador, semelhante ao que ocorre no caso do Cd em relação à atividade da SOD.

2.3. Mecanismos de defesa vegetal a metais pesados

O desempenho vegetal em relação à exposição aos metais pesados inclui diferentes mecanismos de defesa, contando com um complexo sistema de desintoxicação/complexação destes elementos, podendo reduzir seus efeitos em diferentes intensidades. Assim, o estresse oxidativo passa a ser problemático apenas depois que o sistema esteja sobrecarregado.

Em resposta ao estresse induzido pelo Cd, as células vegetais podem recorrer a distintos e variados sistemas de defesa, dentre os quais se destacam a síntese de biomoléculas como proteínas específicas, imobilização do metal, sua exclusão e/ou compartimentalização, síntese de fitoquelatinas, metalotioneínas, ou ainda produção de etileno (TOPPI & GABBRIELLI, 1999). É possível afirmar também, que o Cd exerce influência indireta sobre o sistema antioxidante enzimático (PORTA & ROCHA-SOSA, 2002; MAKSYMIEC & KRUPA, 2005; SMEETS et al., 2006; DYE et al., 2007).

A definição antioxidantes engloba todos os compostos capazes de eliminar ROS sem que se tornem radicais destrutivos ou perigosos. A glutatona, juntamente com o ascorbato, o α -toferol e os carotenóides, corresponde à classe de antioxidantes não enzimáticos de maior relevância. Outras estruturas como flavonóides e poliaminas também podem prover alguma proteção contra a ação de radicais livres (MATOS, 2006).

As enzimas antioxidantes representam outra importante classe de antioxidantes, catalisando reações redox, muitas das quais se baseiam na utilização de elétrons supridos por moléculas de baixo peso molecular, como ascorbato e glutatona (NOCTOR & FOYER, 1998). Dentre as enzimas presentes neste contexto estão a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST), monodeidroascorbato redutase (MDHAR), deidroascorbato redutase (DHAR), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX), glutatona peroxidase (GPOX) e outras enzimas peroxidases (POX).

2.3.1. Sistema antioxidante não enzimático

2.3.1.1. Glutationa

A glutationa em sua forma reduzida (GSH) é um tripeptídeo (γ -glu-cys-gly) interconversível com sua forma oxidada (GSSG). Determinadas plantas possuem tripeptídeos homólogos à glutationa, com alteração da unidade carboxila terminal; como estas substâncias podem servir de substrato à glutationa redutase (GR), sugere-se papel fisiológico e bioquímico similar à γ -glu-cys-gly (NOCTOR & FOYER, 1998).

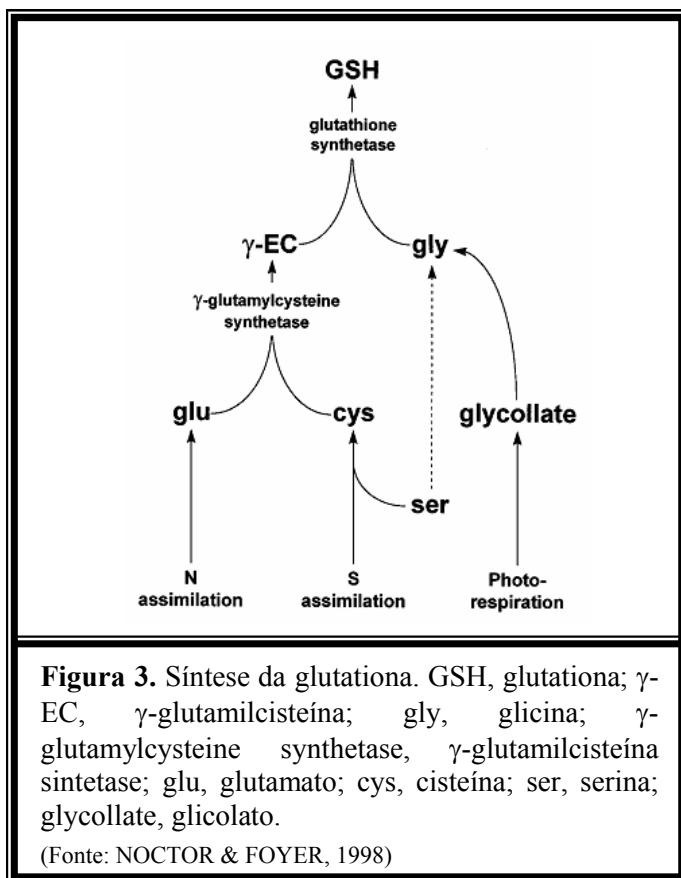
Nas plantas, é possível atribuir à glutationa dois papéis principais: (a) metabolismo do enxofre (S); a GSH é o tiol não protéico predominante, regulando assim a absorção de S pelas raízes (LAPPARTIENT & TOURAIN, 1997; HERSCHBACH et al., 2000); (b) defesa vegetal; é usada pela GSH S-transferase na destoxificação de xenobióticos, sendo precursora de fitoquelatinas, é crucial no controle das concentrações celulares de metais pesados (LAMOUREUX & RUSNESS, 1993; MARRS, 1996; GRILL et al., 1989; PASTERNAK et al., 2008).

A biossíntese de glutationa pode ser resumida a duas reações, ambas dependentes de energia celular (ATP). Inicialmente a enzima γ -glutamilcisteína sintetase promove a formação de γ -glutamilcisteína, a partir do glutamato e da cisteína; em seguida, outra enzima, a glutationa sintetase incorpora à γ -glutamilcisteína um resíduo de glicina (Figura 3).

Quando as plantas são expostas a condições adversas, caracterizando situações de estresse, verifica-se que a oxidação de GSH é acompanhada de uma taxa líquida de degradação da glutationa (WISE & NAYLOR, 1987). Já em outras situações, observa-se acúmulo de GSH em resposta ao aumento na geração de ROS (MAY & LEAVER, 1993; MADAMANCHI et al., 1998). As controvérsias existentes entre os conteúdos de GSH podem ser explicadas completamente ou parcialmente pela modulação de sua taxa biossintética.

Sugere-se que a síntese de GSH seja controlada por um mecanismo de *feedback*, onde a inibição da enzima γ -glutamilcisteína sintetase seja reflexo da quantidade de GSH presente no tecido (SMITH, 1985). Desta forma, quando a planta se encontra sob estresse, GSH passa a sua forma oxidada GSSG, e o decréscimo de GSH estimularia a

atividade da γ -glutamilcisteína sintetase. O mesmo ocorre durante a síntese de fitoquelatinas, que possuem como precursora a GSH; o aumento na síntese de fitoquelatinas é acompanhado pelo aumento da γ -glutamilcisteína sintetase, podendo haver aumento de absorção de S pelas raízes, uma vez que os resíduos de aminoácidos que compõem a GSH, como a cisteína, possuem S.



Em raízes de plantas de ervilha submetidas a concentrações crescentes de Cd, RÜEGSEGGER et al. (1990) relatam o incremento da atividade das enzimas glutationa sintetase e adenosina 5-fosfatosulfato sulfotransferase, responsáveis pela síntese de glutationa e pela assimilação de sulfato, respectivamente.

Em linhagens de células de *Datura innoxia* sensíveis e não sensíveis ao Cd, DELHAIZE et al. (1989) verificaram a síntese de quantidades equivalentes de GSH-cys, após submetidas ao metal; entretanto, houve diferenças na síntese do complexo peptídeo-Cd. Observou-se que na linhagem sensível, a formação destes complexos é mais lenta, e o peso molecular dos mesmos menor, em relação à linhagem tolerante. Esta diferença temporal e

estrutural da formação dos complexos peptídeos-Cd confere maior ou menor sensibilidade ao metal.

2.3.1.2. Ascorbato

Nas plantas, o ascorbato pode acumular em concentrações milimolares, tanto em tecidos fotossintéticos quanto não-fotossintéticos (TORRES et al., 2006; AGARWAL & SHAHEEN, 2007). Em folhas, é possível que haja concentrações maiores de ácido ascórbico (ACS) que as de clorofilas, e este montante pode representar mais de 10% do conteúdo total de carboidratos solúveis (NOCTOR & FOYER, 1998).

Diversas funções são atribuídas ao ACS, entretanto, é possível que muitas ainda não estejam caracterizadas. Considerado o antioxidante primário encontrado em maior quantidade, pode reagir diretamente com radicais OH^{\cdot} , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e ${}^1\text{O}_2$ (BUETTNER & JURKIEWICZ, 1996). Além de ser crucial como agente “foto-protetor” e na regulação da fotossíntese (BECK et al., 1983; FORTI & ELLI, 1995), o ascorbato desempenha papel fundamental na preservação da atividade das enzimas que possuem como grupo prostético metais de transição (PADH, 1990). Como antioxidante secundário, o ascorbato revela sua importância reduzindo a forma oxidada do α -tocoferol, um importante antioxidante de fases não-aquosas (NJUS & KELLEY, 1991).

Nos processos de crescimento, o ascorbato pode contribuir na regulação da floração, provocando um retardamento neste estádio (ATTOLICO & TULLIO, 2006). O ACS promove a atividade das peroxidases, atuantes no desenvolvimento inicial das plântulas; caso haja diminuição dos níveis de ACS a atividade das peroxidases é reduzida igualmente, quando há inibição da produção de ACS por algum agente externo, a exemplo da licorina, a atividade de peroxidases específicas dependentes de ACS é afetada a ponto de causar o aborto meristemático (STASOLLA & YEUNG, 2007).

O equilíbrio citosólico e a concentração de ACS oxidado/reduzido no apoplasto, possivelmente sejam processos envolvidos na modulação da divisão celular e do crescimento (ARRIGONI, 1994; BARCELÓ et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006). Este equilíbrio é também regido por um conjunto de proteínas de membrana e transportadores, que através de um sistema de sinalização celular ainda não definido, que carreiam ACS e deidroascorbato (DHA) do apoplasto, onde as concentrações na ordem milimolar auxiliam na proteção do plasmalema contra o dano oxidativo, para o citosol. A manutenção do potencial redox entre os compartimentos celulares facilitada pelo sistema de transporte permite um

controle coordenado das respostas fisiológicas aos estímulos ambientais (HOREMANS et al., 2000).

Se atualmente são conhecidas várias funções desempenhadas pelo ACS, o mesmo não pode ser dito a respeito da via biossintética do mesmo, que permanece não estabelecida por completo (NOCTOR & FOYER, 1998). A hipótese de que o ascorbato seja sintetizado a partir da glicose é amplamente aceita, apesar das medições da taxa de conversão de glicose a ascorbato serem baixas (SATIO et al., 1990).

As duas possíveis rotas biossintéticas do ACS que possuem algumas evidências (Figura 4) são conhecidas como:

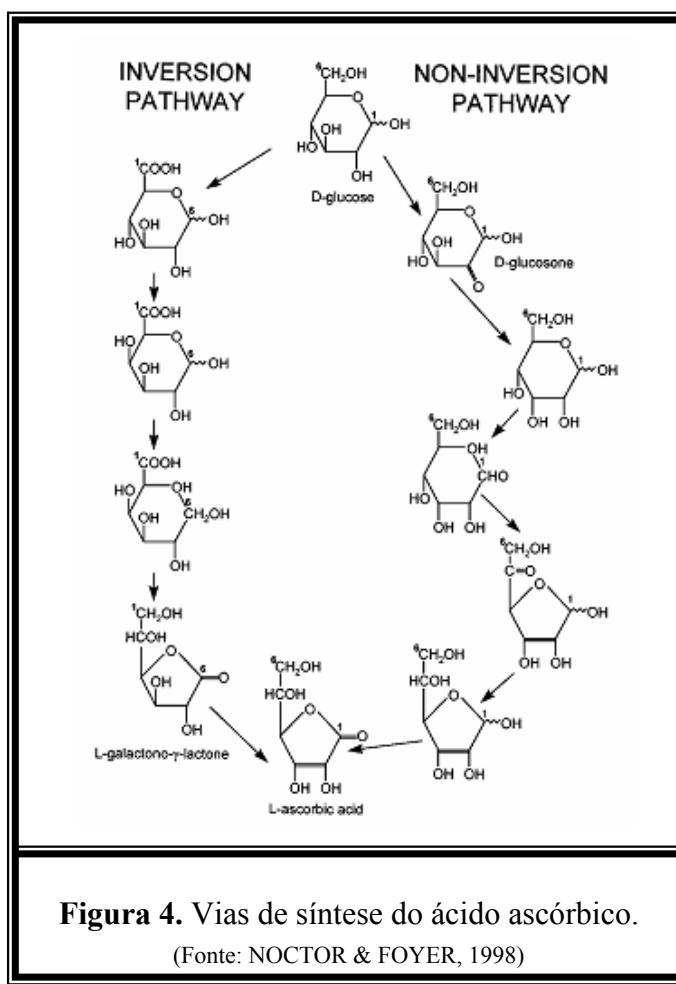


Figura 4. Vias de síntese do ácido ascórbico.

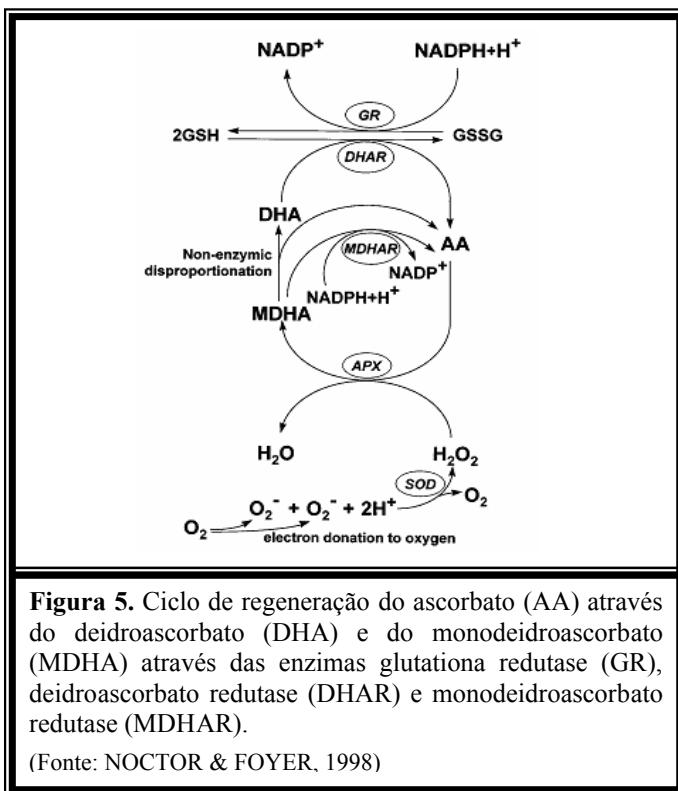
(Fonte: NOCTOR & FOYER, 1998)

(a) A rota “inversa”, assim conhecida em função da inversão do esqueleto carbônico da glicose em compostos intermediários, partindo do D-glicuronato e da D-gulonato-1,4-lactona (BAIG et al., 1970). HELPSER et al. (1982), em um dos poucos estudos conclusivos a respeito da conversão de D-glicose em ácido L-ascórbico, verificaram o emprego da rota metabólica que causa inversão da cadeia carbônica do açúcar em

Ochromoanas danica. Com auxílio da linhagem mutante de tomate $P_{35S}:SlGalLDH^{RNAi}$, cujo gene silenciado codifica a enzima L-Galactono-1,4-lactona desidrogenase, ALHAGDOW et al. (2007) demonstraram o envolvimento da enzima catalisando o último passo da reação de síntese de ACS, envolvendo L-galactono-1,4-lactona.

(b) A rota de “não-inversão”, sugere a síntese de ascorbato a partir da glicose via D-glucosona. Evidências favoráveis a esta rota metabólica de síntese de ACS em plantas são fundamentadas em estudos utilizando ^{14}C . D-[6- ^{14}C]Glucosona, obtida enzimaticamente a partir da D-[6- ^{14}C]glicose, foi utilizada no comparativo da eficiência de conversão destes dois açúcares em ácido L-ascórbico, por meristemas apicais de feijão e folhas de espinafre. Pôde ser verificada maior eficiência de conversão na utilização da glucosona em relação à glicose (SATIO et al., 1990). Os mesmos autores relatam, que ainda com menor eficiência, ocorre a conversão de L-[U- ^{14}C]sorbosona em ácido L-ascórbico, sugerindo que estes estes dois compostos sejam prováveis intermediários na conversão de D-glicose a ASC em plantas superiores. Até o presente momento, ainda não foram identificadas enzimas catalisadoras das reações de conversão de D-glicose a D-glucosona ou D-glucosona a L-sorbosona (NOCTOR & FOYER, 1998).

A respeito do ascorbato e suas interrelações com a glutationa, é importante ressaltar a “reciclagem” de deidroascorbato, processo que envolve ambos. Neste ciclo de reações, ilustrado por NOCTOR & FOYER (1998), a enzima APX, na presença de radicais H_2O_2 , catalisa a oxidação do ACS, gerando monodeidroascorbato (MDHA). O MDHA gerado pode tanto ser reduzido a ACS pela enzima monodeidroascorbato redutase (MDHAR) que utiliza $\text{NADPH}+\text{H}^+$ como doador de elétrons, quanto ser convertido a dehidroascorbato (DHA) por reações não enzimáticas. O DHA por sua vez, é reduzido a ACS pela enzima dehidroascorbato redutase (DHAR) formando ACS, a partir dos elétrons doados pela GSH. Como a GSH é oxidada, há formação de GSSG, sobre a qual atua a enzima GR, reduzindo GSSG com os elétrons doados por $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (Figura 5).



2.3.1.3. α -Tocoferol

Os tococromanóis, comumente designados como “vitamina E”, correspondem a classe de quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis. São substâncias antioxidantes de natureza lipídica, sintetizadas somente pelas plantas e outros organismos aeróbios fotossintetizantes. Estas moléculas de natureza anfipática possuem uma “cauda” hidrofóbica associada aos lipídeos de membrana e uma “cabeça” polar associada à superfície da membrana (DELLAPENNA, 2005).

Segundo SOUZA (2005), o termo vitamina E deve ser usado como uma descrição genérica de todos os derivados tocóis e tocotrienóis que qualitativamente exibem atividade biológica de α -tocoferol. Os tocoferóis ocorrem naturalmente como benzopiranos fenólicos com atividade antioxidante “in vivo” e “in vitro”. A atividade do α -tocoferol “in vivo” é superior a das outras espécies, cerca de 10 vezes maior do que seu precursor imediato, o γ -tocoferol. Portanto, a atividade de vitamina E, é determinada basicamente pela concentração de α -tocoferol.

α , β , γ e δ -tococromanóis diferem unicamente no número e posição dos substituintes metil presentes no anel aromático, de forma que α possui três, β e γ possuem

dois e δ -tocoferol possui apenas um substituente. Assumindo que ambos, tocoferóis e tocotrienóis são sintetizados pela mesma rota biossintética, a diferença entre eles está basicamente no grau de saturação das cadeias hidrofóbicas, onde os tocoferóis apresentam a cadeia de 20 carbonos completamente saturada, e os tocotrienóis apresentam insaturações nos carbonos 3', 7' e 11' (SOLL & SCHULTZ, 1979; DELLA PENNA, 2005).

A rota biossintética do tocoferol na plantas utiliza aminoácidos aromáticos presentes no citosol para a síntese de porção polar (a partir do ácido homogentísico - HGA), e a rota plastídica da dioxilose 5-fosfato para síntese da cauda apolar. Inicialmente, há síntese da porção aromática (“cabeça”), envolvendo a conversão de ácido p-hidroxifenilpirúvico (HPP) à HGA, através da ação da enzima ácido p-hidroxifenilpirúvico dioxigenase (HPPD). Esta complexa e irreversível reação enzimática envolve a adição de duas moléculas de oxigênio, e descarboxilação e o rearranjo da cadeia de HPP (SCHULZ et al., 1993; FORBES & HAMILTON, 1994). Após esta etapa, o HGA está sujeito a “prenilação” com fitil difosfato ou geranilgeranildifosfato, para produzir 2-metil-6-fitilplastoquinol (MPBQ), e 2-metil-6-geranilgeranilplastoquinol (MGGBQ), respectivamente (NORRIS et al., 1995); esta reação é catalisada pela enzima homogentisato preniltransferase (HPT). MPBQ e MGGBQ são os primeiros intermediários gerados na síntese de todos tocoferóis e tocotrienóis, respectivamente. O substrato específico da HPT é o fator chave que determina a produção de tocoferóis, tocotrienóis ou ambos compostos por um organismo.

O próximo passo na via biossintética são as metilações e ciclizações dos anéis, realizado com auxílio de ciclases e metiltransferases específicas, as mesmas responsáveis pela presença dos diferentes membros de cada classe (formas α , β , γ e δ), conforme DELLA PENNA (2005), demonstra esquematicamente (Figura 6).

Em plantas de *Nicotiana tabacum* com o gene de síntese de HPT silenciado, VOLL et al. (2007), verificaram que as plantas apresentaram uma redução de mais de 98% nos teores totais de tocoferol acumulados em relação às plantas normais. As plantas transgênicas apresentaram ainda maior sensibilidade a agentes estressores como o metil viologênio, em relação as plantas não transgênicas.

BRYANT et al. (2006), observaram que o α -tocoferol desempenha um importante papel na otimização do sistema fotossintético e na homeostase de macronutrientes em *Synechocystis sp. PCC 6803*. Muitas linhagens evidenciaram que o aumento no estresse oxidativo em mutantes tocoferol-deficientes é uma importante causa da inativação do fotossistema II, e quando crescidas na presença de glicose, esta pode ser indutora da letalidade

para as células. Os mesmos autores propõem desta forma, além do papel antioxidante do α -tocoferol, uma função não-antioxidante regulatória na fotossíntese e na homeostase.

Os baixos teores de tocoferol podem também exercer influência sobre outros componentes do sistema antioxidante. CARETTO et al. (2002), estudando o comportamento diferencial de duas linhagens de células de *Helianthus annuus* L. Cv. Gloriasol, uma com o conteúdo total de tocoferol três vezes superior à outra, observaram que as enzimas responsáveis pela eliminação dos radicais H_2O_2 apresentaram maior atividade na linhagem de células com menores teores de tocoferol, possivelmente tentando compensar sua falta, para manter o equilíbrio oxidativo.

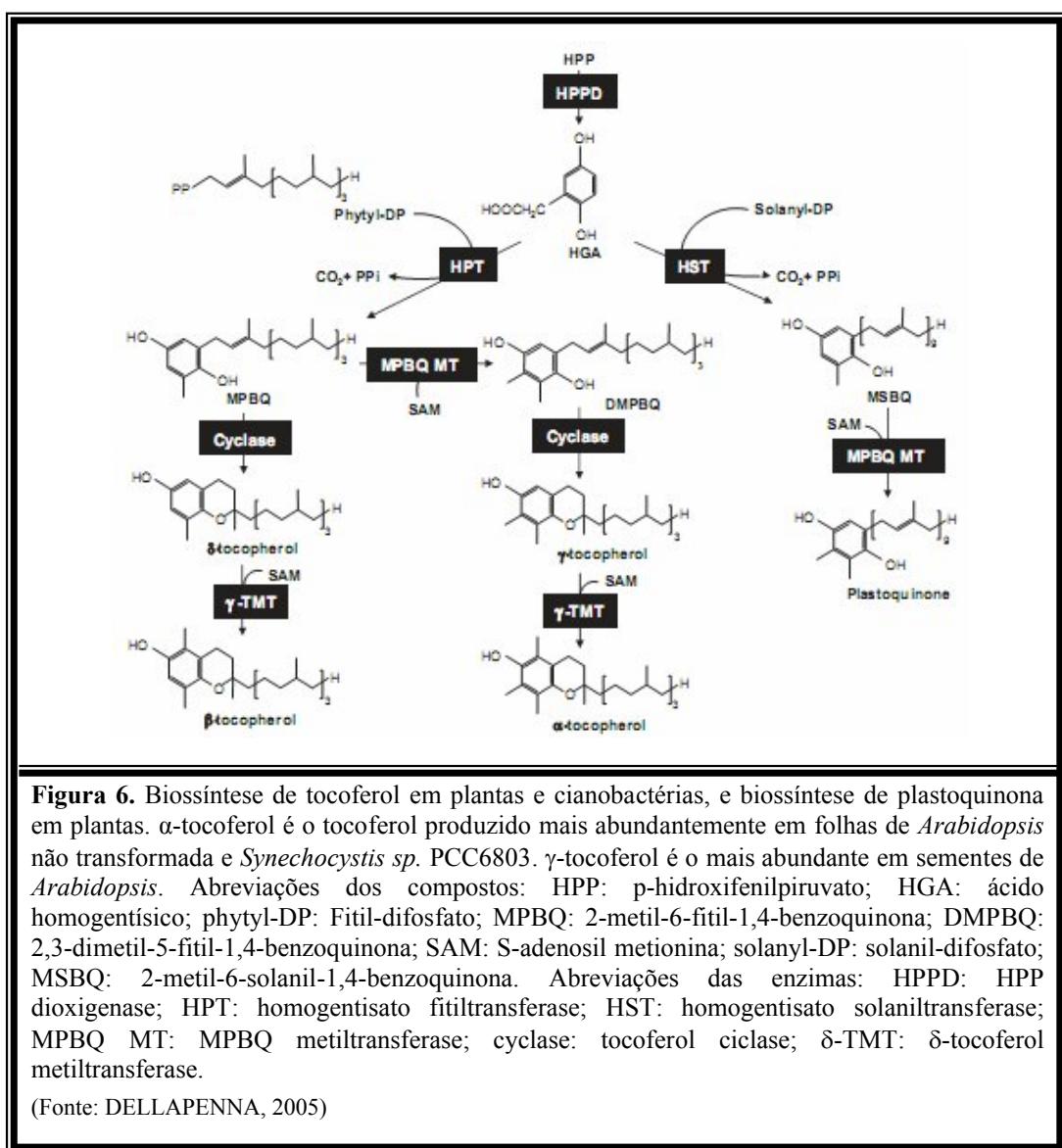


Figura 6. Biossíntese de tocoferol em plantas e cianobactérias, e biossíntese de plastoquinona em plantas. α -tocoferol é o tocoferol produzido mais abundantemente em folhas de *Arabidopsis* não transformada e *Synechocystis* sp. PCC6803. γ -tocoferol é o mais abundante em sementes de *Arabidopsis*. Abreviações dos compostos: HPP: p-hidroxifenilpiruvato; HGA: ácido homogentísico; phytyl-DP: fitil-difosfato; MPBQ: 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona; DMPBQ: 2,3-dimetil-5-fitol-1,4-benzoquinona; SAM: S-adenosil metionina; solanyl-DP: solanil-difosfato; MSBQ: 2-metil-6-solanil-1,4-benzoquinona. Abreviações das enzimas: HPPD: HPP dioxigenase; HPT: homogentisato fitiltransferase; HST: homogentisato solaniltransferase; MPBQ MT: MPBQ metiltransferase; cyclase: tocoferol ciclase; δ -TMT: δ -tocoferol metiltransferase.

(Fonte: DELLA PENNA, 2005)

2.3.1.4. Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos vegetais que ocorrem universalmente nos cloroplastos de todas plantas superiores e algas. Podem ocorrer também em tecidos não fotossintéticos, conferindo colorações amareladas, alaranjadas, e até avermelhadas, com várias matizes entre as mesmas. São compostos extremamente hidrofóbicos, entretanto, estão freqüentemente associados a proteínas específicas, o que lhes permite o acesso ao ambiente aquoso (BRITTON & YOUNG, 1993).

A estrutura básica do grupo dos carotenóides conta com um esqueleto tetraterpênico simétrico, formado por duas sub-unidades de 20 carbonos. Esta cadeia hidrocarbonada pode ser acíclica como no caso do licopeno, ou ainda pode apresentar modificações na estrutura terminal formando anéis, tanto em uma das extremidades, no caso dos carotenóides monocíclicos, quanto em ambas as extremidades, originando os carotenóides dicíclicos, dos quais o representante mais conhecido é o β -caroteno (BRITTON & YOUNG, 1993).

A síntese dos carotenóides ocorre no interior dos plastídios, a partir de um isoprenóide central (Figura 7). Esta mesma via biossintética é também utilizada na síntese de outros compostos, a exemplo de terpenos, esqualeno, giberelinas, esteróis e fitol (SOUZA, 2005). Todos isoprenóides são formados a partir de um composto com cinco átomos de carbono, o isopentenil difosfato (IPP). A origem do IPP pode ser atribuída a duas fontes principais nos plastídios: (a) o piruvato e (b) o gliceraldeído 3-fosfato. Na reação seguinte, o IPP sofre isomerização enzimática gerando dimetilalil difosfato (DMAPP), ao qual são adicionadas três moléculas de IPP através da enzima geranilgeranil difosfato sintetase (GGPPS). O produto da reação catalisada pela GGPPS é uma molécula de geranilgeranil difosfato (GGPP) de 20 carbonos (GGPP-C₂₀). Em seguida, há condensação de duas moléculas GGPP-C₂₀, resultando em um esqueleto carbônico “C₄₀” a partir do qual todas variações individuais são derivadas (BAUERNFIEND, 1972).

A atuação da fitoeno sintase sobre o GGPP-C₂₀ promove a formação de fitoeno. Este composto é convertido à licopeno, pela ação de duas enzimas dessaturases, a fitoeno e ζ -caroteno dessaturase, que se ligam ao flavina adenosina dinucleotídeo (FAD), introduzindo quatro ligações duplas à cadeia carbônica, utilizando elétrons doados pela plastoquinona. Nesta via metabólica, a ciclização do licopeno é um passo importante. Uma rota leva à formação de β -caroteno e de seus derivados oxigenados: zeaxantina, violaxantina e

neoxantina; e a outra, presente nas algas verdes e plantas superiores, leva à formação dos carotenóides com um anel β -ionona e outro ϵ -ionona, como o α -caroteno e a luteína (SANDMANN, 1994), que é a principal xantofila das folhas das plantas superiores.

Dentre a infinidade de funções biológicas que desempenham nos organismos, KRINSKY (1994) cita a transferência de energia no processo de fotossíntese e proteção dos fotossistemas nos organismos vegetais; nos animais alguns carotenóides são fonte de pró-vitamina A, essencial para o crescimento e desenvolvimento normal.

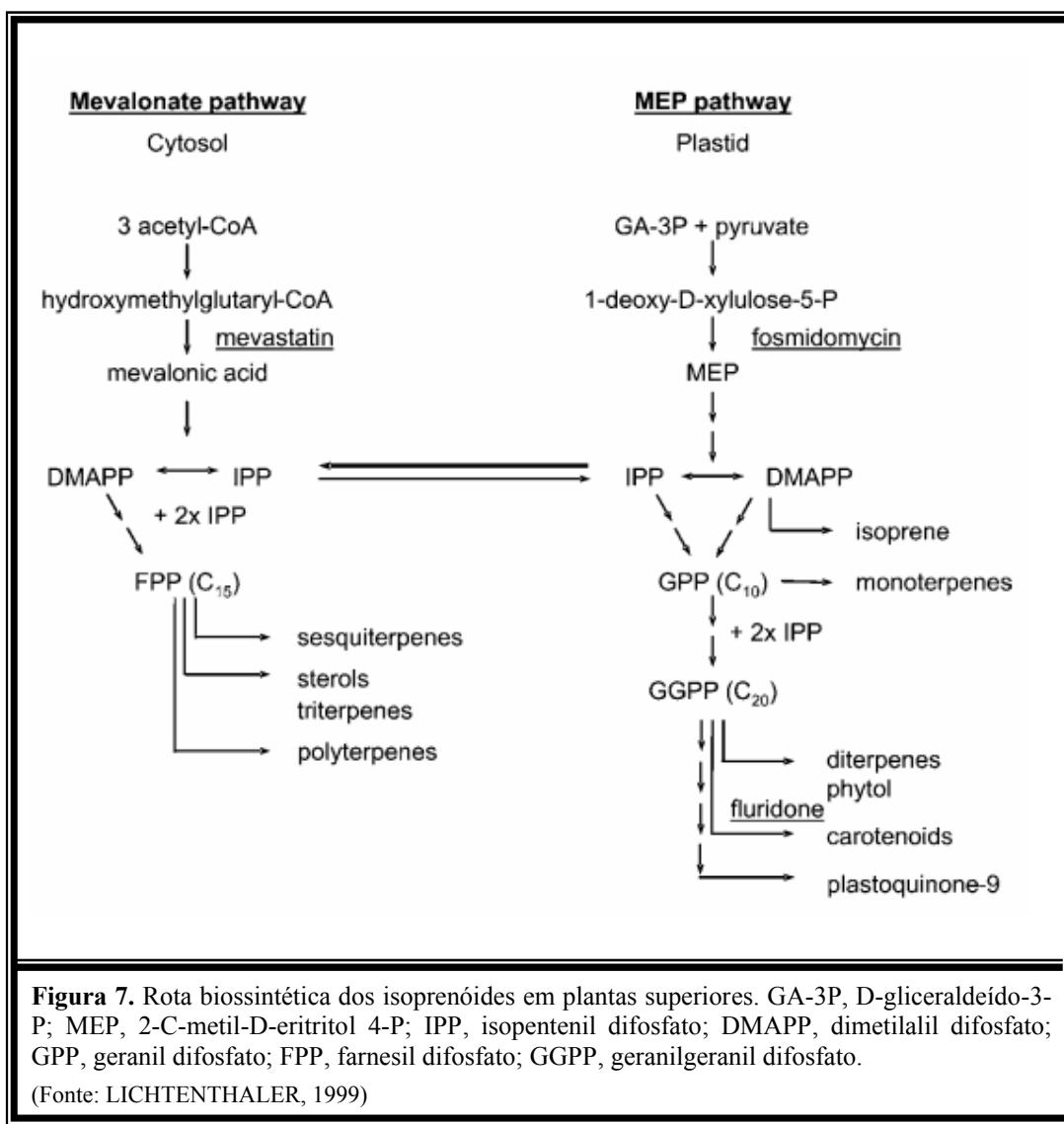


Figura 7. Rota biossintética dos isoprenóides em plantas superiores. GA-3P, D-gliceraldeído-3-P; MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-P; IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GPP, geranyl difosfato; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato.

(Fonte: LICHTENTHALER, 1999)

Os carotenóides possuem a propriedade de captar energia de moléculas excitadas, conforme demonstrado por FOOTE & DENNY (1968), em que a taxa de “consumo” de $^1\text{O}_2$ sofre incremento considerável em função do aumento da concentração de β -caroteno presente na reação. Atualmente possui ampla aceitabilidade a teoria de que os

carotenóides são capazes de “extinguir” oxigênio *singlet*, e que esta função é conferida, em termos relativos, pelo grande número de ligações duplas presentes em sua estrutura (MASCIO et al., 1989).

Tratando-se dos sistemas biológicos, o fato dos carotenóides atuarem como agentes antioxidantes é uma propriedade que atrai muito a atenção. Seu potencial de reagir com ROS serviu de base para a determinação da atividade de várias enzimas lipoxigenases, uma vez que o ensaio envolve a oxidação do sistema conjugado de duplas ligações do composto carotenóide, acarretando perda da absorção no espectro visível, ou seja, na sua “descolarização” (KRINSKY, 1994). Este processo evidencia seu potencial antioxidante.

SANDMANN et al. (2001), confirmaram o envolvimento dos carotenóides no sistema de defesa de *Synechococcus* PCC7942, estirpe R2-PIM8 contra a radiação UV. Os autores observaram que os organismos transformados com genes específicos para o aumento dos teores de carotenóides, apresentaram menores danos no fotossistema II em relação aos não transformados, quando exposto a elevadas doses de radiação UV.

Plantas de morango arbustivo (*Arbutus unedo* L.), quando submetidas a severo estresse hídrico, associado a altas temperaturas e alta intensidade luminosa, apresentaram alto teor de tocoferóis, aumento do teor de ascorbato e zeaxantina, decréscimo dos teores de clorofilas, luteína e β -caroteno (MUNNÉ-BOSCH & PEÑUELAS, 2004), sugerindo que estes mecanismos antioxidativos estejam associados a resistência das plantas ao estresse oxidativo gerado pelas condições de reduzido potencial hídrico.

MIDDLETON & TERAMURA (1993), em um ensaio com linhagens de soja clorofila-deficientes, flavonóide-deficientes e normais, de duas cultivares, observaram que há envolvimento tanto de flavonóides quanto de carotenóides na fotoproteção dos tecidos foliares em relação a alta radiação UV-B. Entretanto, relatam uma relação direta apenas quanto ao conteúdo de carotenóides, visto que há um aumento proporcional do mesmo quando os níveis de radiação sofrem acréscimo.

2.3.1.5. Fitoquelatinas

É notável o seqüestro de metais pesados através de complexos quelantes, sendo esta uma das principais rotas de destoxificação de vários metais pesados, como Cu, Zn, As e Cd (INOUE, 2005). Técnicas moleculares e espectroscópicas a partir de raio-X de absorção

de estruturas delgadas confirmam a formação de pontes entre o Cd e o S, demonstrando a existência de um complexo Cd-fitoquelatina (INOUHE, 2005; CÓZATL et al., 2008; MORTEL et al., 2008).

O Cd possui uma alta afinidade pelos processos metabólicos que envolvem o enxofre. Como o SO_4^{2-} , principal fonte de S assimilável pelas plantas e microorganismos, possui baixo potencial redox e consequentemente pouca reatividade, ele necessita ser “ativado” antes de sua redução e incorporação às moléculas orgânicas (LEYH, 1993). O processo inicial de ativação do SO_4^{2-} consiste em sua associação a uma molécula de ATP, formando APS e PPi, na reação catalisada pela enzima ATP:sulfato adenilil transferase (ATP-sulfurilase). KNECHT et al. (1995), demonstraram o envolvimento do Cd na atividade da enzima ATP-sulfurilase, que inicialmente, em baixas concentrações do metal demonstra um aumento da atividade, entretanto em um segundo momento, o aumento da concentração de Cd provoca sua redução de forma drástica.

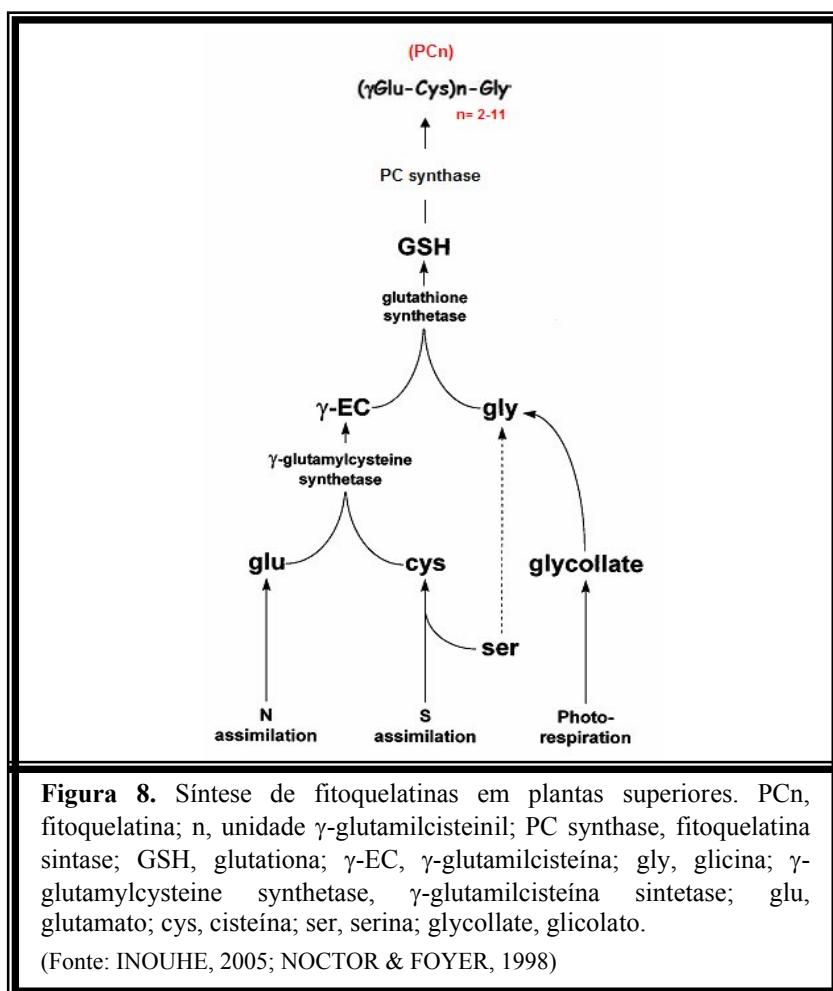
Efeito semelhante ao que acontece com ATP-sulfurilase é demonstrado com a enzima adenosina 5'-fosfatosulfato sulfotransferase (APSSTase) em plântulas de milho. Quando expostas a concentrações de até $50\mu\text{M}$ de Cd, ambas as enzimas, ATP-sulfurilase e APSSTase apresentaram aumento da atividade e consequente aumento da taxa assimilatória de S, entretanto o aumento da concentração de Cd ocasionou o declínio da atividade enzimática, com reflexo no S total assimilado (NUSSBAUM et al., 1988).

Quando presente no citosol, o Cd estimula outro sistema relacionado ao S, resultando na síntese de importantes agentes complexantes, as fitoquelatinas (PC's), que podem contribuir decisivamente na “inativação” do metal em relação ao metabolismo da planta, uma vez que os grupos tióis das fitoquelatinas reagem com o Cd, quelando o mesmo e previnindo os tecidos da planta da livre circulação do metal (GRILL et al., 1985).

KNECHT et al. (1995), relatam que linhagens tolerantes e sensíveis de *Silene vulgaris* ao Cd, diferem quanto a capacidade de síntese de PC's. Plantas da linhagem sensível sintetizam aproximadamente três vezes mais PC's em relação a linhagem tolerante. Entretanto, a síntese de PC's está associada a uma elevado custo metabólico; plantas de milho crescidas na presença de Cd, apresentam já a partir do quarto dia redução no ganho de matéria fresca da raiz, e algum tempo depois, observa-se o mesmo efeito na parte aérea da planta (RAUSER & MEUWLY, 1992).

As PC's são sintetizadas a partir da glutationa, por meio da enzima fitoquelatina sintase (Figura 8), uma γ -glutamilcisteína dipeptidil transpeptidase específica

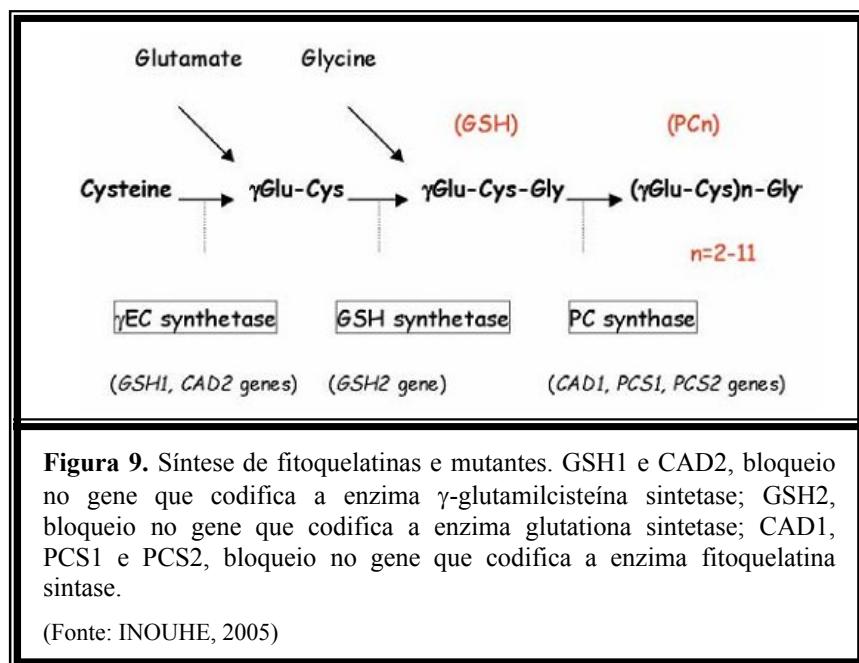
(GRILL et al., 1989). Esta enzima é auto-regulada pelo produto de sua própria reação, ou seja, o conteúdo de PC's (TOPPI & GABBRIELLI, 1999). Estes peptídeos são rapidamente sintetizados em resposta a níveis tóxicos de metais pesados na maioria dos organismos vegetais (LEE et al., 2003). Normalmente depois de sintetizados, estes compostos se ligam aos metais e são temporariamente alocados no vacúolo, onde sofrem uma provável dissociação. Subseqüentemente, as PC's não-ligadas aos metais pesados são degradadas (ZENK, 1996).



A síntese de PC, em resposta à exposição ao Cd, é atualmente melhor compreendida graças a estudos envolvendo o uso de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*. HOWDEN & COBBETT (1992), identificaram o mutante CAD1, que possui menor habilidade de síntese de PC's, apresentando maior sensibilidade ao Cd em relação à linhagem selvagem. Posteriormente, mais mutantes de *Arabidopsis* foram identificados, todos com deficiência no seqüestro e quedação do Cd (HOWDEN et al., 1995a,b; COBBETT, 2000).

Estes mutantes (Figura 9) apresentam um bloqueio no gene que codifica alguma das enzimas responsáveis pela síntese dos peptídeos (INOUHE, 2005).

A compartimentalização vacuolar é outro importante mecanismo de destoxificação e tolerância em relação ao Cd, previnindo a livre circulação dos íons no citosol e forçando com que ocupem uma área limitada. Os complexos Cd-fitoquelatina anteriormente descritos, possuem uma alta afinidade entre si e freqüentemente polimerizam, adquirindo elevado peso molecular. Estes polímeros são então eficientemente transportados ao vacúolo através de proteínas específicas (ORTIZ et al., 1995).



2.3.1.6. Metalotioneínas

Metalotioneínas (MT's) são proteínas específicas com baixa massa molecular, ricas em cisteína, podendo apresentar teores acima de 30% (TOPPI & GABBRIELLI, 1999). Inicialmente isoladas de rins de cavalo, as MT's passaram a ser identificadas em diversos organismos, incluindo plantas, animais, fungos e algumas bactérias (COBBETT & GOLDSBROUGH, 2002). As MT's podem apresentar diferentes arranjos dos resíduos de cisteína, e estes são cruciais na determinação das propriedades quelantes e funções das MT's (KLAASSEN et al., 1999).

Nos organismos animais, as MT's representam uma importante via de destoxificação de metais pesados, dentre eles o Cd. VAUFLEURY et al. (2008), trabalhando com a suplementação de Cd na dieta de ratos *Wistar*, puderam observar a síntese de metalotioneínas como mecanismo de defesa à exposição ao Cd. Em doses mais elevadas, há formação destes peptídios em vários órgãos dos animais, como nos rins, fígado e intestino delgado; já sob menores concentrações, observou-se apenas a formação em determinados órgãos tais como os rins, possivelmente pela alta solubilidade que o Cd possui. Nos rins, o acúmulo de Cd pode causar nefrotoxicidade crônica, porém não necessariamente haja este reflexo, devido a ação de MT's, que demonstram potencial e principal via de destoxificação (VESTERGAARD & SHAIKH, 1994).

Em plantas de tomate expostas ao Cd, BARTOLF et al. (1980) relatam a possível indução da síntese de proteínas associadas ao metal. O material recolhido na fração correspondente a 10.000 Da e purificado cromatograficamente apresentou maior rendimento de um componente, com espectro de absorção característico de MT's; posteriormente, através de ensaios de eletroforese, confirmou-se a existência de proteínas associadas ao Cd, porém apresentando características diferentes daquelas presentes em MT's isoladas de animais.

A resistência de plantas a metais como o Cu e Zn, além da translocação e acúmulo destes elementos está associada às MT's. GOLDSBROUGH et al. (2008) relatam a ocorrência de quatro classes de MT's vegetais, todas envolvidas na destoxificação de metais pesados em *Arabidopsis thaliana*, com diferentes graus de influência sobre o estresse e diferentes afinidades em relação aos metais aos quais são expostas.

A presença de moléculas de γ -glutamil na estrutura peptídica que compõem as MT's sugere que sua origem esteja relacionada a atividade enzimática, entretanto o mecanismo de síntese não está claramente elucidado. Possivelmente a síntese seja regulada pela presença de moléculas específicas que se liguem unicamente a metais (WINGE et al., 1988). Como a existência de informação a respeito da influência de MT's na superação de estresses em plantas é restrita a poucos trabalhos, não há como definir seu grau de relevância em relação às fitoquelatinas vegetais, entretanto elas podem ser admitidas como outro mecanismo de defesa contra agentes causadores de estresse oxidativo (TOPPI & GABBRIELLI, 1999).

2.3.2. Sistema antioxidante enzimático

2.3.2.1. Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A SOD teve sua atividade descrita por McCORD & FRIDOVICH (1969). A enzima utiliza radicais $O_2^{\cdot-}$ como substrato, e os converte a H_2O_2 (Figura 10), reduzindo o risco de dano oxidativo à célula pelos radicais $O_2^{\cdot-}$. Caracterizada como uma metaloenzima multimérica, ela está presente nos organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, e é a primeira enzima do sistema de defesa a atuar sobre os ROS, prevenindo, dentro do possível, os danos celulares (OLMOS et al., 2003).



Figura 10. Reação catalisada pela SOD. Decomposição de radicais superóxido e formação de peróxido de hidrogênio.
(Fonte: McCORD & FRIDOVICH, 1969)

O resultado da atividade das SODs causa reflexos nas concentrações de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , ambos produtos da reação de Haber-Weiss, que origina os radicais OH^{\cdot} , conforme já visto, os mais agressivos e danosos a célula. Provavelmente por esta razão as SODs ocupem a posição central no mecanismo de defesa dos organismos (BOWLER et al., 1992).

As SODs existentes diferem quanto à natureza do metal presente em seu sítio ativo, e a classificação é baseada neste critério. Desta forma, segundo SCANDALIOS (1993), é possível encontrar nos sistemas biológicos aeróbios e/ou anaeróbios facultativos, sejam estes eucariontes ou procariontes, as seguintes classes de SOD: (a) Cu/Zn-SODs; (b) Mn-SODs; e (c) Fe-SODs.

As plantas podem apresentar todas isoformas citadas, entretanto, as Cu/Zn-SODs representam a maior porção da enzima (BAUM et al., 1983; POLLE et al., 1992). As isoformas Cu/Zn-SODs são sensíveis ao CN^- , e estão presentes primariamente nos

cloroplastos e citosol, enquanto as Mn-SODs que não são afetadas pelo CN^- , são detectadas nos mitocôndrios e peroxissomos (ALLEN et al., 1993; MALLICK & MOHN, 2000).

WINGSLE et al. (1991) isolaram e purificaram isoformas da SOD em acículas de *Pinus sylvestris* L., que foram denominadas SOD1, SOD2, SOD3 e SOD4. Por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) que todas isoformas presentes em acículas jovens eram semelhantes à Cu/Zn-SOD. Entretanto, em ensaio conduzido com acículas maduras, pôde ser distinta das Cu/Zn-SOD outra isoforma, sugerindo ser Mn-SOD. No mesmo estudo o autor verificou que há presença da enzima em diferentes compartimentos celulares, uma vez que utilizou-se de diferentes frações após a centrifugação para realizar a PAGE; a SOD1 foi visualizada no citosol, enquanto a SOD3 foi encontrada em maior proporção nos cloroplastos.

Em *Hydrilla verticillata* L. submetida a diferentes formas de estresse, a atividade da SOD demonstrou ser afetada. Quando a planta é submetida aos metais Cr e Zn, há inibição da SOD, entretanto o Cu e Cd ocasionam o aumento de sua atividade. O estresse salino ocasionado pelo NaCl estimula a atividade da SOD, embora o estresse hídrico tenha provocado sua diminuição (PANDA & KHAN, 2004). BUENO & PIQUERAS (2002) estudaram o efeito de diferentes metais sobre mecanismos de defesa antioxidantes de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. Cv. Bright Yellow 2). A exposição aos metais causou alteração na atividade total da SOD de diferentes formas, dependendo do metal empregado no ensaio. Em células submetidas ao Cu e ao Mn, a SOD aumentou significativamente, ao contrário do que acontece quando células de tabaco são expostas ao Fe e Zn, causando a redução.

As algas planctônicas marinhas da espécie *Tetraselmis gracilis*, demonstram aumento da atividade da SOD quando em contato com Cd, mesmo em baixas concentrações, sugerindo um estado de estresse oxidativo causado pelo metal (OKAMOTO et al., 1996). BISCHOF et al. (2003), observaram que a atividade da SOD aumentou na macroalga verde *Ulva rotundata* Bliding após exposição a elevadas irradiações UV-A e UV-B, causadoras de estresse oxidativo.

2.3.2.2. Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Dentre as enzimas capazes de degradar H_2O_2 , a CAT é a única capaz de realizar o processo sem utilizar outros redutores celulares, caracterizando um eficiente mecanismo de remoção de peróxido de hidrogênio formado em células sob condições de estresse (MALLICK & MOHN, 2000). A CAT é uma enzima tetramérica, que possui uma estrutura Fe-porfirínica (McCLUNG et al., 1996), com sua descrição relatada em 1901 por Loew (McCLUNG et al., 1996). Esta enzima catalisa a dismutação do H_2O_2 a água e oxigênio (Figura 11), e é encontrada em todos organismos (GRATÃO, 2003).

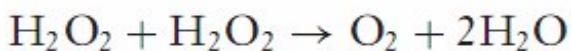


Figura 11. Reação catalisada pela CAT. Decomposição de radicais peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

(Fonte: IMLAY, 2008)

Pela sua ampla distribuição e capacidade de rápida degradação dos radicais peróxido de hidrogênio, MALLICK & MOHN (2000) sugerem que a CAT desempenhe papel fundamental nos sistemas que viabilizam a vida em condições aeróbias. Evidências em ensaios realizados levam a crer que o mecanismo utilizado pela CAT nas reações peroxidativas seja composto por dois estágios: (1) no estágio inicial, o Fe presente no grupo heme da CAT interage com H_2O_2 formando um peróxido de Fe rico em oxigênio, denominado componente I; (2) no estágio subseqüente, o componente I pode ser reduzido por algum doador de hidrogênio, a exemplo do etanol e/ou ácido ascórbico, quando em baixas concentrações de H_2O_2 ($<10^{-6}$ mol L^{-1}); ou, em condição de elevadas concentrações de H_2O_2 , o componente I poderá reagir com uma segunda molécula de H_2O_2 para formar H_2O e O_2 (GRATÃO, 2003).

Em determinados tecidos vegetais, a CAT existe em diferentes isoformas, que sofrem alteração ao longo do processo de desenvolvimento da planta. Em *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana sylvestris*, as múltiplas formas da CAT podem ser separadas cromatograficamente em diferentes valores de pH, conforme demonstraram HAVIR & McHALE (1987). Os autores indicam que as proporções entre as três isoformas da CAT (CAT1, CAT2 e CAT3) variam ao longo do desenvolvimento da planta, variando também a atividade relativa das

mesmas. As CATs estão alocadas primariamente nos peroxissomos e/ou glioissomos, e posteriormente como demonstrado com plantas de milho, também está presente nos mitocôndrios (WILLEKENS et al., 1997).

A CAT atua durante a dessecação de sementes de *Helianthus annuus* L., prevenindo o dano oxidativo causado pelo acúmulo H_2O_2 , gerado no processo de desidratação (BAILLY et al., 2004). No sentido inverso, o acúmulo de H_2O_2 nos tecidos vegetais possivelmente regula a expressão gênica da CAT e a rota de transdução do sinal de desidratação. LUNA et al. (2004), descrevem o acúmulo de H_2O_2 em plantas de *Triticum aestivum* L. mediante estresse hídrico, e que este aumento da concentração de H_2O_2 é acompanhado da duplicação na atividade da CAT. Os autores indicam ainda um complexo sistema de regulação da CAT, particularmente em nível de tradução do mRNA, que permite controle preciso do acúmulo de H_2O_2 nas folhas.

Em *Pinus sylvestris* exposto ao Cd, a CAT apresentou significativa supressão em um primeiro momento, recuperando a atividade após 24 horas. Em concentrações mais elevadas, a CAT apresentou forte aumento da atividade, entretanto posteriormente, em função do prolongamento do estresse, a atividade declinou a níveis similares ao do controle (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001). As respostas antioxidantes envolvendo a CAT revelam uma variação genotípica. URAGUCHI et al. (2006), demonstraram que *Tagetes erecta*, *Avena strigosa* e *Echinochloa utilis* apresentam tendência de decréscimo na atividade da CAT quando expostas a concentrações de Cd de 5mg L^{-1} ou superiores, entretanto *Crotalaria juncea*, *Crotalaria spectabilis* e *Sesbania rostrata* indicam um aumento considerável da atividade enzimática em resposta às mesmas concentrações do metal.

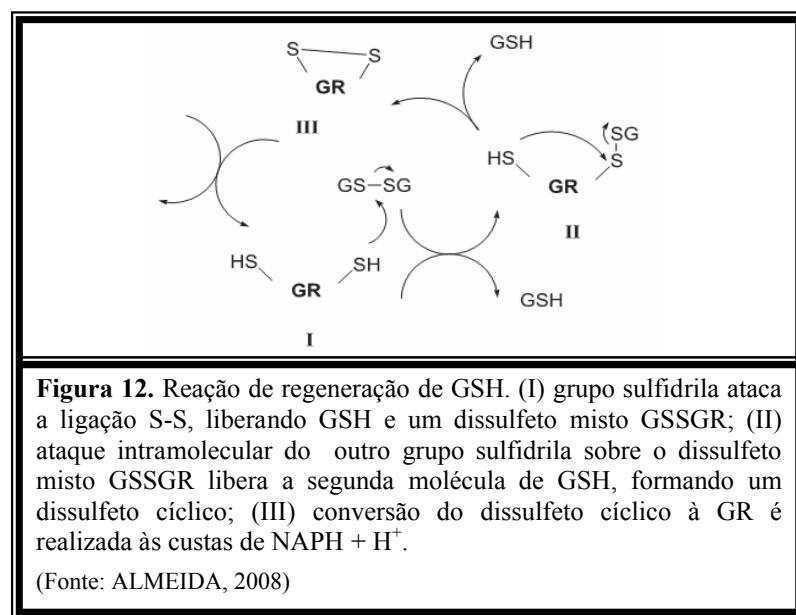
2.3.2.3. Glutationa redutase (GR, EC 1.8.1.7)

GR é uma flavoproteína com propriedades catalíticas que utiliza uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como cofator – transferidor de elétrons, e catalisa a reação de redução de GSSG pelo $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (SCRUTTON & RAIN, 1996). Os sítios ligantes para GSSG estão situados na interface das duas subunidades que constituem a estrutura quaternária da glutationa redutase, sendo que cada uma tem um domínio distinto com um sítio ligante para o NADPH (ALMEIDA et al., 2008). A enzima foi observada pela primeira vez em 1930, e posteriormente isolada de diversas fontes (MEISTER &

ANDERSON, 1983). É amplamente distribuída, considerada por GRATÃO (2003) de ocorrência quase universal, entre procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas fotossintetizantes até plantas e animais superiores.

Esta reação de regeneração de GSH a partir de GSSG, catalisada pela GR, é de grande relevância na superação do estresse causado por Cd em plantas, visto que GSH é considerada por alguns autores a defesa primária de plantas em relação à exposição ao Cd, e para que possa desempenhar suas funções deve estar na forma reduzida (SINGHAL et al., 1987). TOMARO et al. (1996) atribuem à GR papel importante na proteção do cloroplasto contra danos oxidativos, mantendo a razão entre os níveis de GSH e GSSG.

O ciclo redutivo da GR pode ser decomposto em três passos básicos: (1) o grupo sulfidrila de um dos resíduos de cisteína, presentes no sítio ativo da GR ataca a ligação S-S, liberando uma molécula de GSH e um dissulfeto misto GSSGR; (2) um ataque intramolecular do grupo sulfidrila do segundo resíduo de cisteína sobre o dissulfeto misto GSSGR, e libera a segunda molécula de GSH, formando um dissulfeto cíclico (Figura 12); (3) a conversão do dissulfeto cíclico à GR é realizada à custa da conversão de NADPH + H⁺ para NADP⁺ (Figura 13), e então inicia-se novamente o ciclo redutivo mediado pela glutationa redutase (ALMEIDA et al., 2008).



ALSCHER et al. (1992) purificaram a GR a partir de um macerado de folhas de *Pisum sativum* L. Posteriormente, com auxílio de ensaios cromatográficos, os autores verificaram a presença de seis isoformas da enzima. A isoforma eluída em pH 4,9 constitui a menor fração da atividade total da enzima, sendo atribuída às cinco isoformas restantes maior

representatividade na atividade total. O mesmo estudo faz inferência à localização da enzima, citando a forma menos ácida, aquela eluída em pH 4,9, como extraplastídica, e as cinco isoformas eluídas em pH compreendido na faixa de 4,1 a 4,8 como as formas plastídicas.

Um grande número de trabalhos consideram a atividade da enzima GR para avaliar a resposta antioxidativa de plantas a condições de estresse, incluindo a exposição ao Cd. RAZINGER et al. (2008), verificaram que dentre as enzimas envolvidas no sistema antioxidante de *Lemna minor* L., a GR demonstrou ser menos influenciada pelo aumento da concentração de Cd, em relação a CAT, APX e GPX.

Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) com reduzida atividade da GR, exibem maior sensibilidade a aplicação de herbicida Paraquat® sob elevadas condições de luminosidade, avaliada através da destruição das moléculas de clorofila e do extravasamento de eletrólitos de discos foliares. A partir destes resultados, AONO et al. (1995), indicam provável envolvimento da atividade da GR na tolerância das plantas ao estresse foto-oxidativo causado pelo herbicida.

ESTERBAUER & GRILL (1978) relacionam as variações sazonais na atividade da GR com a robustez das folhas de *Picea abies* durante o inverno, sugerindo que aumentos da atividade enzimática conferem maior rusticidade às baixas temperaturas, auxiliando na retenção foliar mesmo em épocas de frio intenso.



Figura 13. Reação catalisada pela GR. Regeneração de GSH a partir de GSSG, utilizando NADPH + H⁺ como fonte doadora de elétrons.

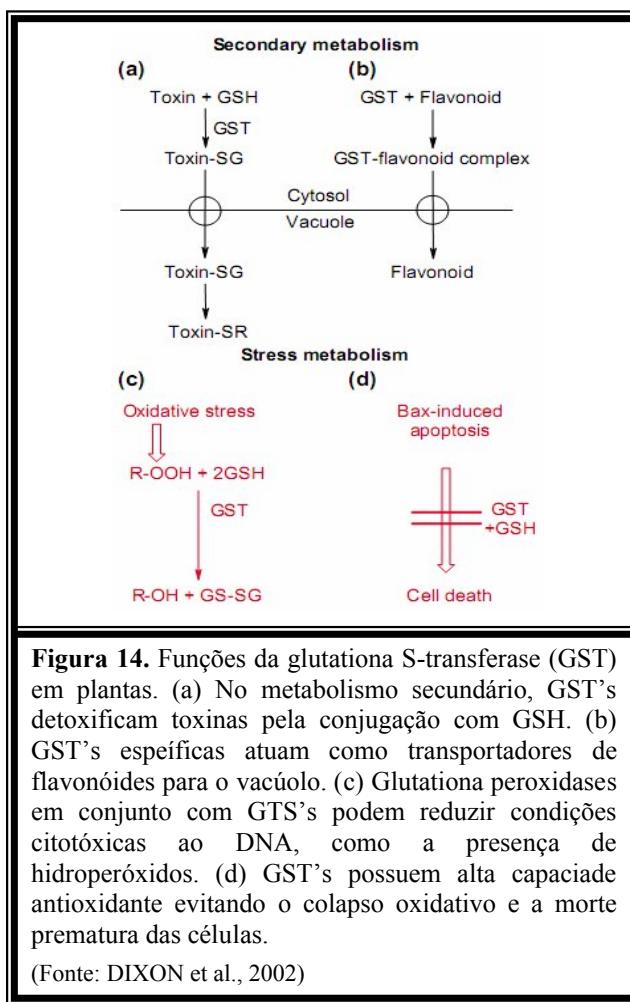
(Fonte: IMLAY, 2008)

2.3.2.4. Glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)

As GSTs são proteínas solúveis constituídas de duas subunidades polipeptídicas, que representam uma família de proteínas capazes de conjugar glutationa, mais especificamente o grupamento tiol da cisteína, a uma enorme gama de compostos

hidrofóbicos, eletrofílicos e freqüentemente citotóxicos (PICKETT & LU, 1989; MARRS, 1996). Em seguida à sua primeira identificação aproximadamente 25 anos atrás, as GSTs continuaram sendo descritas nos mais diversos organismos, sugerindo sua ampla distribuição (MARRS, 1996).

GSTs vegetais foram inicialmente identificadas e intensamente estudadas em função de sua habilidade na destoxificação de herbicidas. Algumas isoformas específicas caracterizadas a partir de espécies domesticadas e grandes culturas são capazes de conferir tolerância a herbicidas. Mais recentemente, outra subclasse de GSTs relacionada a inúmeras respostas a estresses (Figura 14), incluindo a defesa contra o ataque de patógenos, estresse oxidativo e exposição a metais pesados foi identificada (MARRS, 1996; DIXON et al., 2002).



MUELLER et al. (2000) relatam a necessidade de GST específica no transporte de antocianinas do local de síntese, no citoplasma, até o local de armazenamento definitivo, o vacúolo, em *Petunia hybrida*. A atividade da GST em plantas de *Euphorbia*

esula L. tratadas com o herbicida seletivo *Diclofop-metil*, apresentaram incremento considerável da atividade da GST, sugerindo possível envolvimento da enzima na superação do estresse causado pela aplicação do produto químico (ANDERSON & DAVIS, 2004).

Em arroz, HAYASHI et al. (2003) verificam a presença de proteínas com grande similaridade às GSTs no floema foliar das plantas. Os autores observam também que o teor total destas proteínas não é alterado quando as plantas são expostas a diferentes tratamentos com herbicidas, o que leva a crer que sua presença esteja envolvida na manutenção das funções do tecido condutor de seiva e/ou que tenha relação com o normal crescimento das plantas de arroz.

Codificadas por uma superfamília de genes, as diversas isoenzimas da GST possuem uma especificidade muito grande quanto ao substrato. Mesmo catalisando reações similares, existe pouca identidade na seqüência de aminoácidos entre as GSTs. Esta tendência é exibida inclusive dentro de uma mesma classe, onde níveis de 25 a 35% são aceitos para a enzima, sendo as regiões amino-terminais caracterizadas como as de maior identidade. Os aminoácidos que se encontram conservados apresentam grande relevância por desempenharem provavelmente importantes funções comuns, a exemplo da ligação com GSH ou reações de catálise (GRATÃO, 2003).

A classificação das GSTs vegetais é baseada em sua seqüência já definida ou então prevista de aminoácidos, nas cinco classes denominadas *Phi*, *Zeta*, *Tau*, *Theta* e *Lambda*. Através de investigações bioquímicas e imunológicas, verificou-se em termos relativos, qua a grande maioria das GSTs estão localizadas no citosol, com exceção de uma *phi* GST e uma *lambda* GST (DIXON et al., 2002).

A expressão gênica ocasionada pelo Al, codifica para dois genes específicos em *Arabidopsis thaliana*: *AtGST1* e *AtGST11*. Estes genes são responsáveis pela transcrição de GST's específicas, e estão unidos em um fragmento de sua extremidade terminal 5' a β -glucuronidase (GUS). A maior atividade de GUS aliada a alta taxa de transcrição de *AtGST1* e *AtGST11*, sugerem um mecanismo de sinalização e regulação. Apesar de apresentarem diferentes modelos de expressão, transcrição e síntese dos elementos envolvidos na superação do estresse em relação ao tempo de exposição ao metal, há fortes indícios do envolvimento destes fatores com os mecanismos de resposta ao Al (EZAKI et al., 2004).

DIXIT et al. (2000), em trabalho realizado com a plantas de ervilha expostas a 40 μ M de Cd, verificaram que há um estímulo considerável da atividade da GST, tanto em folhas quanto em raízes de plantas tratadas com a referida concentração do elemento,

atribuindo a este aumento da atividade um efeito aditivo, juntamente ao das demais enzimas envolvidas na superação dos danos causados por agentes oxidativos, na tolerância ao Cd.

2.3.2.5. Monodeidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4)

Nas células vegetais, conforme descrito anteriormente, o ascorbato representa um dos principais antioxidantes capazes de atuar diretamente sobre os radicais livres, ou ainda servir como doador de elétrons para a APX. De uma forma ou outra, há o envolvimento do ascorbato no ciclo ascorbato-glutathion (NOCTOR & FOYER, 1998; CORPAS et al., 2005).

A enzima MDHAR está diretamente envolvida neste ciclo, promovendo a renovação do ascorbato que se encontra em sua forma oxidada. Para realizar o processo de redução, a MDHAR utiliza o $\text{NADPH} + \text{H}^+$ como fonte doadora de elétrons (Figura 5). No sistema antioxidante vegetal, esta enzima contribui para a geração contínua de ascorbato, utilizado na destoxificação do H_2O_2 via APX. Também é relatado seu envolvimento na redução de radicais fenoxil, supostamente envolvidos na remoção de ROS das células vegetais (SAKIHAMA et al. 2000).

A MDHAR é uma FAD-enzima, sendo a única enzima conhecida que utiliza um radical orgânico com substrato. No mecanismo de reação da MDHAR, o FAD de sua estrutura é reduzido pelo NAD(P)H , e este FAD reduzido da MDHAR é oxidado pelo monodeidroascorbato. As taxas de redução e oxidação ocorrem em intervalos constantes (KOBAYASHI et al., 1995).

CORPAS et al. (2005), em uma análise funcional da MDHAR em plantas de ervilha verificaram um estímulo representativo de todas suas isoformas, presentes em diferentes compartimentos celulares, quando as plantas eram expostas a alta intensidade luminosa e ao Cd. Entretanto, revelam uma expressão diferencial de determinadas isoformas sob as referidas condições de estresse, indicando uma regulação diferencial das mesmas.

Em plantas de milho superexpressando a enzima SOD no tecido foliar, verifica-se um aumento conjunto da MDHAR, da deidroascorbato redutase (DHAR) e da GR, todas localizadas exclusivamente em células do mesófilo foliar. Este incremento da atividade no conjunto de enzimas sugere seu atrelamento a uma maior regeneração de ascorbato reduzido, requerido para compensar o acúmulo de peróxido de hidrogênio nas plantas transformadas (KINGSTON-SMITH & FOYER, 2000).

Quando híbridos de *Prunus* são submetidas à deficiência hídrica, as atividades da APX, MDHAR, DHAR e GR apresentam um aumento substancial, e a medida que a planta reidrata seus tecidos, observa-se decréscimo das atividades das mesmas enzimas, sinalizando a capacidade das plantas em regular seu sistema enzimático antioxidante, como uma habilidade relevante na relação de tolerância ao estresse hídrico (SOFO et al., 2005).

Possivelmente a MDHAR, juntamente com outras enzimas e compostos antioxidantes, possuam envolvimento no processo de senescência foliar em plantas de ervilha, uma vez que pode ser observado decréscimo em suas atividades ao longo da senescência do tecido. A resposta diferencial à senescência do ciclo ascorbato-glutationa nos mitocôndrios e peroxissomos evidencia maior sensibilidade e danos oxidativos aos mitocôndrios em relação a ambos, o que é explicado pelas menor atividade do sistema antioxidante nesta organela, conforme SEVILLA et al. (1998).

2.3.2.6. Deidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1)

Como consequência da oxidação do ascorbato, seja pela doação de elétrons do mesmo para o fotossistema II e posteriormente a doação de um elétron ao fotossistema I, ou pela ação da APX utilizando o ascorbato como doador de elétrons, há formação de MDHA. O MDHA produzido no lúmen, não pode ser reduzido por outra ferridoxina ou pelo NAD(P)H, e é desproporcionado espontâneamente a DHA e ascorbato (ASADA, 1999).

O DHA é um composto não dissociado que penetra facilmente pela membrana do tilacóide e/ou pela membrana plasmática através de transportadores específicos (HOREMANS et al., 2000), ao contrário do MDHA, um composto aniónico incapaz de penetrar as membranas (ASADA et al., 1997). A taxa em que o MDHA é desproporcionado espontaneamente a DHA é intensamente influenciada pelo pH, visto que em pH mais ácido há aumento de DHA. Entretanto, com a alcalinização do meio, há redução da velocidade de geração de DHA proporcionalmente ao aumento do pH (ASADA, 1999). Em seguida a difusão do DHA para o estroma, é indispensável sua redução para manter o ascorbato no estado reduzido, capaz de atuar sobre ROS. Este processo é conduzido pela enzima dehidroascorbato redutase, que se utiliza de GSH como fonte doadora de elétrons (Figura 5).

POTTERS et al. (2000), descrevem a influência dos teores de ascorbato e DHA sobre o ciclo e desenvolvimento celular. Em cultura de células de tabaco (*Nicotiana*

tabacum cv. Bright Yellow-2) com adição sincronizada de ascorbato e DHA os autores observaram uma inibição da progressão do ciclo celular, sugerindo uma ligação entre estresse oxidativo, *status redox* da célula e o controle da divisão celular.

Em plantas de tabaco com supressão da expressão da DHAR, GALLIE & CHEN (2006), verificaram um perda nos teores de clorofila a, uma baixa atividade da Rubisco em função de sua concentração no tecido, além de uma baixa taxa de assimilação de CO₂. Conseqüentemente, as plantas apresentaram menor taxa de expansão foliar, e redução da massa seca foliar, associadas a senescência foliar prematura. Possivelmente, com a regeneração do ascorbato afetada pela não-expressão da DHAR, o acúmulo de ROS no tecido foliar cause danos oxidativos, como os mencionados.

Frutos de macieira (*Malus domestica* cv. Gala) apresentam distribuição uniforme de elevados conteúdos de ACS. Esta uniformidade provavelmente seja consequência da baixa atividade da APX nos tecidos, cuja reação consome ACS, aliada a elevada atividade das enzimas do ciclo de renovação do ascorbato: MDHAR e DHAR (MA et al., 2008).

Em sementes recalcitrantes de *Acer saccharinum* L. submetidas a dessecação, PUKACKA & RATAJCZAK (2005) relatam o aumento da atividade no sistema enzimático do ciclo ascorbato-glutathiona, incluindo as enzimas APX, MDHAR, DHAR e GR, principalmente no eixo embrionário. A provável ativação destas enzimas está relacionada à eliminação de ROS, geradas durante a dessecação.

2.3.2.7. Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

As enzimas peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) são capazes de degradar H₂O₂ em H₂O e um composto oxidado, que depende da peroxidase atuante. São encontradas no citosol, nos vacúolos, nos cloroplastos, na parede celular, no apoplasto, nas mitocôndrias e nos peroxissomos. Em geral, a POX predominante é a ascorbato peroxidase (MITTLER, 2002).

Consideradas as enzimas mais importantes na eliminação de H₂O₂ no citosol e nos cloroplastos (INZÉ & MONTAGU, 1995), as APXs utilizam o ascorbato como doador de elétrons específico, reduzindo H₂O₂ à água e MDHA, constituindo juntamente com MDHAR, DHAR e GR as enzimas do ciclo ascorbato-glutathiona ou ciclo Halliwell-Asada, representado esquematicamente na Figura 5 (INZÉ & MONTAGU, 1995; SHIGEOKA et al., 2002). De acordo com MITTLER (2002), diversos autores afirmam que este ciclo é uma via eficiente de

destoxificação de radicais peróxido em compartimentos em que a CAT possui baixa atividade ou não está presente, a exemplo dos cloroplastos.

A APX é uma heme-peroxidase e pertence a mesma superfamília das heme-peroxidases (Classe I), assim como a citocromo *c* peroxidase. As enzimas guaiacol peroxidases (GPX) freqüentes em plantas, pertencem a Classe III e diferem tanto na seqüência de aminoácidos e nas funções que desempenham (ASADA, 1999). Enzimas GPX participam de reações metabólicas como a biossíntese de lignina, decomposição do ácido indol acético, na defesa contra o ataque de patógenos, entretanto não atua diretamente sobre os radicais H₂O₂. Além disso, alguma isoenzimas da GPX em tecidos vegetais estão localizadas no interior dos vacúolos, na parede celular, e no citosol, porém não são encontradas em organelas (ASADA, 1992).

Contrastando as isoenzimas da GPX, as isoenzimas APXs estão distribuídas em pelo menos quatro compartimentos celulares distintos: (a) no estroma; (b) ligadas à membrana dos tilacóides; (c) nos cloroplastos ligadas à membrana nos microcorpos, incluindo glixossomos e peroxissomos; (d) no citosol (SHIGEOKA et al., 2002). Há ainda uma isoforma de APX ligada à membrana mitocondrial (mitAPX) (LEONARDIS et al., 2000).

Pela grande semelhança que apresentam, em determinados casos, além de oxidar o ascorbato, algumas isoformas da APX podem oxidar também doadores de elétrons “artificiais” em taxas consideráveis, a exemplo do que ocorre com o pirogalol ou guaiacol. Para evitar a inespecificidade em relação ao substrato em ensaios usualmente realizados, é possível utilizar inibidores enzimáticos específicos. A APX possui protoporfirina como grupo prostético, e este é inibido por cianida e azida, ou ainda por reagentes capazes de modificarem os radicais tióis da estrutura enzimática, como p-cloromercuribenzoato, hidroxilamina, p-aminofenol e hidroxiuréia. Como alguns destes inibidores não exercem efeito sobre as GPXs, podem ser utilizados na diferenciação entre APX e GPX.

Em suspensão de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2) expostas a diferentes condições tóxicas ocasionadas por metais de transição, como Cu, Fe, Mn e Zn, há estímulo do aparato enzimático antioxidante, com diferentes graus de resposta em relação à combinação dos metais. A SOD inicialmente demonstra um forte incremento da atividade enzimática quando as células são expostas ao Cu e Mn, entretanto após a exposição ao Zn e Fe ocorre decréscimo. CAT e APX apresentaram aumento das respectivas atividades mediante a exposição ao Cu, entretanto a CAT é afetada após o contato com Mn (BUENO & PIQUERAS, 2002).

Lemna minor L. exposta por um curto período ao Cd, apresentou inibição moderada da APX e GPX, em relação a GR, que foi menos afetada. Entretanto, a CAT demonstrou maior sensibilidade ao metal quando comparada às demais enzimas (RAZINGER et al., 2008). A transformação genética de plantas, segundo SHIGEOKA et al. (2002) pode representar uma estratégia interessante para aumentar a tolerância de plantas a estresses ambientais, em especial as enzimas relacionadas ao ascorbato, como a APX, considerando que níveis endógenos de ascorbato são essenciais para manter a eficiência antioxidant da célula.

2.4. Ácido abscísico (ABA)

2.4.1. Histórico, caracterização e compartmentalização

Assim como os fitohormônios, as plantas possuem compostos capazes de inibir e/ou atuar sobre processos relacionados ao desenvolvimento. Estes compostos são classificados como inibidores naturais de crescimento, e compreendem um grupo amplamente diversificado de substâncias, representadas principalmente por fenóis e terpenos.

Durante vários anos, dedicou-se especial atenção na identificação da natureza destas substâncias e na descrição de suas funções no metabolismo normal das plantas. No início da década de 1950, Thomas Bennett-Clark e Ned Kefford, estudando auxinas endógenas em extratos vegetais, isolaram compostos inibidores de crescimento. As substâncias ácidas, separadas por meio de cromatografia de papel, foram testadas quanto à sua habilidade em promover o crescimento de coleóptilos de aveia. Os experimentos detectaram, entretanto, que o composto provocava a inibição do alongamento do coleóptilo. Estudos seguintes demonstraram a essencialidade do acúmulo destes compostos, nomeados primariamente “complexo β -inibidor”, na indução à dormência em sementes e ramos, e seu decréscimo com o final do período de dormência (KEFELI & KALEVITCH, 2003).

A identificação dos principais componentes do complexo β -inibidor confirmou sua derivação de ácidos fenólicos e outros fenóis mais complexos, como cumarinas, flavonóides e glicosídeos. Verificou-se ainda que a este complexo estavam associadas outras substâncias de natureza terpênica, às quais atribuía-se (equivocadamente) a capacidade em

promover a abscisão em frutos jovens de algodão, denominadas abscisina ou dormina, posteriormente conhecidas como ácido abscísico (ABA).

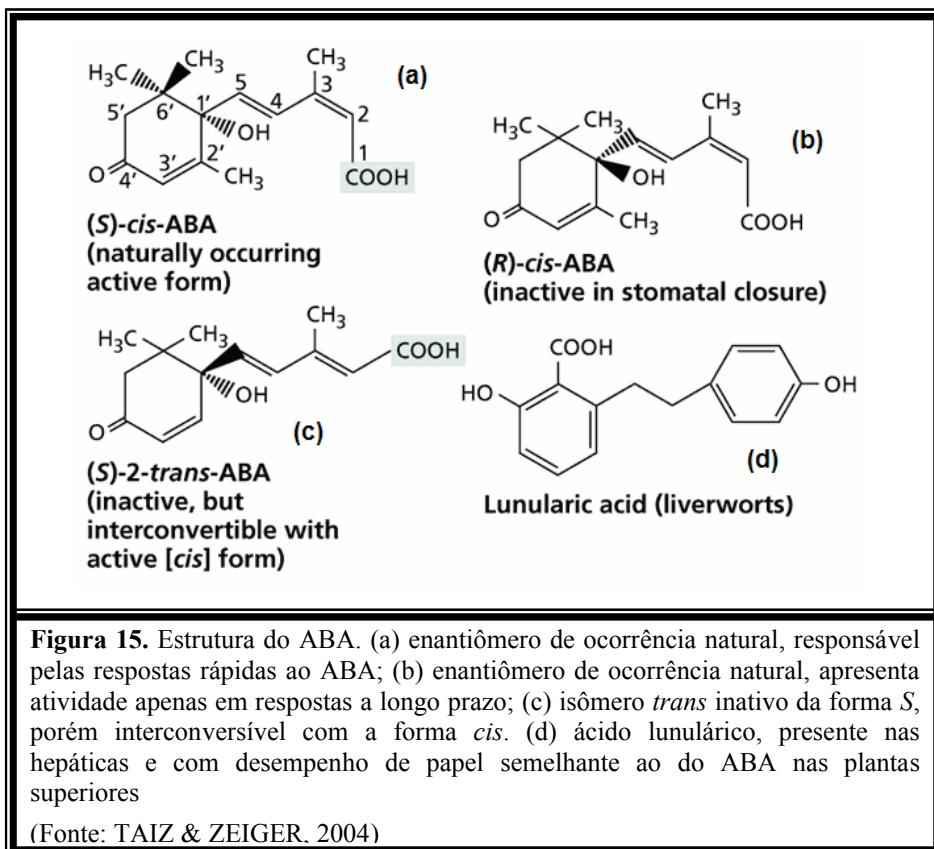
Os inibidores naturais de crescimento, classe na qual se inclui o ABA, não são encontrados somente em órgãos dormentes, mas também nos órgãos em pleno estágio vegetativo, como folhas, caules e raízes. Nos frutos durante o processo de amadurecimento, há acúmulo e alocação destes compostos nas sementes, e seu conteúdo total atinge o máximo na maturação do(a) mesmo(a) (KEFELI & KALEVITCH, 2003).

O ABA é um composto de 15 carbonos, com grande semelhança à porção terminal de algumas moléculas de carotenóides (Figura 15). Possui dois isômeros interconversíveis (*cis* e *trans*), determinados pela orientação do grupo carboxila posicionado no carbono dois. Como a maior parte do ABA encontrado naturalmente no tecido vegetal apresenta-se na forma *cis*, a denominação ácido abscísico refere-se a esse isômero. Em função de seu centro quiral, o ABA também pode apresentar os enantiômeros *S* e *R*, sendo apenas a forma *S* a de ocorrência natural (TAIZ & ZEIGER, 2004). Sua isomerização em condições naturais na planta é consequência da ação da luz sobre os isômeros 2-*trans* (em ambas formas, *S* e *R*).

Verifica-se, em determinados casos, que apenas o enantiômero *S* possui atividade em respostas rápidas ao ABA como o fechamento estomático, ação fisiológica que pode ser detectada em questão de 10 minutos após o tratamento com o mesmo (ALLAN et al., 1994). Entretanto a longo prazo, em processos como mudanças no crescimento, expressão gênica, inibição da secreção de α -amilase e no processo de maturação da semente, ambos os enantiômeros respondemativamente, não caracterizando estereoseletividade (CUMMINS & SONDHEIMER, 1973). Diferentemente à interconversão das formas isoméricas *cis* e *trans*, os enantiômeros *S* e *R* não podem ser interconvertidos no tecido vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2004).

De forma geral, o ABA é encontrado em todas as plantas vasculares, e sua síntese realizada em diversos tecidos, mais especificamente na maioria das células que possuem cloroplastos ou amiloplastos (TAIZ & ZEIGER, 2004). Folhas jovens e ápices de plantas normalmente possuem um conteúdo maior de ABA quando comparadas a folhas maduras. A presença de maiores quantidades em tecidos jovens é consequência de uma série de fatores, como: (a) alta taxa de síntese de ABA em folhas jovens em relação a outras em estádio de desenvolvimento mais avançado; (b) menor relação metabólica em folhas jovens;

(c) translocação ou importação do ABA não assimilado em folhas mais maduras para folhas mais novas; (d) uma combinação dos fatores anteriormente descritos (ZEEVAART, 1977).



Os fitohormônios e inibidores de crescimento recém sintetizados exercem efeitos sobre vários processos de crescimento em doses ínfimas, podendo ser prejudiciais ou até causar toxicidade quando em excesso. Desta forma, as plantas desenvolveram um sistema peculiar de regulação hormonal comparadas a outros organismos, sintetizando pequenas quantidades de fitohormônios e/ou seus antagonistas. WALTON (1969) sugerem o envolvimento do ABA no crescimento e síntese de ácidos nucléicos em eixos embrionários excisados de feijão. Em seu trabalho, a aplicação exógena de ABA na concentração de $1,9 \cdot 10^{-5} M$, ocasionou inibição do crescimento a uma taxa de 30 e 70%, uma e duas horas após o tratamento, respectivamente.

É possível afirmar que a resposta ao ABA é consequência de sua concentração no tecido e da sensibilidade do tecido ao fitohormônio. Além da regulação da síntese, o ABA pode sofrer inativação por oxidação, conjugação e catabolismo através de rotas metabólicas comuns às plantas, que aliadas ao seu transporte e compartimentação pelo organismo vegetal, asseguram um balanço adequado à planta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

2.4.2. Síntese do ABA

Tratando-se de fitohormônios/inibidores de forma geral, a existência de idéias conflitantes no que se refere à sua síntese é questão polêmica. Sugere-se um mecanismo de *feed-back*, onde cada substância é controlada em função da sua síntese, dado o efeito inibitório causado pelo seu acúmulo sobre o centro alostérico da enzima que sintetiza seu precursor (KEFELI & KALEVITCH, 2003).

São propostas duas vias metabólicas para a síntese de ABA, uma chamada “via direta” e a outra, “via indireta”. Na “via direta” de síntese, proposta por HIRAI et al. (2000), o isopentenil difosfato (IPP) que dá origem ao ABA é sintetizado a partir do 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, um composto derivado do gliceraldeído 3-fosfato e do ácido pirúvico.

A produção de ABA conhecida como “via indireta”, aborda sua síntese a partir da clivagem de carotenóides, em função da alta similaridade estrutural que ambos compostos apresentam (Figura 16). Considerando o metabolismo do ABA por esta via, assume-se que igualmente à “via direta”, o precursor inicial é o IPP, porém este tem origem a partir do ácido mevalônico (MVA). Neste caso, três moléculas de acetil-CoA sofrem uma condensação, formando 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), que por sua vez sofre redução em uma reação catalisada pela 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), formando MVA. O MVA é então submetido a duas fosforilações pela enzima ácido mevalônico quinase (MVA quinase), e em seguida uma descarboxilação pela ação da enzima ácido mevalônico 5-difosfato descarboxilase (MVAPP descarboxilase), formando IPP. Após sofrer isomerização enzimática e uma série de carboxilações pela via biossintética dos terpenóides, o IPP é convertido a um tetraterpeno conhecido como β -caroteno, o produto inicial da síntese do ABA (BUCHANAN et al., 2000).

Como passo primordial da síntese de ABA em plantas, pela via dos carotenóides, pode-se assumir a clivagem oxidativa do 9'-cis-neoxantina, um composto de 40 carbonos oriundo do β -caroteno; a reação é catalisada pela 9-cis-epoxicarotenóide-dioxigenase (NCED), considerada enzima chave no metabolismo do ABA, dando origem ao xantoxal (um composto com 15 carbonos), e outra molécula de 25 carbonos. O resíduo 4'-hidroxil do xantoxal é então oxidado a uma cetona via reação catalisada por uma enzima NAD-dependente, sofrendo posterior desaturação não enzimática e originando ABA-aldeído. No final da reação, o ABA-aldeído, ainda composto por 15 carbonos, é oxidado a ABA (ZEEVAART et al., 2003).

Apesar dos resultados de estudos realizados com carbono marcado não serem muito conclusivos a respeito da síntese de ABA pela via dos carotenóides, esta é a rota metabólica mais aceita para as plantas. As etapas de síntese de ABA pela “via indireta” ou via dos carotenóides são atualmente conhecidas graças ao emprego de mutantes ABA-deficientes, que possuem bloqueio em algum passo específico da rota biossintética, apresentando evidências irrefutáveis da utilização desta via pelas plantas na produção de ABA (TAIZ & ZEIGER, 2004).

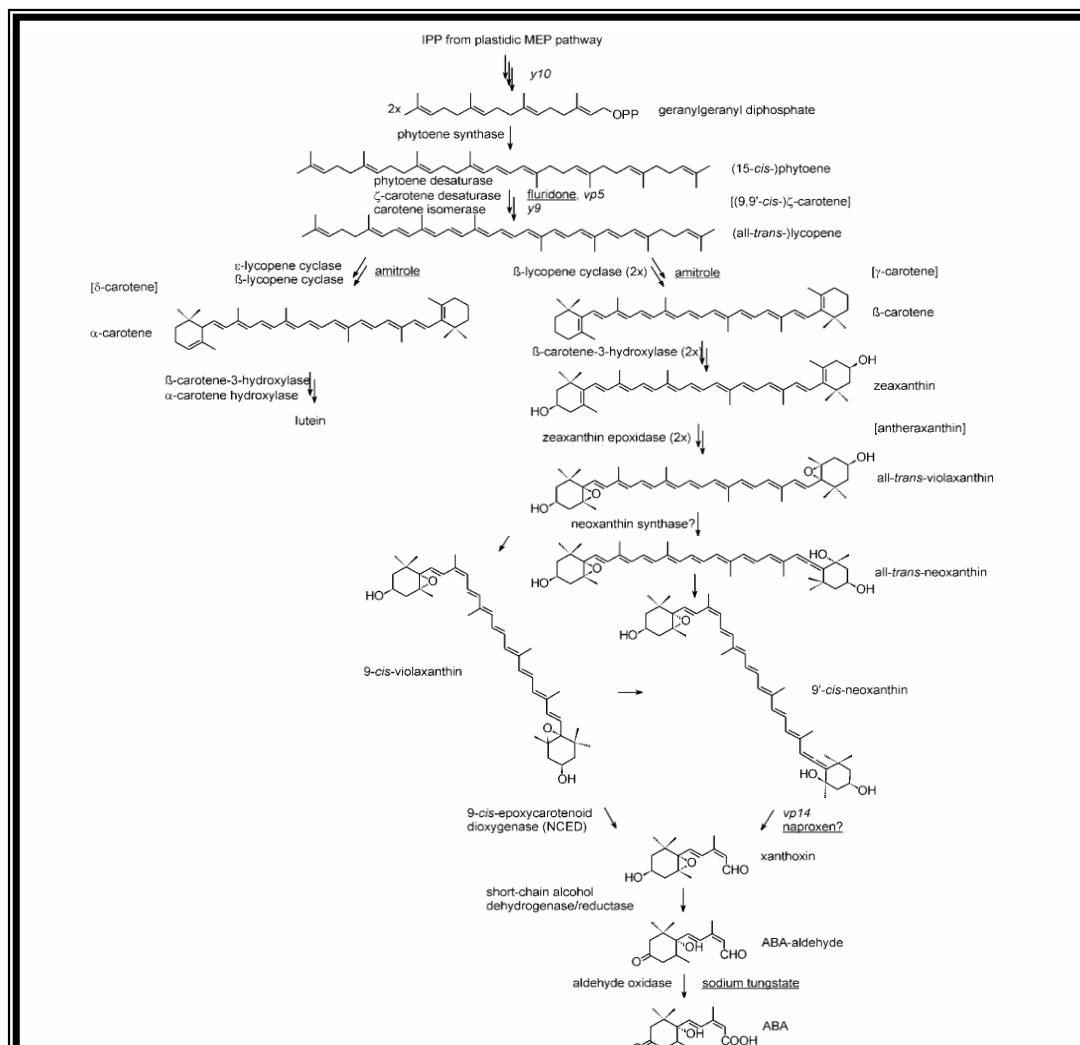


Figura 16. Rota biossintética de carotenóides e ácido abscísico em milho. Mutantes-carotenóide de milho (ítalo) e inibidores (sublinhado) em diferentes “passos” da via de síntese. IPP, isopentenil difosfato; MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-P.

(Fonte: BOWMEESTER et al., 2005)

2.4.3. ABA e estresse em plantas

Atualmente, o ABA é considerado pela própria importância em relação às funções que desempenha nos vegetais, relatando-se principalmente sua influência no processo de maturação e dormência, além da inibição do crescimento e a abertura estomática, em especial quando a planta encontra-se sob estresse ambiental (TAIZ & ZEIGER, 2004). GRILL & CHRISTMANN (2007) relatam que o ABA atua como um sinalizador específico durante o desenvolvimento da planta em resposta a estresses ambientais como o frio, a seca e altas concentrações de sais no solo. Como resposta fisiológica, ele estimula o fechamento estomático para reduzir a transpiração, ajustando o metabolismo e conferindo tolerância às adversidades.

ZABADAL (1973), trabalhando com *Ambrosia artemisiifolia* L. e *Ambrosia trifida* L., verificou que ambas as espécies apresentam aumento da quantidade de ABA nos tecidos foliares após sofrerem estresse hídrico, sugerindo que potenciais críticos de água induzem a síntese de ABA. Como consequência do aumento dos níveis de ABA, ocorre o fechamento estomático, e redução da perda de água através da transpiração. A atuação do ABA nas plantas pode ser descrita como a de um antitranspirante endógeno capaz de reduzir a perda de água pelos estômatos localizados na epiderme foliar. O aumento da biossíntese de ABA ocorre em resposta à deficiência hídrica, causando uma redistribuição intracelular e acúmulo de ABA nas células-guarda (WANG & SONG, 2008).

Sob condições de estresse oxidativo, a produção e acúmulo de H_2O_2 nos tecidos vegetais atua como sinalização para o mecanismo de fechamento estomático mediado pelo ABA. A enzima Cu amino-oxidase é produtora desta classe de ROS, e a ela é atribuída grande importância na mediação do fechamento estomático via síntese de H_2O_2 em plantas de *Vicia faba* (ZHANG et al., 2008). Em determinadas espécies, como *Arabidopsis*, a dormência das sementes em condições ambientais impróprias, como elevadas temperaturas, é um fator crucial para que a planta possa estabelecer seu crescimento e desenvolvimento vegetativo e reprodutivo na estação climática adequada. Quando suas sementes são expostas a elevadas temperaturas, mesmo que embebidas, há um estímulo à produção de ABA, que atua na manutenção da dormência destes tecidos (KAWAKAMI et al., 2008).

LI et al. (2007), testaram concentrações crescentes de Mn em *Populus cathayana* cultivada em sistema hidropônico, com intuito de caracterizar as bases fisiológicas e bioquímicas da resistência ao Mn em plantas lenhosas. Para avaliar a influência dos fatores

genéticos sobre o nível de tolerância, foram utilizadas populações contrastantes, uma de região úmida e outra de região seca da China. Os resultados demonstraram que os padrões fisiológicos e parâmetros de crescimento como teores de pigmentos, estatura de planta, diâmetro basal, acúmulo de biomassa e área foliar total apresentaram decréscimo em ambas as populações. Os autores observaram que há diferença entre os padrões de assimilação de Mn, visto que a população de ambiente úmido absorve maiores taxas e as acumula em maior quantidade nas folhas, acarretando maiores decréscimos nos parâmetros listados em relação a população de clima seco. As populações de *Populus cathayana* também diferiram em relação ao acúmulo de ABA. Na presença do metal, ambas as populações apresentaram aumento do acúmulo de ABA, entretanto, a população proveniente de ambiente úmido apresentou acúmulo de teores significativamente inferiores de ABA em relação a outra.

NAYYAR & GUPTA (2005), comparando o comportamento de plantas C3 e C4 quando submetidas ao estresse hídrico, utilizaram trigo (*Triticum aestivum*) e milho (*Zea mays*) como modelo para avaliar cada grupo de plantas, respectivamente. Sob leve estresse hídrico, os níveis de ABA permaneceram inalterados tanto nas plantas do grupo C3 quanto do grupo C4. Com aumento da deficiência hídrica, houve uma resposta diferencial entre os grupos: as plantas de trigo sofreram maiores danos quando comparadas as plantas de milho. A maior tolerância a seca em plantas de milho foi acompanhada de níveis mais elevados de ABA tanto nas raízes quanto nas folhas, quando comparados aos níveis de ABA presentes no trigo.

2.4.4. Utilização de mutantes em estudos envolvendo ABA

Existem grandes lacunas na compreensão de aspectos relacionando os hormônios, o genoma da planta e as inter-relações de ambos. Pouco se conhece por exemplo, a respeito do controle hormonal e sua respectiva expressão gênica, o controle genético da biosíntese de hormônios, ou ainda no que se refere às alterações hormonais em mutantes, transformantes e haplóides sobre mudanças no desenvolvimento (KEFELI & KALEVITCH, 2003).

A utilização de ferramentas como a mutagênese representa importante papel na compreensão dos processos metabólicos que envolvem a regulação hormonal em plantas. Muitas propriedades do crescimento e desenvolvimento envolvem mecanismos de controle

específicos, e os fitohormônios representam alguns destes mecanismos, desempenhando um papel vital. Tais aspectos podem ser constatados pelo reflexo de variações genéticas e hormonais sobre o desenvolvimento, morfologia, anatomia, características fisiológicas relacionadas à taxa de crescimento, período de floração, dormência, dentre inúmeros outros processos.

Mutantes apresentam grande relevância em estudos genéticos e fitofisiológicos, especialmente àqueles relacionados a regulação hormonal do crescimento das plantas, visto que muitas destas substâncias são sintetizadas e exercem atividade nos cloroplastos. Plantas de *Medicago truncatula* necessitam da expressão normal do gene *LATD* para o desenvolvimento normal dos meristemas radicular primário, secundário e nodular fixador de N. Em plantas *latd*-mutantes, há uma supressão do crescimento da raiz primária resultando na desorganização celular e perda de parte da sua funcionalidade. As raízes laterais, por sua vez, são mais severamente afetadas, visto que sua desorganização celular é percebida logo no momento da emergência da raiz primária. Apesar de possuírem níveis de ABA semelhantes às plantas normais, *latd*-mutantes não respondem adequadamente ao ABA endógeno. A aplicação de ABA exógeno é capaz de reverter os efeitos da desorganização celular em plantas *latd*-mutantes, entretanto não é capaz de recuperar os nódulos defeituosos. Estas observações indicam que *latd*-mutantes são deficientes na resposta ao ABA (HARRIS et al. 2007).

Desta forma, é possível afirmar que o crescimento e desenvolvimento normais requerem, de maneira ordenada, a ativação de genes em tecidos específicos. Estes processos envolvem expressão gênica seletiva e a atividade específica de grupos gênicos, influenciando na regulação de enzimas, incluindo aquelas relacionadas ao balanço hormonal (KEFELI & KALEVITCH, 2003). À exemplo da expressão gênica constitutiva de *AhNCED1*, oriundo de plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L. cv. YueYou 7), em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, resultando no aumento e acúmulo de ABA em resposta ao estresse hídrico. Este gene está atrelado a 9'-cis-epoxicarotenóide dioxygenase, enzima responsável pela clivagem oxidativa do tetraterpeno precursor do ABA (LI & WAN, 2006).

SHINOZAKI et al. (2000) isolaram, de plantas de *Vigna unguiculata* sob condições de estresse hídrico, genes expressos em condições de desidratação celular. Um dos cDNAs clonado evidencia grande homologia com o gene 9'-cis-epoxicarotenóide dioxygenase (*VuNCED1*). Posteriormente comprovaram que *VuNCED1* codifica para 9'-cis-

epoxicarotenóide dioxigenase, relacionando sua expressão a síntese do ABA em condições de estresse hídrico.

A própria via biossintética do ABA, conforme já mencionado, foi elucidada em grande parte com auxílio de mutantes ABA-deficientes em etapas específicas. O mutante de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Notabilis* (*not*) é deficiente em ABA. Este genótipo apresenta um defeito em um dos passos chave da biossíntese de ácido abscísico: a clivagem oxidativa do composto 9'-cis-neoxantina. Visualmente, apresenta epinastia foliar, crescimento retardado e de forma mais marcante, um fenótipo de baixo turgor dos tecidos foliares, com aparência murcha, devido a elevada taxa de perda de água, que representa mais do dobro em relação ao seu respectivo controle. Mutantes ABA-deficiente normalmente são plantas menores e exibem folhas de tamanho reduzido quando comparadas as do controle (SHARP et al., 2000).

2.4.5. Tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ABA-mutantes

Oriundo de uma mutação por deleção de um par de bases A/T no gene *LeNCED1*, que codifica para a enzima 9'-cis-epoxicarotenóide dioxigenase, *Notabilis* (*not*) foi obtido inicialmente pelo tratamento com raios-X (TAL, 1966). Como a mutação sofrida trata-se de uma deleção de um par de bases, há uma alteração drástica da seqüência de aminoácidos após o ponto mutado, gerando inclusive um códon de terminação prematuro. Na caracterização do alelo mutante *not*, observa-se que o mesmo codifica para uma proteína de estrutura diferente, que conduz a perda total da capacidade enzimática (BURBIDGE et al., 1999).

Inicialmente verificou-se que *not* é capaz de metabolizar o intermediário imediato do ABA, um composto de 15 carbonos (C₁₅). Análises subseqüentes indicaram anormalidades nas concentrações foliares de xantofila em mutantes *not* homozigotos. Segundo estas evidências, havia grande probabilidade da lesão genética deste mutante estar localizada na etapa referente a clivagem oxidativa dos tetraterpenos à compostos intermediários C₁₅ (TAIZ & ZEIGER, 2004).

THOMPSON et al. (2004) seqüenciaram e analisaram 19 kb de um genoma clonado contendo *LeNCED1* e 5.4 kb do seu promotor. Este clone foi transferido para *not* homozigoto e várias plantas transformadas sem aparência murcha foram obtidas, originando

Notabilis complemented (*not_{comp}*). Destas plantas, duas linhagens foram conduzidas e avaliadas sob diversos aspectos bioquímicos e fisiológicos, como o conteúdo basal de ABA, relações hídricas, crescimento e desenvolvimento foliar e radicular, formação de raízes adventícias, evolução da taxa de etileno e capacidade de acúmulo de ABA sob condições de estresse hídrico. Para uma das linhagens, denominada *not_{comp.1}*, os autores apenas verificaram uma complementação parcial para a maioria dos parâmetros avaliados, enquanto a outra linhagem, *not_{comp.13}*, apresentou complementação total para todos parâmetros avaliados, em todas plantas, tanto sob estresse por déficit hídrico, quanto por encharcamento.

Com o sucesso da complementação na planta transgênica de tomateiro, há fortes indícios de que *LeNCEDI* é o alelo selvagem do gene mutante *not*. Através de ferramentas como essa, é possível realizar estudos mais refinados das etapas da rota biossintética do ABA, contribuindo na elucidação dos mecanismos de tolerância (THOMPSON et al., 2004).

A informação a respeito da contribuição do ABA na superação de estresses de diferentes naturezas, como déficit hídrico, restrições ao sistema radicular e ao frio são amplamente descritas na literatura. Entretanto, informações relacionando o papel desempenhado pelo ABA na superação de estresse causado pela exposição de plantas a metais pesados é restrita a poucas espécies e a um grau ainda menor de elementos químicos. Os precedentes e a falta de informações justificam estudos que relacionem mecanismos de defesa vegetais aos metais pesados, em especial ao Cd, tendo em vista sua elevada toxicidade nos organismos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição e Metabolismo Vegetal, e na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), ambos pertencentes ao Departamento de Biologia – Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa/MG.

3.1. Material biológico

Sementes de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, do mutante *Notabilis* e do transformado *Notabilis complemented*, gentilmente cedidas pelo “*Department of Plant Genetics and Biotechnology – Horticulture Research International/UK*” foram propagadas e o material resultante semeado em meio de cultivo suplementado com CdCl₂, com a finalidade de testar o efeito deste elemento.

3.1.1. Propagação das sementes

As sementes anteriormente descritas foram semeadas em copos plásticos perfurados de volume igual a 200 mL, contendo o substrato comercial PlantMax®; na proporção de três sementes por copo, e a umidade mantida com lâmina d’água no recipiente que comportou os copos (Figura 17). Os recipientes foram acomodados sob tela de sombreamento Sombrite®, malha 70%, no interior de casa de vegetação de vidro, telada nas laterais, nas dependências da UCP.

Aproximadamente 36 dias após a semeadura, ao atingir o ponto de transplante (determinado pela completa expansão da quarta folha definitiva), as plântulas foram separadas e transplantadas individualmente para vasos de volume de três litros contendo areia lavada como substrato. Os vasos foram mantidos por duas semanas no interior da casa de vegetação sem proteção contra a radiação solar para aclimatar as plantas às condições de luminosidade. Posteriormente, foram transferidos para bancada externa, a pleno sol, onde permaneceram até a obtenção das sementes. Conforme o avanço do seu desenvolvimento, as plantas foram tutoradas com estacas de madeira e cordão de algodão (Figura 18).



Figura 17. Semeio e obtenção de mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Ailsa Craig, mutante *Notabilis* e transformado *Notabilis Complemented*.

Figura 18. Cultivo de tomateiros para obtenção de sementes. Foram cultivadas nove plantas de cada genótipo, uma em cada vaso. Os vasos foram dispostos em bancada externa.

O suprimento das necessidades nutricionais das plantas a partir do momento do transplante, consistiu do fornecimento de 150 mL de solução nutritiva de Hoagland (MARENCO & LOPES, 2005), com metade da concentração dos sais, em intervalos de dois dias. Regas adicionais foram realizadas com água para manter o turgor das plantas, a fim de evitar possível deficiência hídrica.

A primeira coleta de frutos maduros e obtenção das sementes ocorreu próxima ao 84º dia após a semeadura. As sementes foram extraídas juntamente com a mucilagem e transferidas para frascos de *Erlemeyer*, completando-se o volume para 200 mL com água destilada. O material permaneceu fermentando durante um período de 72 horas, para eliminação da mucilagem (CAVARIANI et al., 1994).

Finalizado o período de fermentação, procedeu-se a lavagem do material em água corrente até completa eliminação de resíduos de polpa e mucilagem. Em seguida, as sementes lavadas foram dispersas em papel toalha, onde permaneceram até secagem integral. Limpo e seco, o material foi armazenado em recipientes plásticos devidamente identificados até sua utilização.

3.1.2. Obtenção das plântulas por cultivo *in vitro*

As plântulas foram obtidas a partir de sementes propagadas conforme descrito anteriormente. Os processos de germinação e cultivo foram realizados em frascos de vidro transparentes, contendo 50 mL de meio nutritivo estéril suplementado ou não com Cd, de acordo com o tratamento aplicado. Não considerou-se necessário realizar a transferência das

plântulas após a germinação, visto que o processo não promove alteração significativa na composição do meio.

Inicialmente, procedeu-se a desinfestação da superfície das sementes de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, do mutante *Notabilis* e do mutante transformado *Notabilis Complemented*, por sua imersão em álcool etílico na concentração de 70% (v/v), durante um minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2% de cloro ativo, por um período de 15 minutos (NOGUEIRA et al., 2001). Imediatamente após a retirada do hipoclorito de sódio, as sementes foram lavadas em água deionizada e autoclavada, repetindo-se o processo cinco vezes, para remover eventuais resíduos do hipoclorito. Os procedimentos de lavagem e enxágue com água destilada e autoclavada foram realizados no interior de câmara de fluxo laminar.

O cultivo *in vitro* foi realizado em meio nutritivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), na metade da concentração dos sais, suplementado com o complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 3% (p/v) de sacarose e 0,3% (p/v) de Gel Rite® utilizado como solidificante. O pH do meio nutritivo foi ajustado para $5,8 \pm 0,2$.

Para os tratamentos com Cd, foi adicionado CdCl₂ ao meio de cultivo, de forma a se obter a concentração final de 50µM de CdCl₂.

A semeadura foi realizada em câmara de fluxo laminar, na proporção de quatro sementes por frasco. Posteriormente os recipientes de cultivo foram acondicionados em ambiente completamente escuro para obter maior uniformidade na germinação das sementes (CAMPOS & TILLMANN, 1997). Após a emergência das plântulas, as culturas foram expostas à irradiância gerada por quatro lâmpadas fluorescentes de 20 W e fotoperíodo de 16 horas. A temperatura da sala de cultura foi mantida em $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2. Avaliações

3.2.1. Crescimento

O crescimento e desenvolvimento das plântulas, foram avaliados por: (1) Taxa de germinação das sementes, com a finalidade de verificar sua viabilidade e a homogeneidade das amostras. A avaliação consistiu de simples contagem das sementes germinadas. (2) Acúmulo de massa fresca total, a partir da soma das massas frescas da parte aérea e do sistema radicular. O material foi fracionado em duas porções: parte aérea e sistema radicular, e pesado em balança analítica de precisão logo após o fracionamento.

Os valores foram expressos em porcentagem (%) de sementes viáveis germinadas (1), e gramas de massa fresca total (MFt), da parte aérea (Mfa) e do sistema radicular (MFr) (2).

3.2.2. Determinação de pigmentos

Os pigmentos foram extraídos segundo HISCOX & ISRAELSTAM (1978), com adaptações (WELLBURN, 1994). Aproximadamente 0,01 g de tecido fresco de parte aérea foi pesado e transferido em seguida para *eppendorfs* de 2 mL, contendo duas pérolas de vidro e 300 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com CaCO_3 . Procedeu-se então a maceração mecânica imediata durante 15 segundos em *Mini-Bead Beater*, obtendo completa desintegração do tecido vegetal e homogeneidade entre as amostras, todas processadas a um mesmo intervalo.

Em seguida, foi acrescido ao *eppendorf* o volume de 1100 μ L de DMSO saturado com CaCO_3 . O material foi homogeneizado e transferido para o escuro, em banho-maria a 65°C por um período de 30 minutos.

Com auxílio de uma micropipeta (GILSON® P100), transferiu-se 300 μ L do sobrenadante às placas de ELISA, realizando quatro replicatas de cada amostra e procedendo a leitura das densidades ópticas de 665, 649 e 480 nm. A determinação do teor de pigmentos realizada de acordo com WELLBURN (1994), a partir das seguintes equações:

- $Clorofila-a\ Ca = 12.47A_{665.1} - 3.62A_{649.1}$
- $Clorofila-b\ Cb = 25.06A_{649.1} - 6.5A_{665.1}$
- $Clorofila\ total-a+b\ Ca+b = 7.15A_{665.1} + 18.71A_{649.1}$
- $Carotenóides\ totais\ Cx+c = (1000A_{480} - 1.29Ca - 53.78Cb)/220$

Os teores de pigmentos foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ MF.

3.2.3. Obtenção do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático bruto para a determinação das atividades da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) foi obtido pela homogeneização de aproximadamente 0,05 g de parte aérea das plântulas em nitrogênio líquido, seguida pela adição de 2 mL de meio de extração e de centrifugação a 12.000 x g, por 15 minutos, à temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram executadas à temperatura de 4°C , em câmara fria. Aliquotas de 500 μL de cada amostra foram transferidas para *eppendorfs* de 1,5 mL e armazenados a -20°C até a realização dos ensaios.

O meio de extração consistiu de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 M, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 M e polivinilpirrolidona (PVP) 1 % (p/v) (PEIXOTO *et al.*, 1999).

3.2.4. Determinação de proteínas

O método de BRADFORD (1976) foi utilizado para as determinações da concentração de proteínas totais, utilizando como padrão soro-albumina bovina (BSA).

Na curva padrão foram utilizados 1000 μL do reagente de Bradford, concentrações crescentes de BSA 0,1% (v/v), no intervalo de zero a 16 μL , e o volume ajustado com H_2O deionizada para 1200 μL . Após agitação, 300 μL do produto resultante da reação foram transferidos para placa de ELISA, realizando a leitura da densidade óptica de 595 nm.

Para determinação de proteínas das amostras, utilizaram-se alíquotas de 1000 μL do reagente de Bradford, 170 μL de H_2O deionizada e 30 μL de extrato enzimático bruto, totalizando 1200 μL de volume total de reação. Os reagentes e amostras foram pipetados com auxílio de micropipetas para micro-tubos de *eppendorf* de 2 mL, e imediatamente agitados em vórtex. Utilizou-se três repetições para cada amostra. Após agitação, conforme procedeu-se com a curva padrão, 300 μL do produto resultante da reação foram transferidos para placa de ELISA, realizando a leitura da densidade óptica de 595 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g g MF}^{-1}$.

O método de Bradford utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250, e é baseado na interação entre o corante e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm, densidade óptica de leitura (ZAIÀ et al., 1998).

3.2.5. Atividade de enzimas antioxidantes

A determinação da atividade das enzimas antioxidantes foi ajustada para o intervalo de tempo e quantidade de extrato na faixa linear de atividade para cada enzima.

3.2.5.1. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 150 μL do extrato enzimático bruto a 3 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM . A reação foi conduzida em câmara de reação a 25°C, sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT medida pela absorbância a 560 nm. A absorbância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977).

Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

3.2.5.2. Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 50 μ L de extrato enzimático bruto do genótipo *Ailsa Craig* e 200 μ L de extrato para as linhagens *Notabilis* e *Notabilis Complemented* ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM em volume final de 3,0 mL (HAVIR & MCHALE, 1987). O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto e meio de reação em intervalos de dez segundos, foi medido a 240 nm, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (ANDERSON *et al.*, 1995) e expressa em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF.

3.2.5.3. Determinação da atividade das peroxidases totais (POX)

A atividade das peroxidases foi determinada pela adição de 100 μ L do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM (KAR & MISHRA, 1976).

A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorbância a 420 nm em intervalos de dez segundos durante o primeiro minuto e meio de reação, a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (CHANCE & MAEHLEY, 1955) e expressa em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF.

3.2.6. Determinação da peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos foi avaliada por meio da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente malonaldeído (MDA) baseado no trabalho de CAKMAK & HORST (1991).

Amostras congeladas de aproximadamente 0,1 g foram homogeneizadas com N₂ durante 15 segundos em *Mini-Bead Beater*. Posteriormente foram adicionados 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 15.000 x g, durante 10 minutos, sendo 0,5 mL do sobrenadante transferido para micro tubo de *eppendorf* de 2 mL. Ao sobrenadante foram acrescentados mais 1,5 mL de TBA 0,5% em TCA 20%. O meio foi incubado em banho-maria sob agitação a 90°C por 20 minutos. A reação foi paralisada colocando-se os micro tubos de *eppendorf* em banho-de-gelo. Após o resfriamento, realizou-se a centrifugação a 10.000 x g durante cinco minutos a 4°C, com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento. As leituras dos sobrenadantes foram realizadas em espectrofotômetro a 532 nm. O valor da absorbância inespecífica a 600 nm foi subtraído. A quantidade do complexo MDA-TBA foi expressa em $\mu\text{mol MDA } \mu\text{g}^{-1}$ proteína.

3.3. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental contou com completa casualização das unidades experimentais em esquema fatorial 3x2: três genótipos (*Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) e duas concentrações de CdCl₂ (zero e 50 μM), com quatro repetições. A unidade experimental consistiu em um frasco com quatro plântulas. O experimento foi conduzido durante 42 dias, compreendendo 35 dias de cultivo após a emergência e sete dias entre a semeadura e a emergência das plântulas.

Aos dados obtidos foi realizada análise de variância e em caso significativo procedeu-se o teste de médias por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade com o *software* estatístico ASSISTAT 7.5 (SILVA & AZEVEDO, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento

4.1.1. Germinação

A taxa de germinação das sementes não apresentou diferença entre genótipos, nem entre tratamentos. As sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) dos genótipos *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis* apresentaram viabilidade de 100%, mesmo quando dispostas em meio nutriente MS½ suplementado com 50 μM de CdCl₂. Sob as condições de realização do ensaio, a dose de Cd testada não influenciou na uniformidade da germinação de sementes de tomate dos genótipos *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*. Estes resultados estão de acordo com o trabalho realizado por SAWHNEY & CHUGH (1996), em que doses de Cd de até 1mM não interferem na germinação de sementes de ervilha (*Pisum sativum* cv. Bonneville), mesmo que possam causar algum “transtorno” metabólico.

4.1.2. Massa fresca total (MFt), massa fresca da parte aérea (Mfa) e massa fresca do sistema radicular (MFr)

O acúmulo de massa fresca total (MFt) das plântulas, não teve diferença significativa entre os controles de *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*. Igualmente, *Ailsa Craig* e *Notabilis Complemented* não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na MFt em relação aos respectivos tratamentos com CdCl₂. Entretanto, *Notabilis* sofreu redução significativa de sua MFt quando as plântulas cresceram em concentrações de 50 μM de CdCl₂ (Tabela 1). Esta redução representou aproximadamente 35% da MFt em relação às plântulas crescidas na ausência do metal (Figura 19).

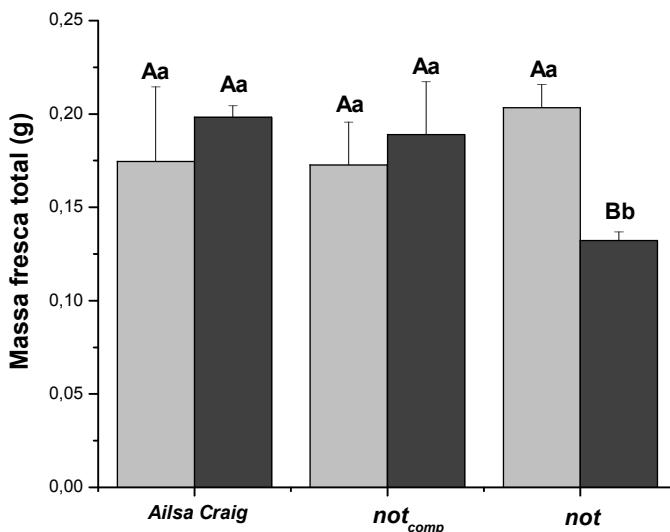


Figura 19. Acúmulo de massa fresca total (MFT) em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Ailsa Craig (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de CdCl₂ (■) e 50 μM de CdCl₂ (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 20, a massa fresca de raiz (MFr) não apresentou diferença entre tratamentos, nem entre genótipos (Tabela 2 e Figura 20). O crescimento pode ser afetado de diferentes maneiras pela exposição ao Cd, entretanto o acúmulo de massa seca em raízes de plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.) apenas é afetado quando a dose de Cd é elevada a concentrações de 50 μM de Cd (SANDALIO et al., 2001).

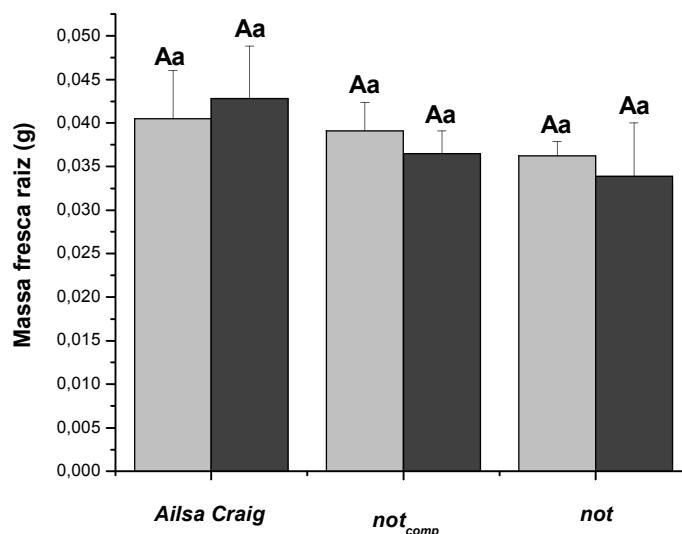


Figura 20. Acúmulo de massa fresca de raiz (MFr) em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Ailsa Craig (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de CdCl₂ (■) e 50 μM de CdCl₂ (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A massa fresca da parte aérea (MFa) segue o mesmo padrão dos dados de MFt. Não houveram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias de MFa para diferentes tratamentos nos genótipos *Ailsa Craig* e *Notabilis complemented*, tanto em relação aos seus respectivos controles, quanto em um comparativo entre ambos, ao contrário de *Notabilis*, que apresentou redução significativa da MFa no tratamento com $50\mu\text{M}$ de CdCl_2 em relação ao próprio controle (Tabela 3 e Figura 21).

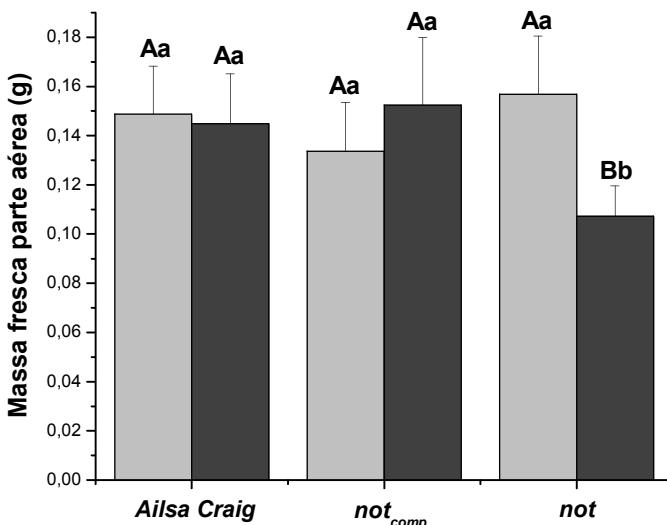


Figura 21. Acúmulo de massa fresca da parte aérea (MFa) em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig* (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de CdCl_2 (■) e 50 μM de CdCl_2 (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com base nas informações anteriores, é possível relacionar a maior redução de MFt com a redução sofrida nos tecidos fotossintetizantes de plantas *not*-mutantes expostas à dose de 50 μM de CdCl_2 . A exposição de plantas ao Cd, mesmo em baixas concentrações, acarreta em decréscimo gradual na massa seca dos tecidos foliares e radiculares, sendo o efeito incrementado a medida que aumenta a concentração do metal, adquirindo maior importância e gravidade (POPOVA et al., 2008).

4.2. Pigmentos: clorofila-a (Ca), clorofila-b (Cb), clorofilas totais (Ca+b) e carotenóides (Cx+c)

Todos os genótipos sofreram redução significativa no teor de Ca pela exposição a 50 μM de CdCl_2 (Tabela 4). As razões de redução foram de aproximadamente 33% para *Ailsa Craig* e 31% para *Notabilis complemented*, em relação aos seus respectivos controles. *Notabilis* exibiu apenas 14% de redução no teor de Ca quando comparado ao seu controle (Figura 22). Em *Brassica juncea* L., os conteúdos de pigmentos fotossintéticos apresentam drástico decréscimo após a exposição a 160 μM de Cd, em média 50% em relação ao controle (MISHRA et al., 2007), coincidindo com o estudo realizado. Ainda em *Brassica juncea* L. o conteúdo total de clorofila é rapidamente afetado, com consequente redução pela presença do Cd (MOBIN & KHAN, 2006).

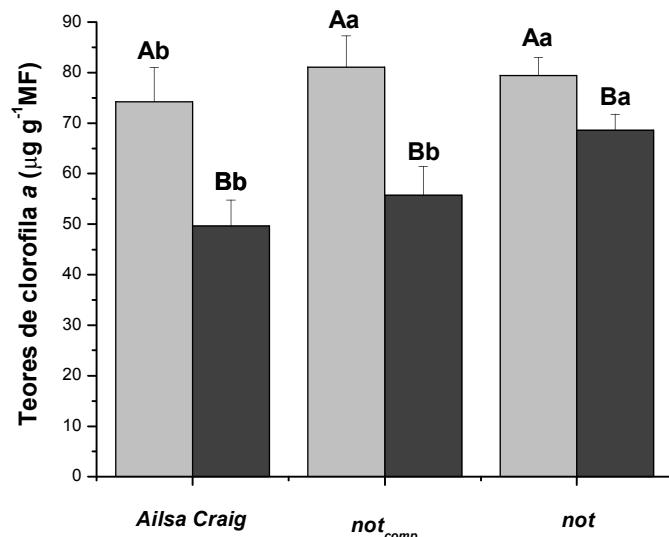


Figura 22. Teores de clorofila a em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig* (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de CdCl_2 (■) e 50 μM de CdCl_2 (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A degradação de clorofila, quando plantas de *Bechmeria nivea* (L.) GAUD são expostas ao Cd por períodos prolongados de tempo e/ou a altas concentrações, sugerem o envolvimento do Cd na geração de estresse oxidativo (LIU et al., 2007). *Arabidopsis thaliana* também é afetada após contato com CdCl_2 na concentração de 0,5 mM, por um período de cinco dias, sendo possível verificar redução significativa no conteúdo de clorofila, aliada ao aumento da peroxidação lipídica (BENAVIDES et al., 2007).

Houve decréscimo considerável no teor de *Cb* em *Ailsa Craig* e *Notabilis complemented*, sendo que esta redução teve maior severidade em *Notabilis complemented*, onde a inibição/degradação atingiu níveis superiores a 50%, comparado aos 31% atingidos pelo genótipo *Ailsa Craig*. No entanto o mutante *not* foi insensível a concentração de 50 μM de CdCl_2 no que diz respeito ao teor de *Cb*, visto não ter sido processada alteração das quantidades no mutante, sob as condições de realização do presente ensaio (Tabela 5 e Figura 23).

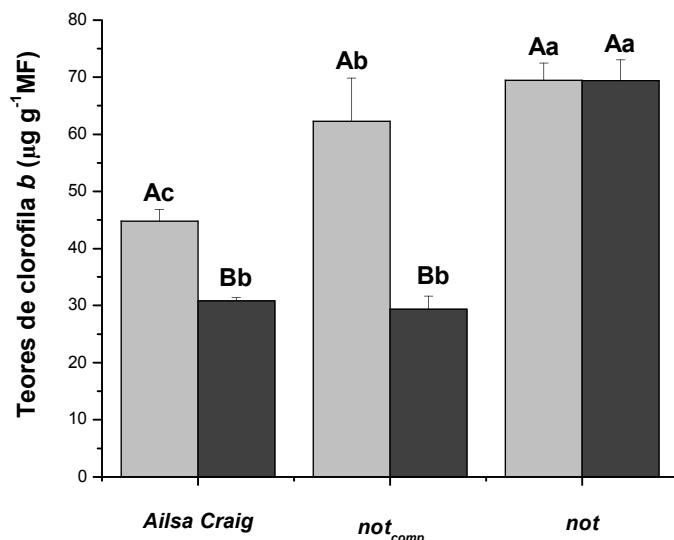


Figura 23. Teores de clorofila *b* em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig* (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de CdCl_2 (■) e 50 μM de CdCl_2 (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Plantas de ginseng (*Withania somnifera* L. Dunal) cultivadas *in vitro* e submetidas a doses crescentes de Cu indicam alteração no teor de pigmentos, tanto para *Ca* quanto para *Cb*, sendo que a taxa de redução no teor de pigmentos se intensifica com o aumento da concentração de Cu, causando decréscimos significativos a partir da dose de 25 μM (ALI et al., 2008).

Seguindo a tendência de *Ca* e *Cb*, os teores de clorofila total em plântulas de tomate submetidas a 50 μM de CdCl_2 , independente do genótipo testado, sofreram redução significativa (Tabela 6). *Notabilis complemented* reduziu aproximadamente 43% do seu conteúdo total de pigmentos, seguida de *Ailsa Craig*, com redução aproximada de 37% em relação ao controle. *Notabilis* também apresentou redução no teor de *Ca+b*, embora seja

modesta comparada aos demais genótipos, não excedendo 8% em relação ao controle (Figura 24).

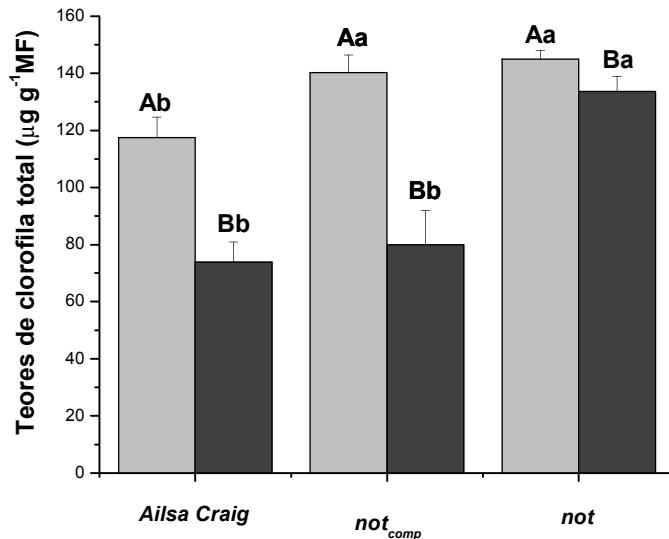


Figura 24. Teores de clorofila total (Ca+b) em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Ailsa Craig (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de CdCl₂ (■) e 50 μM de CdCl₂ (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No presente estudo houveram diferentes respostas na relação Ca/Cb, específicas dos genótipos tratados com CdCl₂. Em plantas submetidas a 50 μM de CdCl₂, o conteúdo de Ca foi proporcionalmente mais reduzido que Cb nos genótipos *Ailsa Craig* e *Notabilis*, ao contrário, o genótipo *Notabilis complemented* o teor de Cb foi claramente menor que o de Ca (Tabela 7).

Tabela 7. Clorofilas a e b e relação Ca/Cb para diferentes genótipos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill), expostos ou não a 50 μM de CdCl₂

Genótipo	CdCl ₂ μM	CLOROFILA (μg g ⁻¹ MF)		
		Ca	Cb	Ca/Cb
<i>Ailsa Craig</i>	0	74,1975 aA	44,7925 aB	1,66a
	50	49,6300 bA	30,8600 bB	1,61b
<i>not_{comp}</i>	0	81,0675 aA	62,2675 aB	1,30b
	50	55,6675 bA	29,3500 bB	1,90a
<i>Not</i>	0	79,4475 aA	69,4525 aB	1,14a
	50	68,5600 bA	69,4025 aA	0,99b

*Médias seguidas de mesmas letras, maiúsculas na linha, e minúsculas na coluna, dentro de cada genótipo, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A redução no teor de pigmentos fotossintéticos sob condições de estresse é resposta freqüente das plantas às adversidades. Plantas de ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Lincoln) submetidas ao estresse hídrico tem a taxa fotossintética inibida em até 75%, com o prolongamento do estresse ocorrem diversos efeitos fisiológicos, dentre estes a redução do conteúdo de pigmentos fotossintéticos (BECANA et al., 1998)

O conteúdo total de carotenóides ($Cx+c$) sofreu redução significativa nos genótipos *Ailsa Craig* e *Notabilis complemented* (Tabela 8). A maior redução ocorreu em *Notabilis complemented*, atingindo um total aproximado de 39% em relação ao respectivo controle, enquanto os teores de carotenóides em *Ailsa Craig* foi reduzido aproximada de 24% quando comparada ao seu controle, sem Cd. *Notabilis* teve elevados teores de $Cx+c$ mesmo sob 50 μM de CdCl_2 , não ocorrendo alteração significativa em relação ao controle (Figura 25).

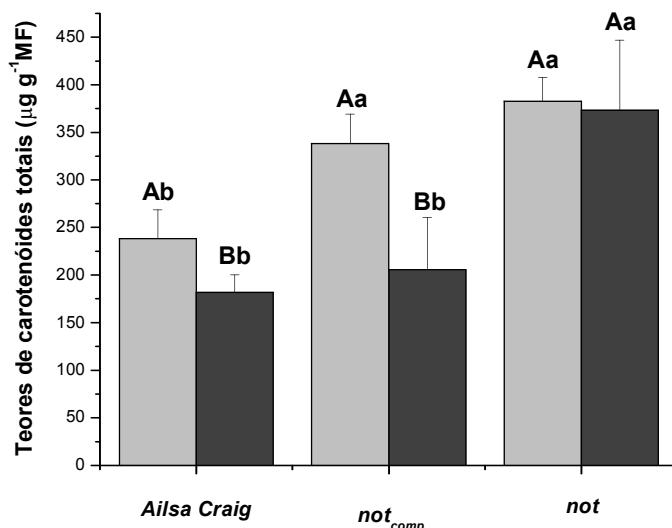


Figura 25. Teores de carotenóides totais ($Cx+c$) em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig* (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de CdCl_2 (■) e 50 μM de CdCl_2 (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os carotenóides desempenham importante papel no organismo vegetal. No cloroplasto participam da captação de luz e protegem o aparato fotossintético do excesso de energia luminosa, exaurindo moléculas tripletes de clorofila, radicais superóxido e oxigênio “singlet” (NIYOGI, 1999). Além do mais, estas moléculas desempenham papel importantíssimo como precursores do ABA (PARRY et al., 1990).

Desta forma, em um segundo momento comparando os genótipos em relação ao tratamento sem Cd (controles), os teores de Cx+c foram quantitativamente e de forma significativa mais elevados em *Notabilis* e *Notabilis complemented*, comparados ao genótipo *Ailsa Craig*, porém indistintos entre si. Considerando-se que *Notabilis* seja incapaz de converter grande parte destes carotenóides à ABA, pela ausência da enzima NCED, que catalisa a clivagem oxidativa dos compostos C₄₀ a compostos C₁₅, é possível sugerir maior acúmulo de carotenóides nos tecidos, explicando assim a diferença na quantidade de Cx+c entre *Ailsa Craig* e *Notabilis*. Apesar da aparente redução do conteúdo de Cx+c de *Notabilis complemented* em relação a *Notabilis*, esta diferença não é significativa, sugerindo entretanto, que *Notabilis complemented* possa apresentar um padrão intermediário entre *Ailsa Craig* e *Notabilis* quanto ao acúmulo de Cx+c. Este perfil intermediário poderia talvez ser fruto de uma complementação parcial do transgênico avaliado.

4.3. Atividade de enzimas antioxidantes

4.3.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi variável conforme o genótipo tratado. Assim a atividade enzimática foi reduzida no genótipo *Ailsa Craig*, na ordem de 30%, quando exposto a concentrações de 50 µM de CdCl₂. Entretanto, *Notabilis complemented* manteve os níveis de atividade semelhantes aos do controle, não diferindo estatisticamente entre os tratamentos com e sem Cd. Por outro lado, em *Notabilis* a SOD apresentou resultado oposto à *Ailsa Craig*. As plântulas do genótipo *Notabilis*, crescidas no meio contendo 50 µM de CdCl₂ têm aumento considerável na atividade desta enzima, aproximadamente 45% em relação ao seu controle (Tabela 9, Figura 26).

A modulação da atividade da SOD é dependente de uma série de fatores, dentre os quais podem ser citados o nível de expressão gênica da enzima, estímulos ambientais, estímulos celulares, a exemplo de ROS, possível envolvimento com substâncias sinalizadoras e/ou reguladoras de crescimento e desenvolvimento. A atividade da SOD exibe diferentes perfis em função do tipo de estresse e período de duração, demonstrando o

envolvimento e inter-relação de diferentes fatores na regulação desta enzima (BISCHOF et al., 2003).

Aparentemente, as plântulas do genótipo *Notabilis* poderiam estar sob uma condição de estresse oxidativo superior aos demais genótipos, dada a elevada atividade da SOD em relação ao controle. *Ailsa Craig* possivelmente tenha desenvolvido algum mecanismo de defesa e adaptação ao Cd, visto que a exposição perdurou durante todo desenvolvimento da planta. O ABA é um mediador essencial na ativação do sistema de resposta da planta aos estímulos ambientais, estando presente também em diversos processos que envolvem a adaptação ao estresse (LEUNG & GIRAUDAT, 1998). Plantas que não apresentam ABA, ou possuem níveis muito baixos, podem ter dificuldades na adaptação a determinados estresses ambientais, necessitando lançar mão de outra ferramenta metabólica, como o sistema enzimático de destoxificação de ROS, capaz de reduzir os danos oxidativos causados a célula.

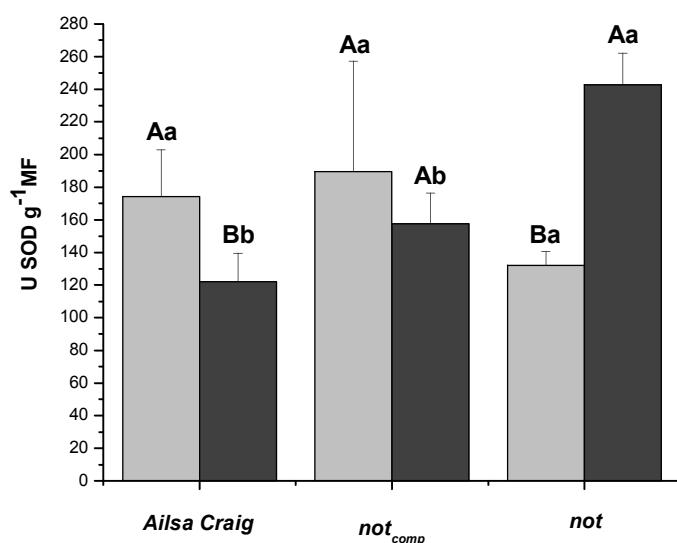


Figura 26. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig* (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de CdCl₂ (■) e 50 μM de CdCl₂ (■); uma unidade de SOD (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT. Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3.2. Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi alta no genótipo *Ailsa Craig*, sendo que as plantas crescidas com 50 μM de CdCl_2 aumentaram 24% em relação aos respectivos controles. Nos demais genótipos, a CAT teve uma atividade bastante reduzida. Em *Notabilis complemented* e *Notabilis* não houve diferença estatística na atividade da CAT entre os controles e as plantas do tratamento de 50 μM de CdCl_2 (Tabela 10, Figura 27). Em uma análise comparativa apenas entre os os controles, em que não houve adição de Cd, o genótipo *Ailsa Craig* demonstrou atividades 62 e 80% superiores as dos genótipos *Notabilis* e *Notabilis complemented*, respectivamente.

A transcrição da CAT aumenta em resposta ao estresse induzido pelo Cd, entretanto existe alguma modificação pós-transcricional da proteína causada pelo próprio metal, e assim há redução de sua atividade em plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.) submetidas a 50 μM de Cd, e em sua expressão protéica no tecido foliar (SANDALIO et al., 2006), coincidindo com os resultados obtidos neste ensaio. O Cd possui alguma propriedade capaz de promover uma modificação oxidativa na própria estrutura enzimática da CAT, que é posteriormente degradada (LEÓN et al., 2002).

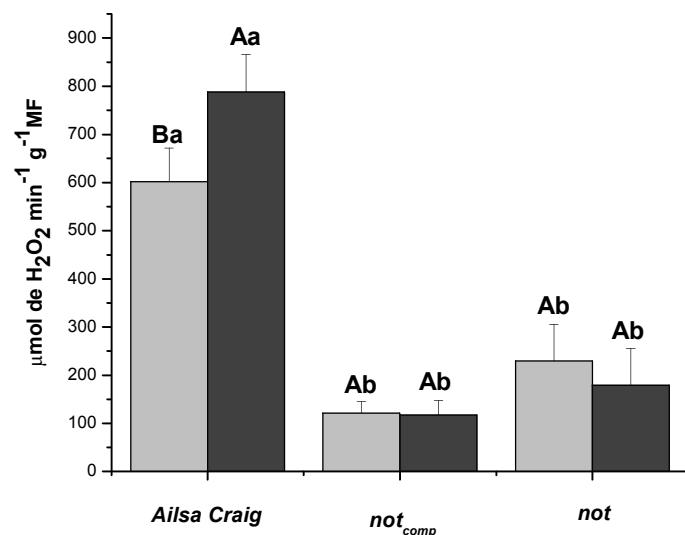


Figura 27. Atividade da enzima catalase (CAT) em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig* (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de CdCl_2 (■) e 50 μM de CdCl_2 (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As respostas de diferentes genótipos a este processo dependem em grande parte de todo sistema antioxidante e a forma como o mesmo atuará sobre o metal, possivelmente quelando, compartimentalizando ou conjugando-o.

4.3.3. Atividade das peroxidases (POX)

Os três genótipos evidenciaram resposta semelhante quanto a atividade da POX, entretanto quantitativamente, foram distintas. Plântulas controle, não expostas ao Cd, apresentaram maiores índices de atividade de POX que as tratadas com CdCl₂, sendo em ordem decrescente de atividade os genótipos *Notabilis*, *Ailsa Craig* e *Notabilis complemented*, respectivamente. Quanto à resposta dos genótipos ao tratamento de 50 µM de CdCl₂, *Notabilis* ainda manteve os maiores registros de atividade enzimática, com redução de aproximadamente 14% em relação ao controle, enquanto *Notabilis complemented* contabilizou redução de 23% quando comparado ao próprio controle. O índice de redução da atividade enzimática registrado para *Ailsa Craig* foi o maior, e corresponde a aproximadamente 48% de seu controle (Tabela 11, Figura 28).

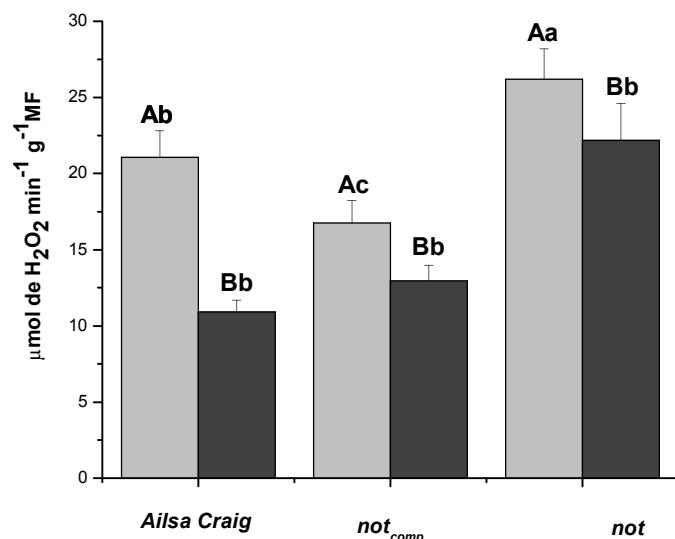


Figura 28. Atividade das peroxidases (POX) em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig* (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 µM de CdCl₂ (■) e 50 µM de CdCl₂ (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade de POX pode ser utilizada como indicador não específico para identificar estresses causados por poluentes ambientais, como os metais pesados (MARKKOLA et al., 1990). Também, a indução da atividade da POX possivelmente seja um mecanismo utilizado pelos vegetais para reduzir os níveis de H_2O_2 e peróxidos orgânicos formados sob diferentes condições de estresse (LIMA et al., 2000).

Este conjunto de enzimas possui importante papel na destoxificação dos radicais peróxido, quando presentes em excesso. Como a concentração de H_2O_2 na célula é dependente do influxo e da quantidade formada no interior da célula, é importante que as enzimas POX estejam presentes tanto no citosol quanto no apoplasto, a fim de evitar a ação danosa dos peróxidos às membranas (ASADA, 1999).

4.4. Peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica indicam que apenas o genótipo *Notabilis complemented* apresentou aumento significativo (Tabela 12), na peroxidação lipídica quando exposto ao Cd. Nos demais genótipos não foi possível detectar tal efeito (Figura 29).

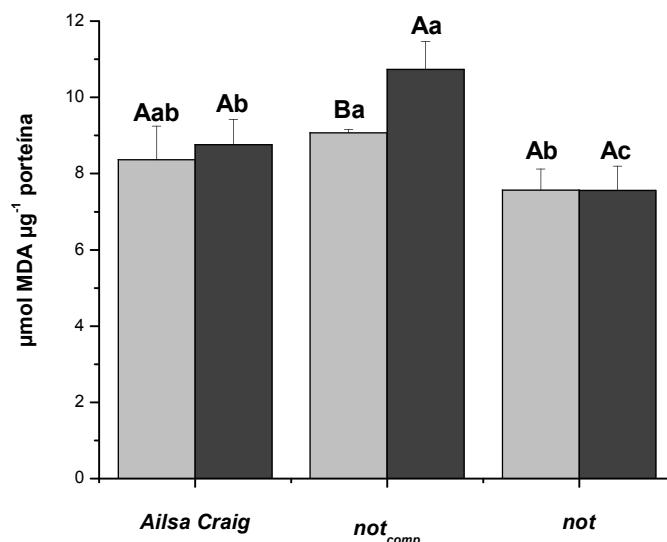


Figura 29. Peroxidação lipídica e formação do complexo TBA-MDA (MDA) em genótipos de tomateiro [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Ailsa Craig* (*Ailsa Craig*), *Notabilis complemented* (*not_{comp}*) e *Notabilis* (*not*)] sob concentrações de 0 μM de $CdCl_2$ (■) e 50 μM de $CdCl_2$ (■). Letras iguais, maiúsculas para tratamentos de um mesmo genótipo, e minúsculas para o mesmo tratamento de genótipos distintos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ailsa Craig foi o genótipo com maior atividade da CAT; *Notabilis*, apresentou os maiores níveis de atividade de POX, enquanto *Notabilis complemented* foi o único genótipo que teve aumento da atividade da SOD, apesar das baixas atividade de CAT e POX. Os radicais superóxido formados podem originar radicais hidroxil, via reação de Fenton ou Haber-Weiss, por exemplo, promovendo o aumento da peroxidação lipídica.

É possível que os mecanismos de defesa antioxidantem atuem distintamente nos genótipos, e desta forma os níveis de peroxidação lipídica sejam influenciados em função do sistema de destoxifcação predominante na célula, visto que determinados radicais como o peróxido de hidrogênio e hidroxil, quando presentes nas células, possuem alta correlação com a taxa de TBA-MDA formada nos ensaios realizados para avaliar o dano oxidativo ao nível de peroxidação de lipídeos. Estes resultados podem ser inferidos à danificação da membrana, quando suportado por mais subsídios resultantes de análises bioquímicas do material.

5. CONCLUSÕES

O Cd, é um elemento tóxico aos organismos vegetais, devido a seu potencial indireto na geração de estresse oxidativo. A concentração de 50 μM de Cd influencia sobre diversos processos do metabolismo vegetal, especificamente em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), e acarreta respostas multivariáveis, de acordo com a planta, os processos intrínsecos ao metabolismo e os fatores ambientais sob os quais o organismo se desenvolve. O genótipo do tomateiro desempenha papel fundamental na superação do estresse induzido pelo Cd. Plantas com variação genotípica quanto à produção de ABA apresentam diferentes respostas e graus de tolerância ao metal, possivelmente conferidos por diferenças dos mecanismos antioxidantes, como o nível de expressão e/ou atividade das enzimas antioxidantes. Estudos sobre a influência de reguladores de crescimento como o ABA na superação de estresses ambientais como a exposição a metais pesados carecem de evidências mais concretas, capazes de comprovar a atuação destas substâncias, direta ou indiretamente, no metabolismo antioxidativo da célula, conferindo diferentes níveis de tolerância às plantas, e justificando assim o emprego de ABA-mutantes em estudos de estresse induzidos por estes elementos. Estas informações apresentam aplicabilidade ao melhoramento de espécies vegetais, focando a fitorremediação, uma vez que conhecidos os mecanismos específicos utilizados na superação do estresse, além de sua base molecular, é possível desenvolver plantas com potencial de estabelecimento em áreas contaminadas, consideradas impróprias ao desenvolvimento de quaisquer atividades, como forma auxiliar de reestabelecer o equilíbrio do ecossistema.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.; SHAHEEN, R. (2007) Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 19(2):149-161.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. (2007) Mecanismos e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, 30(3):623-628.
- ALHAGDOW, M.; MOUNET, F.; GILBERT, L.; NUNES-NESI, A.; GARCIA, V.; JUST, D.; PETIT, J.; BEAUVOIT, B.; FERNIE, A.R.; ROTHAN, C.; BALDET, P. (2007) Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. **Plant Physiology** 145:1408-1422.
- ALI, M.B.; KHATUN, S.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. (2008) Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. **Environmental and Experimental Botany**. *IN PRESS*.
- ALLAN, A.C.; FRICKER, M.D.; WARD, J.L.; BEALE, M.H.; TREWAVAS, A.J. (1994) Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. **Plant Cell**, 6:1319-1328.
- ALLEN, R.D.; GUPTA, A.S.; WEBB, R.P.; HOLADAY, A.S. (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiology**, 103:1067-1073.
- ALLOWAY, B.J.; AYRES, D.C. **Chemical principles of environmental pollution**. 2.ed. New York: Chapman & Hall, 1997. 395p.
- ALMEIDA, W.P.; HUBER, P.C.; FÁTIMA, A. (2008) Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, 15:1-10.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SOD's) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53(372):1331-1341.
- ALSCHER, R.G.; MADAMANCHI, N.R.; ANDERSON, J.V.; CRAMER, C.L.; HESS, J.L. (1992) Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. **Plant Physiology**, 100:138-145.
- ANDERSON, J.V.; DAVID, G.D. (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum**, 120:421-433.

- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, 109:1247-1257.
- AONO, M.; SAJI, H.; FUJIYAMA, K.; SUGITA, M.; KONDO, N.; TANAKA, K. (1995) Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. **Plant Physiololy**, 107:645-648.
- ARRIGONI, O. (1994) Ascorbate system in plant development. **Journal of Bioenergy and Biomembrane**, 26:407-419.
- ASADA K. (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, 85:235-241.
- ASADA, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50:601-639.
- ASADA, K.; USHIMARU, T.; MANO, J. (1997) Ascorbate in thylakoid lumen as an endogenous electron donor to photosystem II: Protection of thylakoids from photoinhibition and regeneration of ascorbate in stroma by dehydroascorbate reductase. **Photosynthesis Research**, 53:197-204.
- ASHTAMKER, C.; KISS, M.; SAGI M.; DAVYDOV, O.; FLUHR, R. (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. **Plant Physiology**, 143:1817-1826.
- ATTOLICO, A.D.; TULLIO, M.C. (2006) Increased ascorbate content delays flowering in long-day grown *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology and Biochemistry**, 44:462-466.
- BAIG, M.M.; KELLY, S.; LOEWUS, F. (1970) L-ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-gulono 1,4-lactone and L-galactono-1,4-lactone. **Plant Physiology**, 46:277-280.
- BAILLY, C.; LEYMARIE, J.; LEHNER, A.; ROUSSEAU, S.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. (2004) Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. **Journal of Experimental Botany**, 55(396):475-483.
- BARCELÓ, A.R.; LÓPEZ-SERRANO, M.; FERNÁNDEZ, M.D.; POMAR, F.; PEDREÑO, M.A. (2004) *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. **Journal of Experimental Botany**, 55(396):423-431.
- BARTOLF, M.; BRENNAN, E.; PRICE, C.A. (1980) Partial characterization of a cadmium-binding protein from the roots of cadmium-treated tomato. **Plant Physiology**, 66:438-441.
- BAUERNFIEND, J.C. (1972) Carotenoid vitamin-A precursors and analogs in foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 20(3):456-273.

- BAUM, J.A.; CHANDLEE, J.M.; SCANDALIOS, J.G. (1983) Purification and partial characterization of a genetically-defined superoxide dismutase (SOD-1) associated with maize chloroplasts. **Plant Physiology**, 73:31-35.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44:276-287.
- BECANA, M.; ITURBE-ORMAETXE, I.; ESCUREDO, P.; ARRESE-IGOR, C. (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiology**, 116:173-181.
- BECK, E.; BURKERT, A.; HOFMANN, M. (1983) Uptake of L-ascorbate by intact spinach chloroplasts. **Plant Physiology**, 73:41-45.
- BENAVIDES, M.P.; ZAWOZNIK, M.S.; GROPPA, M.D.; TOMARO, M.L. (2007) Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, 173:190-197.
- BISCHOF, K.; JANKNEGT, P.J.; BUMA, A.G.J.; RIJSTENBIL, J.W.; PERALTA, G.; BREEMAN, A.M. (2003) Oxidative stress and enzymatic scavenging of superoxide radicals induced by solar UV-B radiation in *Ulva* canopies from southern Spain. **Scientia Marina**, 67(3):353-359.
- BOUWMEESTER, H.J.; MATUSOVA, R.; RANI, K.; VERSTAPPEN, F.W.A.; FRANSSEN, M.C.R.; BEALE, M.H. (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. **Plant Physiology**, 139:920-934.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 43:83-116.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254.
- BRYANT, D.A.; SAKURAGI, Y.; MAEDA, H.; DELLA PENNA, D. (2006) α -Tocopherol plays a role in photosynthesis and macronutrient homeostasis of the cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803 that is independent of its antioxidant function. **Plant Physiology**, 141:508-521.
- BROWN, D.P.; BECKETT, B.P. (1985) Intracellular and extracellular uptake of cadmium by the moss *Rhytidadelphus squarrosus*. **Annals of Botany**, 55:179-188.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. Rockville:Maryland, 2000. p.865-873, 1250-1268.

- BUENO, P.; PIQUERAS, A. (2002) Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures. **Plant Growth Regulation**, 36:161-167.
- BUETTNER, G.R.; JURKIEWICZ, B.A. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. BUETTNER, G.R.; JURKIEWICZ, B.A. In: **Handbook of Antioxidants**, New York: Dekker, p.91-115. 1996.
- BURBIDGE, A.; GRIEVE, T.M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; MCCARTY, D.R.; TAYLOR, I.B. (1999) Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. **The Plant Journal**, 17(4):427-431.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, 83:463-468.
- CAMPOS, V.C.; TILLMANN, M.A. (1997) Luz e KNO_3 na germinação de sementes de tomate. **Revista Brasileira de Agrociência**, 3(1):31-36.
- CAPEL, I.D.; PINNOCK, M.H.; DORRELL, H.M.; WILLIAMS, D.C.; GRANT, E.C. (1981) Comparison of concentrations of some trace, bulk and toxic metals in the hair of normal and dyslexic children. **Clinical Chemistry**, 27:879-881.
- CARETTO, S.; PARADISO, A.; D'AMICO, L.; GARA, L.D. (2002) Ascorbate and glutathione metabolism in two sunflower cell lines of differing α -tocopherol biosynthetic capability. **Plant Physiology Biochemistry** 40:509-513.
- CAVARIANI, C.; PIANA, Z.; TILLMANN, M.A.A.; MINAMI, K. (1994) Métodos de remoção da mucilagem e qualidade fisiológica de sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). **Scientia Agricola**, 50(3):43-46.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, 2:764-775.
- CHO, U.H.; SEO, N.H. (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, 168:113-120.
- CHOUNDHURY, S.; PANDA, S.K. (2004) Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in *Oryza sativa* L. roots. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, 30(3/4):95-110.
- COBBETT, C.S. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, 123:825-832.
- COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. (2002) Phytochelatins & metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, 53:159-182.

- CORPAS, F.J.; LETERRIER, M.; BARROSO, J.B.; SANDALIO, L.M.; RÍO, L.A. (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. **Plant Physiology**, 138:2111-2123.
- CÓZATL, D.G.M.; BUTKO, E.; SPRINGER, F.; TORPEY, J.W.; KOMIVES, E.A.; KEHR, J.; SCHROEDER, J. (2008) Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. **The Plant Journal**, 54:249-259.
- CUMMINS, W.R.; SONDHEIMER, E. (1973) Activity of the asymmetric isomers of abscisic acid in rapid bioassay. **Planta**, 111:365-369.
- DAUD, M.K.; SUN, Y.; DAWOOD, M.; HAYAT, Y.; VARIATH, M.T.; WU, Y.X.; RAZZIUDIN; MISHKAT, U.; SALAHUDDIN; NAJEEB, U.; ZHU, S. (2008) Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. **Journal of Hazardous Materials**, IN PRESS.
- DELHAIZE, E.; JACKSON, P.J.; LUJAN, L.D.; ROBINSON, N.J. (1989) Poly(y-glutamylcysteinyl) glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium. **Plant Physiology**, 89:700-706.
- DELLAPENNA, D. (2005) A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. **Journal of Plant Physiology**, 162:729-737.
- DING, A.; CHENG, L.; LIU, P.; CARPENTER, P.J.; TENG, Y. (2007) Plant response to metal contamination at an oil shale tailing site in maoming, south China. **Ground Water Monitoring & Remediation**, 27(3):111-117.
- DIXIT, V.; PANDEY, V.; SHYAM, R. (2000) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). **Journal of Experimental Botany**, 52(358):1101-1109.
- DIXON, D.P. (2002) Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, 3(3):1-10.
- DÖNMEZ, G.; AKSU, Z. (1999) The effect of copper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, 3:135-142.
- DYE, S.K. (2007) Changes in the oxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 19(1):53-60.
- EKMEKÇİ, Y.; TANYOLAÇ, D.; AYHAN, B. (2007) Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. **Journal of Plant Physiology**, 165:600-611.
- ESTERBAUER, H.; GRILL, D. (1978) Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. **Plant Physiology**, 61:119-121.

- EZAKI, B.; SUZUKI, M.; MOTODA, H.; KAWAMURA, M.; NAKASHIMA, S.; MATSUMOTO, H. (2004) Mechanism of gene expression of *Arabidopsis* glutathione S-transferase, *AtGST1*, and *AtGST11* in response to aluminum stress. **Plant Physiology**, 134:1672-1682.
- FOOTE, C.S.; DENNY, R.W. (1968) Chemistry of singlet oxygen. Quenching by β -carotene. **Journal of American Chemical Society**, 90:6233-6235.
- FORBES, B.J.R.; HAMILTON, G.A. (1994) Mechanism and mechanismbased inactivation of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Bioorganic Chemistry**, 22:343-361.
- FORTI, G.; ELLI, G. (1995) The function of ascorbic acid in photosynthetic phosphorylation. **Plant Physiology**, 109:1207-1211.
- GALLEGOS M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. (1999) Effects of cadmium ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. **Biologia Plantarum**, 42(1):49-55.
- GALLIE, D.R.; CHEN, Z. (2006) Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. **Plant Physiology**, 142:775-787.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50:151-158.
- GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. (1998) Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **The Plant Journal**, 13(5):591-602.
- GIANNOPOLITIS, I.; REIS, S.K. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59:309-314.
- GOLDSBROUGH, P.B.; GUO, W.J.; MEETAM, M. (2008) Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. **Plant Physiology**, 146:1697-1706.
- GRATÃO, P.L. **Análise da resposta antioxidativa de células de *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 submetidas ao cádmio.** 2003. 128p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo.
- GRILL, E.; CHRISTMANN, A. (2007) A plant receptor with a big family. **Science**, 135:1676-1677.
- GRILL, E.; LÖFFLER, S.; WINNACKER, E.L.; ZENK, M.H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metals-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin syntase). **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 86:6838-6842.
- GRILL, E.; WINNACKER, E.L.; ZENK, M.H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. **Science**, 230:674-676.

- HARRIS, J.M.; LIANG, Y.; MITCHELL, D.M. (2007) Abscisic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula latd* mutant. **Developmental Biology**, 304:297-307.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84:450-455.
- HAYASHI, H.; FUKUDA, A.; OKADA, Y.; SUZUI, N.; FUJIWARA, T.; YONEYAMA, T. (2003) Cloning and characterization of the gene for a phloem-specific glutathione S-transferase from rice leaves. **Physiologia Plantarum**, 120:595-602.
- HELPNER, J.P.; KAGAN, L.; HILBY, C.L.; MAYNARD, T.M. (1982) L-ascorbic acid biosynthesis in *Ochromonas danica*. **Plant Physiology**, 69:465-468.
- HERSCHBACH, C.; ZALM, E.V.D; SCHNEIDER, A.; JOUANIM, L.; KOK, L.J.D.; RENNENBERG, H. (2000) Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing g-glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H₂S. **Plant Physiology**, 124:461-473.
- HIRAI, N.; YOSHIDA, R.; TODOROKI, Y.; OHIGASHI, H. (2000) Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 64(7):1448-1458.
- HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. (1978) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, 57:1332-1334.
- HOREMANS, N.; FOYER, C.H.; ASARD, H. (2000) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. **Trends in Plant Physiology**, 5(6):263-267.
- HOWDEN, R.; ANDERSEN, C.R.; GOLDSBROUGH, P.B.; COBBETT, C.S. (1995a) A Cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 107:1067-1073.
- HOWDEN, R.; COBBET, C.S. (1992) Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 99:100-107.
- HOWDEN, R.; GOLDSBROUGH, P.B.; ANDERSEN, C.R.; COBBETT, C.S. (1995b) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. **Plant Physiology**, 107:1059-1066.
- IMLAY, J.A. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review of Biochemistry**, 77:755-776.
- INOUE, M. (2005) Phytochelatins. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17(1):65-78.
- INZÉ, D.; MONTAGU, M.V. (1995) Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 6:153-158.

- KACHENKO A.G.; SINGH, B. (2006) Heavy metals contamination in vegetables grown in urban and metal smelter contaminated sites in Australia. **Water, Air, and Soil Pollution**, 169:101–123.
- KAR, M.; MISHRA, D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, 57:315-319.
- KAWAKAMI, N.; NAMBARA, E.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; IUCHI, S.; TAMURA, N.; ISHIYAMA, K.; ASO, Y.; HANADA, A.; JIKUMARU, Y.; OKAMOTO, M.; NAKABAYASHI, K.; WATANABE, A.; IMAMURA, A.; TOH, S. (2008) High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiology**, 146:1368-1385.
- KEFELI, V.I.; KALEVITCH, M.V. **Natural growth inhibitors and phytohormones in plants and environment**. 1.ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. 330p.
- KEFELI V.; SHOTWELL, M.; BANKO A. (2000) Effect of ultraviolet (UV) light on the growth of some plants. **Proceedings. 4th Annual Meeting**, Northern Section of ASPP. University of Connecticut p.37.
- KEHRER, J. P. (2000) The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, 149(1):43-50.
- KESSELER, A.; BRAND, M.D. (1995) The mechanism of stimulation of state 4 respiration by cadmium in potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, (33)519-528.
- KINGSTON-SMITH, A.H.; FOYER, C.H. (2000) Overexpression of Mn-superoxide dismutase in maize leaves leads to increased monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase and glutathione reductase activities. **Journal of Experimental Botany**, 51(352):1867-1877.
- KLAASSEN, C.D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. (1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, 39:267-294.
- KNECHT, J.A.; BAREN, N.V.; TEN-BOOKUN, W.M.; WONG-FONG-SANG, H.W.; KOEVOETS, P.L.M.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J.A.C. (1995) Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. **Plant Science**, 106:9-18.
- KOBAYASHI, K. (1995) A direct demonstration of the catalytic action of monodehydroascorbate reductase by pulse radiolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, 270(46):27551-27554.
- KRINSKY, N.I. (1994) The biological properties of carotenoids. **Pure & Applied Chemistry**, 66(5):1003-1010.

- LAMOUREUX G.L.; RUSNESS, D.G. (1993) Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In sulfur nutrition and assimilation in higher plants. **The Hague: SPB Academy**, 221-237.
- LAPPARTIENT, A.G.; TOURAIN, B. (1997) Glutathione-mediated regulation of ATP sulfurylase activity, SO_4^{2-} uptake, and oxidative stress response in intact canola roots. **Plant Physiology**, 114:177-183.
- LAUWERYS, R.R.; BERNARD, A.M.; ROELS, H.A.; BUCHET, J.P. (1994) Cadmium: exposure markers as predictors of nephrotoxic effects. **Clinical Chemistry**, 40:1391-1394.
- LEE, S.; MOON, J.S.; KO, T.S.; PETROS, D.; GOLDSBROUGH, P.B.; KORBAN, S.S. (2003) Overexpression of *arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. **Plant Physiology**, 131:656-663.
- LEÓN, A.M.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R.M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, 40:813-820.
- LEONARDIS, S.D.; DIPIERRO, N.; DIPIERRO, S. (2000) Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38:773-779.
- LEYH, T.S. (1993) The physical biochemistry and molecular genetics of sulfate activation. **Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology**, 28:515-542.
- LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. (1998) Abscisic acid signal transduction. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49:199-222.
- LI, C.; LEI, Y.; KORPELAINEN, H. (2007) Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. **Chemosphere**, 68(4):686-694.
- LI, L; WAN, X.R. (2006) Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 347:1030-1038.
- LI, M. (2008) Ecophysiological responses of *Jussiaea rapens* to cadmium exposure. **Aquatic Botany**, 88:347-352.
- LICHTENTHALER, H.K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50:47-65.
- LIMA, P.P.G; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. (2000) Poliaminas e atividade das peroxidases em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Bragantia**, 2:31-37

- LIU, Y.; WANG, X.; ZENG, G.; QU, D.; GU, J.; CHAI, L. (2007) Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate-glutathione cycle in *Bechmeria nivea* (L.) Gaud. **Chemosphere**, 69:99–107.
- LUNA, C.M. PASTORI, G.M.; DRISCOLL, S.; GROTON, K.; BERNARD, S.; FOYER, C.H. (2004) Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. **Journal of Experimental Botany**, 56(411):417-423.
- MA, F.W.; LI, M.J.; ZHANG, M.; PU, F. (2008) Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). **Plant Science**, 174:606–612.
- MADAMANCHI, N.R.; YU, X.; DOULIS, A.; ALSHER, R.G.; HATZIOS, K.K.; CRAMER, C.L. (1998) Acquired resistance to herbicides in pea cultivars through pretreatment with sulfur dioxide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 48:31-40.
- MAKSYMIEC, W.; KRUPA, Z. (2006) The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. **Environmental and Experimental Botany**, 57:187-194.
- MALAVOLTA, E. (1994) **Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificação e fatos.** (Produquímica), 153p., São Paulo.
- MALLICK, N.; MOHN, F.H. (2000) Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, 157:183-193.
- MARKKOLA, A.M.; OHTONEN, R.; TARVAINEN, O. (1990) Peroxidase activity as an indicator of pollution stress in the fine roots of *Pinus sylvestris*. **Water, Air and Soil Pollution**, 52:149-156.
- MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral.** Viçosa: Editora UFV, 2005. 451p. cap. 5, p.255.
- MARRS, K. (1996) The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 47:127-158.
- MASCIO, P.D.; KAISER, S.; SIES, H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemical and Biophysics**, 224:532-538.
- MATOS, J.A.C. **Estresse oxidativo em plantas induzido por metais pesados: influência sobre o mecanismo antioxidante enzimático.** 2006. 31p. Monografia (Curso de Bacharelado e Licenciatura em Química) – Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas.
- MAY, M.J.; LEAVER, C.J. (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **Plant Physiology**, 103:621-627.

- MCCLUNG, C.R.; FRUGOLI, J.A.; ZHONG, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M.A.; THOMAS, T.L. (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, 11(2):327-336.
- MCCORDE, J.M.; FRIDOVICK (1969) Superoxide dismutases: a enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biology Chemistry**, 244:6049-6055.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. (1983) Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, 983(52):711-60.
- MELO L.C.; SANTOS J.B.; RAMALHO M.A.P. (1997) Choice of parents to obtain common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars tolerant to low temperatures at the adult stage. **Brazilian Journal of Genetics**, 20(2): 283-92.
- MENECHINI, R. (1987) A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, 5(28):57-62.
- MIDDLETON, E.M.; TERAMURA, A.H. (1993) The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. **Plant Physiology**, 103:741-752.
- MISRA, V.; SETH, C.S.; KUMAR, C.P. (2008) The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety. IN PRESS**.
- MITTLER, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, 7(9):405-410.
- MOBIN, N.; KHAN, N.A. (2006) Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology**, 164:601-610.
- MORTEL, J.E.V.; SCHAT, H.; MOERLAND, P.D.; VAN THEMAAT, E.V.L.; VAN DER ENT, S.; BLANKESTEIJN, H.; GHANDILYAN, A.; TSIATSIANI, S.; AARTS, M.K.G. (2008) Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant, Cell and Environment**, 31:301-324.
- MUELLER, L.A.; GOODMAN, C.D.; SILADY, R.A.; WALBOT, V. (2000) *AN9*, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. **Plant Physiology**, 123:1561-1570.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; PEÑUELAS, J. (2004) Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. **Plant Science**, 166:1105-1110.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15:471-497.

- NAYYAR, H.; GUPTA, D. (2005) Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. **Environmental and Experimental Botany**, 58:106-113.
- NEYENS, E; BAEYENS, J. (2003) A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**, 98(1-3):33-50.
- NIYOGI, K.K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50:333-359.
- NJUS, D.; KELLY, M.V. (1991) Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. **FEBS**, 284(2):147-151.
- NOCTOR, G.; FOYER, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology** 49:249-279.
- NOGUEIRA, F.T.S.; COSTA, M.G.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; FINGER, L.F. (2001) Regeneração in vitro de plantas de tomateiros “Santa Clara” e seu mutante natural “Firme”. **Ciência Agropecuária** 25(1):63-71.
- NORRIS, S.R.; BARRETTE, T.R.; DELLA PENNA, D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. **Plant Cell**, 7:2139-2149.
- NUSSBAUM, S.; SCHMUTZ, D.; BRUNOLD, C. (1988) Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium in *Zea mays* L. **Plant Physiology**, 88:1407-1410.
- OKAMOTO, O.K.; ASANO, C.S.; AIDAR, E.; COLEPICOLO, P. (1996) Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae). **Journal of Phycology**, 32:74-79.
- OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. (2003) Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany**, 54(381):291-301.
- ORTIZ, D.F.; RUSCITTI, T.; MCCUE, K.F.; OW, D.W. (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. **Journal of Biology Chemistry**, 270:4721-4728.
- PADH, H. (1990) Cellular functions of ascorbic acid. **Biochemical and Cell Biology**, 68:1166-1173.
- PANDA, S.K.; KHAN, M.H. (2004) Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 16(2):115-118.
- PARRY, A.D.; BABIANO, M.J.; HORGAN, R. (1990) The role of cis-carotenoids in abscisic acid biosynthesis. **Planta**, 182:118-128.

- PASTERNAK, M.; LIM, B.; WIRTZ, M.; HELL, R.; COBBETT, C.S.; MEYER, A.J. (2008) Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. **The Plant Journal**, 53:999-1012.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11(3):137-143.
- PELEGRI, N.N.B. **Sistema de filtração lenta no tratamento de percolado do aterro sanitário de Limeira-SP**. 2006. 101p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas.
- PICKET, C.B.; LU, A.Y.H. (1989) Glutathione s-transferases: gene structure, regulation, and biological function. **Annual Review of Biochemistry**, 58:743-764.
- PILAR, B.B.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; BERMEJO-BARRERRA, A. (1997) Slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead, cadmium and manganese in human hair samples using rapid atomizer programs. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 12:301–306.
- POLLE, A. (1992) Purification of two superoxide dismutase isozymes and their subcellular localization in needles and roots of norway spruce (*Picea abies* L.) trees. **Plant Physiology**, 100:334-340.
- POPOVA, L.; KRANTEV, A.; YORDANOVA, R.; JANDA, T.; SZALAI, G. (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, 165:920-931.
- PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. **Plant Physiology**, 130(1):15-21.
- POTTERS, G.; ASARD, H.; CAUBERGS, R.J.; HOREMANS, N. (2000) Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. **Plant Physiology**, 124:17–20.
- PRASAD, M.N.V. (1995) Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, 35:525-545.
- PUKACKA, S.; RATAJCZK, E. (2005) Antioxidative response of ascorbate–glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. **Journal of Plant Physiology**, 163:1259-1266.
- RANIERI, A.; CASTAGNA, A.; SCEBBA, F.; CARERI, M.; ZAGNONI, I.; PREDIERI, G.; PAGLIARI, M.; DI TOPPI, L.S. (2005) Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43(1):45-54.

- RAUSER, W.E.; MEUWLY, P. (1992) Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium. **Plant Physiology**, 99:8-15.
- RAZINGER, J. et al. (2008) Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. **Environmental Pollution**, 153:687-694.
- RESENDE, M.; CURI, N.; REZENDE, S.B.; CORREA, G.F. **Pedologia: Base para distinção de ambientes**. Viçosa: Editora UFV, 1997. 367p.
- RIBEIRO, J.M.; SILVA PEREIRA, C.; SOARES, N.C.; VIEIRA, A.M.; FEIJO, J.A.; JACKSON, P.A. (2006) The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes. **Journal of Experimental Botany**, 57(9):2025-2035.
- RÜEGSEGGER, A.; SCHMUTZ, D.; BRUNOLD, C. (1990) Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. **Plant Physiology**, 93:1579-1584.
- SAKIHAMA, Y. (2000) Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 279:949-954.
- SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GÓMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; DEL RIO, L.A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, 52(364):2115-2126.
- SANDMANN, G. (1994) Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. **European Journal of Biochemistry**, 223(1):7-24.
- SANDMANN, G.; GÖTZ, T.; WINDHÖVEL, U.; BÖGER, P. (2001) Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. **Plant Physiology**, 120:599-604.
- SATIO, K.; NICK, J.A.; LOEWUS, F.A. (1990) D-glucosone and L-sorbosone, putative intermediates of L-ascorbic acid biosynthesis in detached bean and spinach leaves. **Plant Physiology**, 94:1496-1500.
- SAWHNEY, S.K.; CHUGH L.K. (1996) Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. **Environmental Pollution**, 92(1):1-5.
- SCHULZ, A.; OSWALD, O.; BEYER, P.; KLEINING, H. (1993) *SC-005 1*, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **FEBS**, 318(2):162-166.
- SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GOLDBOLD, D.L.; POLLE, A. (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, 127:887-898.

- SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, 53(372):1351-1365.
- SCANDALIOS, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, 101:7-12.
- SCRUTTON, N.S.; RAINES, A.R.C. (1996) Cation- π bonding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands. **Biochemical Journal**, 319:1-8.
- SEVILLA, F.; JIMENEZ, A.; HERNANDEZ, J.A.; PASTORI, G.; DEL RIO, L.A. (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant Physiology**, 118:1327-1335.
- SHARP, R.E.; LENOBLE, M.E.; ELSE, M.A.; THORNE, E.T.; GHERARDI, F. (2000) Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. **Journal of Experimental Botany**, 51(350):1575-1584.
- SHINOZAKI, K.; IUCHI, S.; KOBAYASHI, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2000) A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. **Plant Physiology**, 123:553-562.
- SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MYIAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. (2002) Regulation and function of ascorbate reductase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, 53(372):1305-1319.
- SILVA, C.M. **Dinâmica de metais potencialmente tóxicos no solo após a aplicação de lodo de esgoto.** 2005. 147p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Civil Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas.
- SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. (2002) Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 4(1):71-78.
- SILVA, M.L.S. **Avaliação do comportamento de elementos-traço essenciais e não essenciais em solo contaminado sob cultivo de plantas.** 2006. 113p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo.
- SMEETS, K.; RUYTINX, J.; SEMANE, B.; VAN-BELLEGHEM, F.; REMANS, T.; VAN-SANDEN, S.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. (2008) Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. **Environmental and Experimental Botany**, 63:1-8.
- SMITH, I.K. (1985) Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. **Plant Physiology**, 79:1044-1047.

- SINGHAL, R.K.; ANDERSON, M.E.; MEISTER, A. (1987) Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. **FASEB Journal**, 1:220-223.
- SOFO, A.; CARMINE TUZIO, A.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C. (2005) Influence of water deficit and rewetting on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. **Plant Science**, 169:403-412.
- SOLL, J.; SCHULTZ, G. (1979) Comparison of geranylgeranyl and phytol substituted methylquinols in the tocopherol synthesis of spinach chloroplasts. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, 91:715-720.
- SOUSA, M.B. **Extração e quantificação de α -caroteno, β -caroteno e α -tocoferol em macroalgas marinhas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.** 2005. 87p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Curso de Pós-graduação de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará.
- SOUZA, V.H.E. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina em *Allium cepa*.** 2005. 176p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina.
- STASOLLA, C.; YEUNG, E.C. (2007) Cellular ascorbic acid regulates the activity of major peroxidases in the apical poles of germinating white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. **Physiology and Biochemistry**, 45:188-198.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Ethylene and abscisic acid. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3.ed. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991. cap. 19, p.473-488.
- TAL, M. (1966) Abnormal stomatal behavior in wilty mutants of tomato. **Plant Physiology**, 41:1387-1391.
- TAVARES, T.M.; CARVALHO, F.M. (1992) Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. **Química Nova**, 15(2):147-153.
- THOMPSON, A.J.; THORNE, E.T.; BURBIDGE, A.; JACKSON, A.C.; SHARP, R.E.; TAYLOR, I.B. (2004) Complementation of *notabilis*, an abscisic acid-deficient mutant of tomato: importance of sequence context and utility of partial complementation. **Plant, Cell and Environment**, 27:459-471.
- TIWARI, B.S.; BELENGHI, B.; LEVINE, A. (2002) Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. **Plant Physiology**, 128:1271-1281.
- TOMARO, M.L.; GALLEGOS, S.M.; BENAVIDES, M.P. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, 121:151-159.

- TOPPI, L.S.; GABBRELLI, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, 41:105-130.
- TORRES, C.A.; ANDREWS, P.K.; DAVIES, N.M. (2006) Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. **Journal of Experimental Botany**, 57(9):1933-1947.
- URAGUCHI, S.; WATANABE, I.; YOSHITOMI, A.; KIYONO, M.; KUNO, K. (2006) Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*. **Journal of Experimental Botany**, 57(12):2955-2965.
- YOUNG, A.J. Occurrence and distribution of carotenoids in photosynthetic systems. In: BRITTON, G.; YOUNG, A.J. **Carotenoids in photosynthesis**. 1.ed. Londres: Chapman & Hall, 1993. cap. 2, p.16-71.
- VAUFLEURY, A. (2008) Comparison of transfer and effects of Cd on rats exposed in a short experimental snail–rat food chain or to CdCl₂ dosed food. **Environment International**, 34:381-389.
- VESTERGAARD, P.; SHAIKH, Z. (1994) The nephrotoxicity of intravenously administered cadmium-metallothionein: Effect of dose, mode of administration, and preexisting renal cadmium burden. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 126:240-247.
- VIEIRA, G.A. **Metabolismo do nitrogênio em plantas na presença de cádmio**. 2006. 45p. Monografia (Curso de Bacharelado e Licenciatura em Química) – Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas.
- VOLL, M.L.; ABBASI, A.R.; HAJIREZAEI, M.; HOFIUS, D.; SONNEWALD, U. (2007) Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. **Plant Physiology**, 143:1720-1738.
- VÖLLEGI-LANGE, R.; WAGNER, G.J. (1996) Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. **Plant Science**, 114:11-18.
- WAGNER, G.J. (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in Agronomy**, 71:173-212.
- WALTON, D.C. (1969) The effects of abscisic acid on growth and nucleic acid synthesis in excised embryonic bean axes. **Plant Physiology**, 45:37-40.
- WANG, P.; SONG, C.P. (2008) Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. **New Phytologist**, 178:703-718.
- WELLBURN, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiology**, 144:307-313.

- WILLEKENS, H. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. **The EMBO Journal**, 16(16):4806-4816.
- WINGE, D.R.; MEHRA, R.K.; TARBET, E.B.; GRAY, W.R. (1988) Metal-specific synthesis of two metallothioneins and γ -glutamyl peptides in *Candida glabrata*. **Proceedings of National Academy of Science**, 85:8815-8819.
- WINGSLE, G.; GARDESTRÖM, P.; HÄLLGREN, J.E.; KARPINSKI, S. (1991) Isolation, purification, and subcellular localization of isozymes of superoxide dismutase from scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. **Plant Physiology**, 95:21-28.
- WISE, R.R.; NAYLOR, A.W. (1987) Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. **Plant Physiology**, 83:278-282.
- ZABADAL, T.J. (1974) A water potential threshold for the increase of abscisic acid in leaves. **Plant Physiology**, 53:125-127.
- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. (1998) Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, 21(6):787-793.
- ZEEVAART, J.A.D. (1977) Sites of abscisic acid synthesis and metabolism in *Ricinus communis* L. **Plant Physiology**, 59:788-791.
- ZEEVAART, J.A.D.; SCHWARTZ, S.H.; QIN, X. (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. **Plant Physiology**, 131:1591-1601.
- ZENK, M.H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. **Gene**, 179:21-30.
- ZHANG, W.; AN, Z.; JING, W.; LIU, Y. (2008) Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced estomatal closure in *Vicia faba*. **Journal of Experimental Botany**, 59(4):815-825.
- ZHU, R.; MACFIE, S.M.; DING, Z. (2005) Cadmium-induced plant stress investigated by scanning electrochemical microscopy. **Journal of Experimental Botany**, 56(421):2831-2838.

APÊNDICE

Tabela 1. Resumo da análise de variância da massa fresca total (MFT) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl₂

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	0,00145	0,00072	1,3862 [—]
Exposição ao Cd (F2)	1	0,00066	0,00066	1,2658 [—]
Interação F1 x F2	2	0,01112	0,00556	10,6367**
Tratamentos	5	0,01323	0,00265	5,0623**
Resíduo	18	0,00941	0,00052	
Total	23	0,02264		
Coef. variação (%)				12,82026

[—] Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** (p < 0,01) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* (p < 0,05) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F
ns Não significativo.

Tabela 2. Resumo da análise de variância da massa fresca de raiz (MFr) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl₂

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	0,00017	0,00009	4,1767 [—]
Exposição ao Cd (F2)	1	0,00000	0,00000	0,2081 [—]
Interação F1 x F2	2	0,00003	0,00002	0,7278 ns
Tratamentos	5	0,00021	0,00004	2,0034 ns
Resíduo	18	0,00037	0,00002	
Total	23	0,00058		
Coef. variação (%)				11,96549

[—] Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** (p < 0,01) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* (p < 0,05) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F
ns Não significativo.

Tabela 3. Resumo da análise de variância da massa fresca da parte aérea (MFa) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl₂

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	0,00094	0,00047	1,0574 --
Exposição ao Cd (F2)	1	0,00079	0,00079	1,7897 --
Interação F1 x F2	2	0,00484	0,00242	5,4536*
Tratamentos	5	0,00657	0,00131	2,9623*
Resíduo	18	0,00798	0,00044	
Total	23	0,01455		
Coef. variação (%)				14,97448

-- Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** (p < 0,01) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* (p < 0,05) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns Não significativo.

Tabela 4. Resumo da análise de variância dos teores de clorofila a (Ca) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl₂

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	585,56348	292,78174	10,5029 --
Exposição ao Cd (F2)	1	2468,88735	2468,88735	88,5659 --
Interação F1 x F2	2	265,63208	132,81604	4,7645*
Tratamentos	5	3320,08290	664,01658	23,8201**
Resíduo	18	501,77290	27,87627	
Total	23	3821,85580		
Coef. variação (%)				7,75358

-- Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** (p < 0,01) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* (p < 0,05) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns Não significativo.

Tabela 5. Resumo da análise de variância dos teores de clorofila b (Cb) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl₂

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	4320,54576	2160,27288	144,7023 --
Exposição ao Cd (F2)	1	1466,40667	1466,40667	98,2248 --
Interação F1 x F2	2	1088,95106	544,47553	36,4708**
Tratamentos	5	6875,90348	1375,18070	92,1142**
Resíduo	18	268,72350	14,92908	
Total	23	7144,62698		
Coef. variação (%)				7,57302

-- Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** (p < 0,01) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* (p < 0,05) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns Não significativo.

Tabela 6. Resumo da análise de variância dos teores de clorofila total (Ca+b) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl₂

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	7916,64586	3958,32293	73,7953 --
Exposição ao Cd (F2)	1	8851,96860	8851,96860	165,0279 --
Interação F1 x F2	2	2475,23522	1237,61761	23,0730**
Tratamentos	5	19243,84968	3848,76994	71,7529**
Resíduo	18	965,50630	53,63924	
Total	23	20209,35598		
Coef. variação (%)				6,6808

-- Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** (p < 0,01) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* (p < 0,05) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns Não significativo.

Tabela 8. Resumo da análise de variância dos teores de cartenóides totais ($Cx+c$) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 μM de CdCl_2

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	115622,47390	57811,23695	30,7402 **
Exposição ao Cd (F2)	1	26288,68234	26288,68234	13,9786 **
Interação F1 x F2	2	15379,00840	7689,50420	4,0888*
Tratamentos	5	157290,16464	31458,03293	16,7273**
Resíduo	18	33851,50403	1880,63911	
Total	23	191141,66866		
Coef. variação (%)				15,11819

-- Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** ($p < 0,01$) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* ($p < 0,05$) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns Não significativo.

Tabela 9. Resumo da análise de variância da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 μM de CdCl_2

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	6362,05111	3181,02555	2,8365 --
Exposição ao Cd (F2)	1	469,66954	469,66954	0,4188 --
Interação F1 x F2	2	31429,16642	15714,58321	14,0124**
Tratamentos	5	38260,88707	7652,17741	6,8233**
Resíduo	18	20186,57473	1121,47637	
Total	23	58447,46180		
Coef. variação (%)				19,73251

-- Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** ($p < 0,01$) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* ($p < 0,05$) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns Não significativo.

Tabela 10. Resumo da análise de variância da atividade enzimática da catalase (CAT) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl₂

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	1545602,04641	772801,02320	193,9583 --
Exposição ao Cd (F2)	1	11561,06510	11561,06510	2,9016 --
Interação F1 x F2	2	63264,05781	31632,02890	7,9390**
Tratamentos	5	1620427,16932	324085,43386	81,3393**
Resíduo	18	71718,60318	3984,36684	
Total	23	1692145,77250		
Coef. variação (%)				18,58873

-- Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** (p < 0,01) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* (p < 0,05) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns Não significativo.

Tabela 11. Resumo da análise de variância da atividade das peroxidases (POX) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 µM de CdCl₂

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	414,39742	207,19871	75,0120 --
Exposição ao Cd (F2)	1	215,22070	215,22070	77,9162 --
Interação F1 x F2	2	52,34251	26,17125	9,4748**
Tratamentos	5	681,96064	136,39213	49,3780**
Resíduo	18	49,71972	2,76221	
Total	23	731,68036		
Coef. variação (%)				9,06025

-- Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** (p < 0,01) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* (p < 0,05) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns Não significativo.

Tabela 12. Resumo da análise de variância da peroxidação lipídica (MDA) em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculenum* Mill. cv. *Ailsa Craig*, *Notabilis complemented* e *Notabilis*) sob concentrações de 0 e 50 μM de CdCl_2

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	Teste F
Genótipos (F1)	2	22,12341	11,06170	26,8140 --
Exposição ao Cd (F2)	1	2,84970	2,84970	6,9078 --
Interação F1 x F2	2	3,05626	1,52813	3,7042*
Tratamentos	5	28,02937	5,60587	13,5889**
Resíduo	18	7,42562	0,41253	
Total	23	35,45500		
Coef. variação (%)				7,40426

-- Tratamentos são quantitativos. O teste F não se aplica

** ($p < 0,01$) Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

* ($p < 0,05$) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F
ns Não significativo.