

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



JOÃO MARCOS DE ARAUJO

**“ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS INDUZIDAS PELO  
CÁDMIO EM CÉLULAS DE *Saccharum officinarum* L. (CANA-DE-  
AÇÚCAR) E *Citrus aurantium* L. VAR. MURCOTE (LARANJA)  
CULTIVADAS EM SUSPENSÃO”**

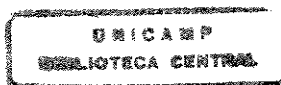
Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (a) candidato (a)  
*João Marcos de Araujo*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*27/03/2000*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Doutor em  
Biologia Celular e Estrutural, na área de  
Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

Campinas, 2000.



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

IDADE BC  
CHAMADA: UNICAMP  
Ar15a  
Cód. B. 41815  
Cód. 228/00  
Cód. 2411.00  
DATA 05-08-00  
CPD

CM-00142762-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Araujo, João Marcos de**

**Ar15a** Alterações morfofisiológicas induzidas pelo cádmio em células de *Saccharum officinarum* L. (Cana-de-açúcar) e *Citrus aurantium* L. *Var. Murcote (laranja)* cultivadas em suspensão/João Marcos de Araujo. - - Campinas, SP:[s.n.], 2000.  
108f: ilus

Orientador: Angelo Luiz Cortelazzo

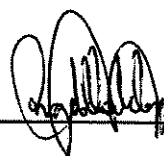
Tese(doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia.

1. Metais pesados em plantas. 2. Estresse ambiental. 3. Cádmio.  
I. Cortelazzo, Angelo Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Título.

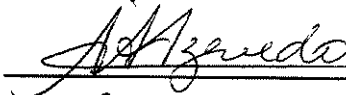
Data da Defesa: 27/03/2000

Banca Examinadora

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo (Orientador)



Profa. Dra. Aristéia Alves Azevedo



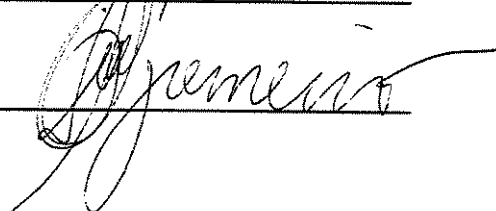
Profa. Dra. Sílvia Rodrigues Machado



Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

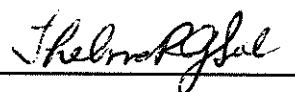


Profa. Dra. Sandra Maria Carmello-Guerreiro



Suplentes

Profa. Dra. Thelma Regina Gabriel da Silva



Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

*Este trabalho é dedicado à  
Mariana, minha mãe; Cida,  
Célia, Sérgio, Laura, Paulo e  
Mariângela, meus irmãos e ao  
mascote da casa, Bernardo.*

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Não se faz ciência sem parceria, disposição e principalmente bom senso, o que infelizmente não é aprendido nos bancos escolares e nem nas bancadas dos laboratórios. A questão financeira, muitas vezes, não é a barreira principal. Apesar das dificuldades impostas, ao alcançar mais este objetivo na minha vida profissional e também pessoal, necessário se faz lembrar que atingi-lo só foi possível graças ao apoio, colaboração e companheirismo ao longo desses últimos anos de instituições, profissionais e amigos. Espero retribuir com minha atividade de docência, pesquisa e extensão, como forma de compensação pelo apoio recebido, principalmente financeiro, pela experiência e conhecimentos adquiridos. Afinal, foi o contribuinte que de alguma forma garantiu este investimento. Expresso aqui minha gratidão a todos que contribuíram para a complementação de mais esta etapa.

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP;

Aos Docentes, Técnicos e Funcionários do Departamento de Biologia Celular/UNICAMP;

À Universidade Federal de Viçosa – UFV;

Ao Departamento de Biologia Geral/UFV, principalmente os colegas de trabalho do Setor de Biologia Celular e Biofísica;

À CAPES, que possibilitou através do Programa PICDT apoio financeiro;

Ao Professor Angelo Luiz Cortelazzo, meu orientador, amigo e exemplo de dedicação à universidade pública;

Às Professoras Mary Anne Heidi Dolder, Aristéa Alves Azevedo, Sílvia Rodrigues Machado, Sandra Maria Carmello-Guerreiro, Thelma Regina Gabriel da Silva e Marlene Aparecida Schiavinato, que de forma competente e com muito prazer, além de todas as sugestões, se dispuseram a participar da minha defesa;

Às Técnicas Klélia (Biologia Celular), Adriane e Antônia (Laboratório de Microscopia Eletrônica/IB/UNICAMP) e ao Técnico Paulo Aparecido Baldasso (Bioquímica), pela disposição e competência, além é claro da amizade;

Aos meus amigos, colegas de curso, companheiros de laboratório, que vai ser difícil citá-los, já que são muitos.

Meus sinceros agradecimentos.

# ÍNDICE

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo                                                                                                | 6  |
| Abstract                                                                                              | 8  |
| 1. Introdução                                                                                         | 9  |
| 2. Referencial Teórico                                                                                |    |
| 2.1. Caracterização do cádmio                                                                         | 12 |
| 2.2. Interação do cádmio com as plantas                                                               | 13 |
| 2.3. Mecanismos de resistência                                                                        | 19 |
| 2.4. Estudos estruturais e ultra-estruturais relacionados ao estresse<br>provocado por metais pesados | 22 |
| 3. Objetivos                                                                                          | 27 |
| 4. Materiais e Métodos                                                                                | 28 |
| 4.1. Processamento de material biológico para a microscopia de luz                                    | 29 |
| 4.2. Processamento do material biológico para microscopia<br>eletrônica                               | 36 |
| 4.3. Análise bioquímica                                                                               | 39 |
| 5. Resultados                                                                                         |    |
| 5.1. Células de <i>Saccharum officinarum</i> L. (cana-de-açúcar)                                      | 44 |
| 5.2. Células de <i>Citrus aurantium</i> L. (laranja)                                                  | 65 |
| 6. Discussão                                                                                          | 79 |
| 7. Conclusões                                                                                         | 95 |
| 7. Referências Bibliográficas                                                                         | 97 |

## RESUMO

O cádmio é considerado um elemento tóxico, pois afeta severamente a vida de muitos organismos, mesmo em baixas concentrações. Na célula, ele interage com proteínas e ácidos nucleicos e com isso, enzimas e/ou membranas são afetadas, interferindo em várias vias metabólicas importantes. Com o intuito de verificar os efeitos desse metal pesado na morfologia de células vegetais, foram utilizadas suspensões celulares de cana-de-açúcar e laranja, que receberam soluções de cloreto de cádmio  $8\mu\text{M}$  durante 4 a 72h de incubação. Os materiais foram fixados para a microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Foram ainda retiradas amostras para dosagens de proteínas e açúcares em cada experimento. As suspensões celulares de cana apresentaram os maiores danos em consequência do tratamento sendo nítida a presença de duas regiões: uma denominada região A, com células que tiveram contato direto com o agente estressante. Nela foram observados núcleos picnóticos, paredes celulares lignificadas ou com má formação. Na outra região, denominada B e correspondente a células que se desenvolveram na presença do metal, foram notados vacúolos compartimentalizados e outras vesículas, núcleos mais descompactados e com aumento no número de nucléolos. Houve ainda um aumento aparente no tamanho e quantidade de mitocôndrias. O complexo de Golgi foi observado com maior frequência e o retículo endoplasmático apresentou dilatação de suas cisternas. Na superfície das paredes celulares da região B foram notadas desfibrilações bastante evidentes à microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, sendo ainda bem contrastadas ao microscópio eletrônico de transmissão. O tratamento com cádmio provoca alterações significativas no conteúdo de proteínas, açúcares livres e solúveis, mas não na quantidade de amido presente nas células. Essas alterações em tratamentos mais longos tendem a retornar aos valores inicialmente obtidos, indicando uma resposta das células à situação imposta. Nos tempos de tratamento e nas concentrações de cádmio

utilizadas, as respostas obtidas foram mais evidentes nas células de cana-de-açúcar do que nas de laranja, tanto no que diz respeito aos danos provocados nas células, quanto às respostas das mesmas ao agente estressante.

## ABSTRACT

The cadmium is considered a toxic element, because it affects severely the life of many organisms, even in low concentrations. In the cell, it interacts with proteins and nucleic acids and with this characteristic, enzymes and/or membranes are affected, interfering in several important metabolic pathways. With the intention of verifying the effects of this heavy metal on the morphology of vegetable cells, cellular suspensions of sugar-cane and orange were used, which received solutions of cadmium chloride  $8\mu\text{M}$  during 4 to 72 hours of incubation. The materials were fixed for light microscopy, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. Samples were also removed samples for protein and sugars dosages in each experiment. The cellular suspensions of sugar cane presented the largest damages and as a consequence of the treatment, the presence of two clearly differentiated areas: one, denominated A area, with cells that had direct contact with the stressful agent and showed picnotic nuclei, lignified or with malformed cell walls. In the other area, denominated B and corresponding to cells that grew in the presence of the metal, with compartmentalized vacuoles and other vesicles, non-compacted and on increased number of nucleoli. There was still an apparent increase in the size and amount of mitochondria, Golgi complex, and endoplasmic reticulum presenting dilation of their cisterns. On the surface of the cell walls in this area, a quite evident fibrillation was noticed with light and scanning electron microscopy, also being strongly contrasted with the transmission electron microscopy. Cadmium treatments lead to significant alterations in protein content, free and soluble sugars, but not in the quantity of starch. The alterations, found in longer treatments, tend to return to the initial values, which indicates an adaptation to the culture conditions. For the treatment periods and cadmium concentrations used, the adaptation mechanisms are more evident in sugarcane cells than in orange, not only in relation to the alterations produced but also their adaptations to the stress agent.

## 1. INTRODUÇÃO

As conseqüências das atividades industrial e agroindustrial intensa e das grandes concentrações humanas nos centros urbanos estão expressas, na atualidade, através de grandes desequilíbrios na natureza, que levam ao desaparecimento de várias espécies de organismos vivos e coloca em risco a vida da própria espécie humana.

Apesar da grande preocupação dos ambientalistas com a situação atual e das inúmeras publicações científicas evidenciando os danos diversos dos agentes poluidores, muito ainda tem que ser feito de modo efetivo para enfrentar o problema.

A falta de uma política eficiente voltada para a proteção ambiental é notada pela pequena quantidade de materiais reciclados, pelos grandes depósitos de lixo doméstico e industrial, pelo volume de dejetos lançados sem tratamento nos mananciais, pelo uso abusivo de substâncias altamente tóxicas que poderiam ser substituídas por similares menos agressivos, pelo volume de gases tóxicos lançados na atmosfera, pela falta de estudos de impacto ambiental de organismos modificados geneticamente através das técnicas biotecnológicas, pela falta de controle da poluição sonora e visual e, principalmente, pela ausência de uma

consciência conservacionista dos cidadãos, que só pode ser gerada com o processo educativo, o que parece não ser prioridade nos tempos atuais.

Não faltam exemplos de grandes estragos causados ao meio ambiente pela atividade humana. Um dos grandes problemas enfrentados no momento, inclusive no Brasil, é a contaminação do ambiente por metais pesados, como o cádmio, chumbo, cobre, mercúrio, níquel e zinco (RODRIGUES, 1998). A poluição provocada por estes agentes difere em muito dos outros poluentes, já que não são degradados naturalmente (ROBARDS & WORSFOLD, 1991).

Dentre os metais citados, o cádmio é referido como sendo um dos mais tóxicos, podendo ser encontrado em ambientes aquáticos e terrestres (BAZZAZ *et al.*, 1974; SALIM *et al.*, 1992a). A contaminação do ser humano pode ocorrer devido à exposição prolongada na indústria e mineração. Porém, pelo fato do cádmio encontrar-se concentrado em diversos grãos, tubérculos, raízes, folhas e frutos, consumidos em grande quantidade pela espécie humana, pode estar havendo contaminação através da alimentação (SHERLOCK, 1984). Esta via passa então a ter importância, já que a ingestão de alimentos contaminados pode afetar a saúde dos humanos.

Existem inúmeros estudos que demonstram que o cádmio acumula-se no organismo sendo tóxico mesmo em concentrações baixas (SALIM *et al.*, 1992b). No organismo humano o cádmio se acumula, preferencialmente no fígado e nos rins (SCHOROEREDER & BALASSA, 1961; DEGRAEVE, 1981), sendo que os pulmões são a principal via de absorção (HALLENBECK, 1984). Os efeitos são sérios e podem resultar em doenças cardiovasculares, anemia, lesões ósseas, cerebrais e nefropatias que levam a proteinúria, aminoacidúria, glicosúria e hipercalcinúria, sendo que existem suspeitas de efeitos mutagênicos e teratogênicos (McCAULL, 1971; VALLEE & ULMER, 1972; PAGE & BINGHAM, 1973; SIROVER & LOEB 1976; HALLENBECK, 1984; FOULKES, 1990; WAALKES *et al.*, 1992; CARROL, 1996).

Uma das alternativas que pode minimizar os problemas com a poluição provocada pelo cádmio é o uso de plantas com capacidade de acumular o mesmo

em tecidos ou órgãos não comestíveis, já que a despoluição de grandes áreas agrícolas contaminadas é um processo inviável do ponto de vista prático.

Para que se possa ter êxito em programas de melhoramento de plantas visando tolerância a metais pesados, o conhecimento de mecanismos bioquímicos, características estruturais e ultra-estruturais, assim como do controle genético desta característica, é fundamental. Muito se conhece a respeito do comportamento das plantas face à presença de metais pesados (PRASAD, 1995). Porém, a grande parte deste conhecimento está concentrada, principalmente, no comportamento bioquímico destes elementos. Um outro fato é que muitas das pesquisas desenvolvidas com o estresse provocado por íons metálicos tóxicos, são conduzidas com plantas de alto valor econômico, onde a grande preocupação é a produção, deixando para um segundo plano o aspecto qualitativo do alimento produzido.

A integração das diferentes áreas do conhecimento científico torna-se imprescindível para o sucesso de pesquisas visando não só a geração de conhecimentos básicos, mas a aplicação destes conhecimentos na resolução de problemas importantes como a poluição ambiental provocada por metais tóxicos.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Caracterização do cádmio**

O cádmio é um metal cuja configuração eletrônica e estado de oxidação (+2), tem semelhança com o zinco e o mercúrio, que juntos formam o Grupo IIB da Tabela Periódica. Identificado em 1817, tem ponto de fusão a 321°C e ebulição a 765°C e, como o mercúrio, apresenta grande volatilidade. Na crosta terrestre, esse elemento químico ocorre em níveis que variam entre 0,1 e 0,2 ppm (EARL & VISH, 1979) e sua ocorrência natural resulta principalmente de erupções vulcânicas.

A utilização do cádmio é recente datando por volta de 1940, quando não era reconhecido como um elemento tóxico. Porém, em decorrência de diferentes atividades industriais nas últimas décadas, não é difícil deparar com o cádmio em proporções altamente tóxicas.

Diversas fontes contribuem para a contaminação do ambiente, tais como indústrias de mineração, fundição e refinamento de zinco, indústrias de pigmentos, de plásticos, metalurgias, galvanoplastia, a fabricação e uso de fungicidas, fertilizantes, resíduos de pneus, na queima de óleo combustível, de lubrificantes e

carvão mineral, assim como a lama resultante do lixo, tanto urbano como industrial (HAGHIRI, 1973; JACOBSON & TURNER, 1980). O cádmio é também muito utilizado na fabricação de baterias, de automóveis, na indústria aeroespacial, assim como em aplicações militares. Normalmente, onde alta estabilidade e resistência ao frio, calor e luz são requeridas, este metal aparece compondo as mais diversas ligas (PRASAD, 1995).

Muitos metais pesados como o ferro, cobre, cobalto, manganês, molibdênio e níquel são elementos essenciais para o metabolismo das plantas e são identificados como micronutrientes, pelo fato de serem requeridos em pequenas quantidades. Em altas concentrações, muitos desses metais pesados tornam-se tóxicos, provocando danos sérios aos vegetais. Em decorrência da poluição ambiental, o cádmio tende a se concentrar nos solos e sedimentos, onde é potencialmente disponível na região do sistema radicular das plantas.

O cádmio não é um elemento essencial para o crescimento das plantas, mas sim tóxico, mesmo em concentrações relativamente baixas. A toxicidade deste elemento torna-se mais grave pela sua natureza acumulativa (SALIM *et al.*, 1992b).

## **2.2. Interação do cádmio com as plantas**

A absorção do cádmio ocorre por difusão simples e não depende de uma concentração limiar, sendo que ele pode ser absorvido mesmo existindo apenas em pequenas quantidades (CABRERA *et al.*, 1992). Porém, diversos fatores podem influenciar na sua absorção, como pH, níveis de cálcio, outros metais pesados, etc. (BROWN & BECKETT, 1985).

O conhecimento do comportamento químico de íons metálicos permite a análise e o entendimento das interações destes com macromoléculas com função

biológica. Estes íons associam-se com moléculas orgânicas interagindo com o oxigênio, nitrogênio e enxofre.

O cádmio e o chumbo formam complexos mais estáveis com radicais que combinam nitrogênio e enxofre (N-S), sendo o enxofre o átomo que se liga ao metal. O cádmio tem uma alta afinidade pelo enxofre, reagindo fortemente com o mesmo. Com isso é esperado que alguns efeitos tóxicos deste íon resultem das reações do mesmo com grupamentos sulfidríla essenciais em proteínas. Para complexos envolvendo nitrogênio/nitrogênio (N-N) em grupos quelantes, a associação com o cádmio pode ser menos estável que com outros metais como níquel e cobre e, possivelmente, cobalto e zinco. Em complexos envolvendo oxigênio/nitrogênio (O-N), o cádmio pode ser menos estável que manganês, magnésio, cálcio ou mercúrio. Em complexos envolvendo oxigênio/oxigênio (O-O), o cádmio se associa de forma mais estável que magnésio, cálcio e possivelmente ferro (JACOBSON & TURNER, 1980).

O cádmio está posicionado logo abaixo do zinco na Tabela Periódica, sendo que estes dois elementos mostram-se similares do ponto de vista químico. Um número grande de enzimas que contém zinco no seu sítio ativo participa da síntese e função dos ácidos nucleicos. A habilidade do cádmio em afetar as propriedades de algumas dessas enzimas é bem discutida, porém, o mecanismo pelos quais as mesmas são afetadas ainda é desconhecido (JACOBSON & TURNER, 1980).

O cádmio e o cálcio têm cargas idênticas e os átomos são praticamente do mesmo tamanho o que leva à competição entre os mesmos. Além disso, o papel do cádmio em alterar a estrutura dos ácidos nucleicos tem relevância, uma vez que os íons metálicos formam um complexo metal/nucleotídeo, estável sob condições fisiológicas normais. Neste caso, a interação ocorre primeiramente com as bases nitrogenadas, formando ligações cruzadas e outros complexos desestabilizadores que perturbam por consequência as pontes de hidrogênio que mantêm a estrutura da dupla hélice. Com alterações deste porte é de se esperar

que a estrutura e as funções destas macromoléculas sejam seriamente afetadas (JACOBSON & TURNER, 1980).

A presença de íons cádmio pode induzir deficiências de íons essenciais, afetar o processo fotossintético, alterar a conformação de diferentes enzimas tornando-as inativas, provocar a ativação de outras enzimas como as peroxidases, afetar várias vias do processo de fosforilação oxidativa, alterar a fluidez das membranas pela alteração de seus constituintes químicos, afetar o processo de fixação biológica de nitrogênio, alterar a estrutura e função dos ácidos nucleicos, o que leva à inibição do crescimento das células e em consequência do crescimento e do desenvolvimento do vegetal.

Diversas espécies vegetais são afetadas pela presença do cádmio no solo. Dentre elas podemos citar algumas bem conhecidas como o amendoim (*Arachis hypogea* L.) "in vitro"; beterraba (*Beta vulgaris* L.); arroz (*Oryza sativa* L.); soja (*Glycine max* L.); feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.); milho (*Zea mays* L.); alface (*Lactuca sativa* L.) e ervilha (*Pisum sativum* L.) (PRASAD, 1995).

O cádmio é um inibidor de crescimento, principalmente do sistema radicular, tanto que esta característica muitas vezes é utilizada para monitorar áreas contaminadas (PRASAD, 1995).

Os sintomas e as consequências da toxidez em muitos casos são bem evidenciados. Em muitas espécies, seu acúmulo leva a redução do sistema radicular afetando, por consequência, a parte aérea. Em soja, por exemplo, cerca de 98% do cádmio acumulado pela planta fica retido fortemente nas raízes, enquanto que somente 2% são translocados para a parte aérea (CATALDO *et al.*, 1983).

Em outras espécies este íon transloca-se facilmente acumulando-se na parte aérea, mais precisamente nas folhas. Isto ocorre com a alface, sendo que algumas variedades chegam a acumular quase que a totalidade do cádmio absorvido na parte aérea, justamente a parte comestível deste vegetal (DAVIS, 1984).

Em plantas de cevada tratadas com cádmio ocorre redução da área foliar devido somente à diminuição no tamanho das células e dos espaços intercelulares (KRUPA *et al.*, 1993).

Em feijão-comum, a expansão das células e o conteúdo relativo de água nas folhas primárias decrescem cerca de 10% comparando-se com o controle após 48 h de exposição a 3µM de cádmio. Entretanto, o turgor da folha não é afetado (BARCELÓ & POSCHENREIDER, 1990). O cádmio nestas células foi encontrado associado com a parede celular e a lamela média, onde houve um incremento de ligações cruzadas de pectinas. Estas ligações possivelmente foram responsáveis pela inibição da expansão das células (POSCHENREIDER *et al.*, 1989).

A inibição do crescimento pode ser também devida, direta ou indiretamente, aos efeitos do cádmio no metabolismo de auxinas ou transportadores desse hormônio (BARCELÓ & POSCHENREIDER, 1990).

Com relação à fotossíntese, o cádmio primeiramente afeta os pigmentos fotossintéticos e, depois, as funções fotossintéticas. O conteúdo total de clorofila e a relação clorofila a/b decresce (KRUPA, 1988), sendo que a acumulação deste metal está associada com a redução da fotossíntese líquida e, geralmente, os pigmentos carotenóides são menos afetados pelos metais pesados que a clorofila. A relação linear entre a fotossíntese líquida e inibição da transpiração observada em algumas espécies, como soja, sugere o fechamento de estômatos devido à presença deste metal (HUANG *et al.*, 1974).

Em cevada (*Hordeum vulgare* L., cv. Hemus), o cádmio interferiu drasticamente no crescimento das plantas. Ocorreu redução de fotossíntese e na taxa de transpiração. A redução da atividade fotossintética nesta espécie se deveu principalmente à redução no teor de clorofila e pigmentos carotenóides (VASSILEV *et al.*, 1998).

KÜPPER *et al.* (1996) relatam que o átomo de magnésio da clorofila pode ser substituído por metais pesados como mercúrio, cobre, cádmio, níquel, zinco ou chumbo.

Com relação aos íons essenciais, OBATA & UMEBAYASHI (1997) observaram que as concentrações de potássio decresceram em plantas de feijão e de ervilha sensíveis ao cádmio. O manganês, outro micronutriente importante para as plantas, também teve sua concentração reduzida em arroz semi-resistente e milho, quando o cádmio foi adicionado na solução nutritiva das culturas hidropônicas. Como já comentado anteriormente, muitos íons são requeridos em pequenas quantidades pelos vegetais e são de extrema importância para o metabolismo celular. É de se esperar que a redução da concentração dos mesmos no meio intracelular, conseqüentemente, leve a várias alterações em vias metabólicas essenciais para a célula.

O cádmio também exerce sua toxicidade através de danos em membranas e inativação de enzimas, possivelmente através de reações com os grupamentos SH de proteínas (FUHRER, 1982).

Fosforibonuclease em folhas de espinafre e urease em soja são alguns exemplos de enzimas que são inibidas pela presença de cádmio (VALLEE & ULMER, 1972). Outras enzimas como amilase em malte e piruvato-decarboxilase em trigo têm suas atividades aumentadas quando da presença de cádmio (VALLEE & ULMER, 1972).

Nas plantas superiores a presença de metais pesados geralmente induz aumento na atividade peroxidásica. Elas são as principais enzimas na resposta das plantas ao estresse, sendo associadas aos mecanismos de defesa dos vegetais (KARATAGLIS *et al.*, 1991).

As peroxidases são glicoproteínas que apresentam em sua estrutura molecular um grupamento heme e participam de inúmeras rotas bioquímicas como a oxidação de vários compostos orgânicos. Nos vegetais, elas participam de processos de diferenciação celular, podendo-se citar a formação de ligações cruzadas entre compostos químicos que formam a parede celular e no processo de lignificação (MALDONADO & VANHUUSTEE, 1980). São também importantes no metabolismo de compostos aromáticos, além de respostas ao estresse, citado anteriormente. Existem inúmeras isoformas de peroxidases já encontradas em

diferentes espécies vegetais como ervilha, trigo, amendoim e outras (PAUL & STIGBRAND, 1970).

REDDY & PRASAD (1992) relataram que em plantas de arroz, o cádmio induz a atividade peroxidásica em raízes e folhas, sendo maior a atividade no sistema radicular. Em feijão-comum, além do aumento de peroxidases, outras enzimas como a enzima málica, glicose-6-P-desidrogenase, isocitrato desidrogenase e glutamato-desidrogenase, são incrementadas pela presença de cádmio (PRASAD, 1995).

O incremento na atividade das peroxidases é geralmente considerado como indicador de senescência. Além delas, ocorre aumento na atividade de enzimas hidrolíticas como ribonucleases, desoxirribonucleases e fosfatases ácidas. SHAH & DUBEY (1995), estudando o efeito do cádmio na atividade e isoformas de ribonucleases, em plântulas de arroz em crescimento e desenvolvimento, notaram que altos níveis deste íon reduzem algumas isoformas de precursores de RNases. Estas observações levaram os autores a sugerir a possibilidade de supressão de hidrólise de RNA nessas plantas.

As concentrações de açúcares e amido em folhas de *Betula*, *Picea* e *Pinus* foram altas em duas áreas industriais na Suécia poluídas por cádmio e traços de outros metais, sugerindo uma inibição na hidrólise do amido e glicose (BISHNOI *et al.*, 1993). Em beterraba (*Beta vulgaris* L. cv. Monohill) o cádmio interferiu no metabolismo de amido reduzindo a concentração do mesmo nesta espécie (GREGER & BERTELL, 1992).

Os efeitos do cádmio na atividade ATPásica e na fluidez da membrana plasmática foram estudados por FODOR *et al.* (1995). A atividade da ATPase "in vivo", devido ao tratamento com o cádmio, decresce 30% e 90%, respectivamente em trigo e girassol, em membranas isoladas das raízes. A atividade, assim como a fluidez também é afetada "in vivo". Estas alterações, possivelmente são resultado da interação do cádmio com proteínas da membrana.

### 2.3. Mecanismos de resistência

As plantas podem responder de diferentes formas à toxicidade do cádmio. Várias estratégias foram desenvolvidas ao longo do processo evolutivo a fim de reduzir a concentração de cádmio livre no citosol. A resistência a metais pesados pelas plantas pode ser explicada por dois meios: impedimento da entrada do íon (mecanismo de escape) ou criação de estratégias de sobrevivência na presença do mesmo (mecanismo de tolerância).

Com relação a este fato existe pouca informação disponível na atualidade. As plantas não têm muito controle sobre a absorção de cádmio, bastando para tanto a presença do mesmo no solo, mesmo em níveis relativamente baixos. Vários são os fatores que interferem na absorção do cádmio pelas plantas como o pH e a presença de outros íons. Ao que tudo indica, porém, as plantas parecem não apresentar mecanismos eficientes para impedir a entrada do referido elemento.

Muitas espécies vegetais, ao longo do processo evolutivo, desenvolveram mecanismos que possibilitaram às mesmas se estabelecerem com sucesso em áreas onde ocorre a presença do cádmio. Dentre os possíveis mecanismos de tolerância das plantas ao estresse provocado pela toxicidade deste metal pesado, podemos destacar alguns de maior importância como: ligação do metal à parede celular; efluxo ativo do metal; complexação do cádmio por proteínas específicas (fitoquelatinas) e compartimentalização do metal.

Dados recentes, obtidos por ANDRADE *et al.* (1999), mostraram que *Padina gymnospora*, uma espécie de alga parda, tem grande capacidade em acumular cádmio e zinco. Ao ser submetida a altas doses desses elementos, sob condições experimentais, esta espécie apresentou grânulos desses metais dispersos ao longo das camadas da parede celular. A retenção desses grânulos sugere ser um mecanismo de tolerância, o que possibilita a sobrevivência desta

espécie em áreas contaminadas como a Baía de Sepetiba no Estado do Rio de Janeiro, dada a impossibilidade desses metais atingirem o citosol.

As plantas podem responder a toxicidade, pelo efluxo ativo do íon do citoplasma para o meio extracelular. Pelo menos duas espécies tolerantes, *Lupinus albus* e *Tamarix aphylla*, eliminam o excesso de cádmio desse modo, com conseqüente gasto extra de energia (HAGEMEYER & WASEL, 1988; COSTA & MOREL, 1993).

É conhecido o fato de certas plantas acumularem e tolerarem especificamente níveis tóxicos de certos metais, através de mecanismos fisiológicos e bioquímicos. Muitas espécies vegetais desenvolveram com alta eficiência um sistema econômico de detoxificação para metais pesados. Entretanto, como este mecanismo de tolerância ainda não foi completamente elucidado, este é na atualidade, o principal foco de atenção dos pesquisadores envolvidos com o estudo da fisiologia do estresse induzido por estes elementos tóxicos.

Muita atenção tem sido dada a um grupo de proteínas de baixo peso molecular denominadas fitoquelatinas, pertencentes à classe III das metalotioneínas, como participantes do mecanismo de tolerância. O termo metalotioneína foi usado pela primeira vez em 1957 para descrever uma proteína isolada do córtex renal de eqüinos, que continha grande quantidade de enxofre e cádmio. Durante três décadas, várias proteínas dessa classe foram descritas em diversos organismos, estando as mesmas associadas com zinco, cobre ou cádmio, porém o último como agente estressante (ROBINSON *et al.*, 1993).

Em plantas a presença de cádmio complexado com proteínas, formadas por poli(γ-glutamil-cisteinil)-glicina, é conhecida desde a década de 80. Estes políptídeos e outros isopeptídeos γ-glutamil, nos quais a glicina está ausente ou substituída por β-alanina, foram designados metalotioneínas – Classe III (ROBINSON *et al.*, 1993). Estes componentes foram primeiramente identificados e caracterizados na levedura *Schizosaccharomyces pombe* e denominados de

cadistinas. Polipeptídios similares foram subsequenteiramente purificados de células de plantas em cultura e designados de fitoquelatinas.

A sequestração de metais pesados pelas fitoquelatinas confere proteção às proteínas, muitas delas com atividade enzimática e sensível a metais pesados, reduzindo assim a concentração dos íons tóxicos livres no citosol. Segundo ZENK (1996), a identificação de mutantes de *Arabidopsis thaliana* sensíveis a cádmio e deficientes em fitoquelatina-sintase demonstra de forma conclusiva a importância das fitoquelatinas na tolerância a metais pesados.

Além da espécie relatada acima, outras como *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum* e *Mimulus guttatus* são tolerantes ao cádmio devido à presença de MTgenes, ou seja, estas espécies são portadoras de informações genéticas que codificam para a síntese de metalotioneínas (MT) (PRASAD, 1995).

SANITÀ DI TOPPI *et al.* (1999) notaram que culturas axênicas de pêlos de raízes de cenoura (*Daucus carota*) tratadas com sulfeto de cádmio acumulavam rapidamente altas concentrações de cádmio. Como resposta, houve produção de etileno e de diferentes formas de fitoquelatinas, mostrando a importância destas moléculas no processo de detoxificação. Porém, segundo esses autores, a tolerância não se deve unicamente a produção de fitoquelatinas, mas a um conjunto de mecanismos como a exclusão do metal, compartimentalização, indução de outras proteínas de estresse, produção de etileno e peroxidases.

A compartimentalização dos íons cádmio, complexados com proteínas, parece ter grande importância como mecanismo de tolerância. Grânulos carregados de cádmio foram encontrados no citoplasma e no vacúolo, mas ausentes na parede celular e células da epiderme, em algumas plantas aquáticas (RAUSER & ACKERLEY, 1987).

A localização de cádmio em vacúolos, a síntese de fitoquelatinas e sua ligação com o metal ocorrem principalmente em raízes (GRILL *et al.*, 1989).

NAGEL *et al.* (1996) relataram que na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, a maior parte do cádmio utilizado no tratamento desta espécie foi encontrado no cloroplasto com valores superiores a 50%, enquanto que no citosol

apenas 10%. A porção predominante de fitoquelatinas também foi localizada no cloroplasto, o que sugere uma possível compartimentalização do cádmio associado a estas proteínas nos cloroplastos em algumas espécies. A despeito desses resultados, os mesmos autores comentaram que a síntese de fitoquelatinas, nas plantas, deve ocorrer no citosol e o complexo cádmio/fitoquelatina tem sido encontrado normalmente no citosol e nos vacúolos. Ao que tudo indica, a compartimentalização é dependente da associação do cádmio a fitoquelatinas.

Quando se cultivou *Nicotiana rustica* var. *Pavonii* em hidroponia, na presença de íons cádmio, os principais componentes do complexo Cd-proteínas foram (Y-Glu-Cys)<sub>3</sub>-Gly e (Y-Glu-Cys)<sub>4</sub>-Gly. A localização destes polipeptídeos foi determinada pelo isolamento de protoplastos e vacúolos de folhas de plântulas. Ambos, metalotioneínas – Classe III e íons cádmio foram encontrados em vacúolos (ROBINSON *et al.*, 1993).

Foram encontrados indícios de que há um transportador específico, designado de HMT1, requerido para a acumulação de grande quantidade de complexos Metalotioneínas – Classe III – Cádmio nos vacúolos de células de levedura *Schizosaccharomyces pombe* (ROBINSON *et al.*, 1993). Este fato contribui para reforçar a importância não só da complexação do cádmio com as fitoquelatinas, como mecanismo de tolerância, mas também desta associação para efeito de imobilização do íon dentro de um compartimento específico na célula.

## **2.4. Estudos estruturais e ultra-estruturais relacionados ao estresse provocado por metais pesados**

Apesar da grande quantidade de informações disponíveis com relação à bioquímica do estresse provocado pelo cádmio, ainda são poucas as informações

disponíveis com relação às alterações estruturais e ultra-estruturais induzidas pela presença deste íon tóxico nas plantas. Aliás, isto é válido para os metais pesados de uma forma geral.

Com relação às plantas de importância agrícola, grande parte das informações disponíveis está relacionada com a fisiologia do estresse. Para outras espécies, os estudos estruturais e ultra-estruturais relacionados ao estresse, estão voltados principalmente para plantas bioindicadoras de poluição ou de plantas bioacumuladoras de metais pesados. Geralmente, as últimas, crescem em áreas onde os níveis desses elementos são considerados elevados e, obviamente, elas exibem respostas positivas, com grande capacidade adaptativa a estas condições ambientais.

Na atualidade, maior atenção tem sido dada para estudos integrados de bioquímica, fisiologia e morfologia, levando a uma melhor compreensão de todo o processo.

Diante destes fatos, serão apresentados dados obtidos não só com o cádmio, mas com outros íons metálicos tóxicos, em razão das respostas serem semelhantes entre os diferentes metais pesados.

Três espécies de alga, *Melosira granulata*, *Fragilaria capucina* e *Anacystis cyanea* foram estudadas por SICKO-GOAD (1982), procurando identificar alterações estruturais e ultra-estruturais devidas à presença de cobre e chumbo. Estas espécies foram submetidas ao tratamento com estes dois elementos, com concentrações relativamente baixas, não com o objetivo de provocar uma toxidez profunda e causadora da morte das mesmas, mas sim uma leve sensibilização. Os resultados obtidos são interessantes, porque apesar das doses utilizadas (10ppb de chumbo e 5ppb de cobre) e o tempo (máximo 24 horas) relativamente curto, várias alterações morfológicas foram percebidas, mesmo não sendo significativas em períodos menores de exposição aos metais. Foram notadas alterações no volume do citoplasma, volume das mitocôndrias e dos cloroplastos, assim como no número de mitocôndrias. Foi notada também a presença de vesículas que foram identificadas como pertencentes à categoria de vacúolos

“autofágicos”. Foram observadas ainda, alterações nos tilacóides, presença de grânulos de ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico, de cianoficina e corpos poliédricos não identificados bioquimicamente (SICKO-GOAD, 1982).

HEUMANN (1987) desenvolveu estudos de alterações ultra-estruturais na alga *Chara vulgaris*, submetida ao tratamento com cádmio, mercúrio, chumbo orgânico e inorgânico, em condições experimentais. Doses subletais destes elementos causaram alterações na estrutura fina das células internodais. O cádmio e o chumbo inorgânico induziram desordens nas microfibrilas da parede celular, que causaram o aparecimento de protuberâncias. O mercúrio afetou diretamente a estrutura dos cloroplastos e das mitocôndrias causando ainda, a dilatação do retículo endoplasmático. O chumbo orgânico provocou danos no sistema de membranas do cloroplasto e também na membrana plasmática. Nenhum dos metais utilizados, nas condições experimentais consideradas neste estudo, causou alterações na ultra-estrutura do núcleo, apesar desta espécie ser muito sensível a baixas concentrações de íons tóxicos e longos tempos de exposição aos mesmos.

A influência de diferentes concentrações de vários metais pesados, como cádmio, cobalto, cobre, ferro, mercúrio, manganês, zinco e alumínio, na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico de *Lilium longiflorum* foi estudada por SAWIDIS & REISS (1995) utilizando microscopia de luz. As concentrações para estudos em microscopia de luz foram de 03, 10, 30 e 100 $\mu$ M. Também, foram realizados estudos ultra-estruturais com tubos polínicos tratados com cádmio, cobalto, ferro, mercúrio e manganês.

A germinação dos grãos de pólen foi afetada pelo cádmio a partir de 3 $\mu$ M. Em concentrações acima de 30 $\mu$ M, o cádmio, o cobre e o mercúrio foram extremamente tóxicos com grande redução na porcentagem de germinação.

A análise das células, ao microscópio de luz, revelou danos principalmente na parede celular que, como consequência, inibiu o crescimento do tubo polínico. O cádmio foi o principal elemento que causou danos no meio intracelular, com

distribuição anormal de organelas, provocando uma desorganização geral na estrutura da célula.

O efeito do chumbo foi estudado em células de raízes de *Allium cepa* L, por WIERZBICKA (1998). Foram observadas alterações na parede celular, que é o principal sítio de acumulação deste metal pesado nas plantas. A compartimentalização do vacúolo foi, também, uma alteração notada em observações realizadas ao microscópio de luz. As análises ultra-estruturais revelaram deposição de grande quantidade de material na parede celular, do lado voltado para a membrana plasmática. Em alguns casos, estes depósitos eram constituídos de chumbo, sendo encontrados também, depósitos intracelulares deste metal.

Alterações ultra-estruturais induzidas pelo cádmio foram observadas na cianobactéria *Nostoc* UAM208 por FERNANDEZ-PIÑAS *et al.* (1995). As células foram tratadas com cádmio com concentração final de íons livres de 4,89 e 6,36 $\mu$ M e tempo de tratamento variando entre 6 e 96 horas. As alterações observadas ao microscópio eletrônico foram: o desenvolvimento de grandes espaços dentro dos tilacóides, desorganização e degradação das membranas, incremento no número e tamanho dos corpos de polifosfato, aparecimento de grandes grânulos de cianoficina e, eventualmente, lise celular. Muitos destes danos foram observados no tempo mais curto e na concentração mais baixa, evidenciando, mais uma vez, o quanto o cádmio pode ser tóxico às células. Os danos foram mais pronunciados após 96 horas, com completa degradação das membranas dos tilacóides.

Muitos dos laboratórios que investigam toxicidade de cádmio em plantas vasculares empregam soluções com concentração variando entre 1 $\mu$ M a 3mM e com tempo de exposição que varia de três horas até cinco semanas. É possível notar que não existe um consenso com relação a essas condições experimentais. Isto pode ser justificado em função de diferentes objetivos pretendidos, da espécie estudada, do tipo celular e outros.

De um modo geral, os resultados indicam que as respostas por parte do vegetal podem ser rápidas, mesmo em se tratando de alterações morfológicas, e nesse sentido, estudos de toxicidade de cádmio “in vitro” utilizando culturas de células, podem ser relevantes para o entendimento de mecanismos de tolerância e também para a identificação de alterações morfológicas relacionadas ao estresse, além da possibilidade do controle das condições de crescimento, facilidade de manuseio e homogeneidade de toda a população de células.

### 3. OBJETIVOS

Com base nestes argumentos, o presente trabalho teve como objetivos:

Verificar alterações morfológicas em células de *Saccharum officinarum* L. e *Citrus aurantium* L., cultivadas “in vitro” após o tratamento com íons cádmio;

Identificar alterações citoquímicas provocadas pelo cádmio;

Identificar possíveis efeitos do cádmio no metabolismo de carboidratos nas duas espécies vegetais;

Identificar possíveis efeitos do cádmio no conteúdo protéico nas duas espécies vegetais;

Comparar as duas espécies estudadas, ou seja, uma monocotiledânea e uma dicotiledânea, com relação às respostas ao estresse.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Células em suspensão de *Saccharum officinarum* L. Clone 3286 (cana-de-açúcar) e *Citrus aurantium* L. cv. Murcote (Laranja) foram utilizadas, no presente estudo. Os calos da primeira espécie foram fornecidos pela Coopersucar, e os de laranja pelo Centro Nacional de Energia Nuclear para Agricultura, ambas sediadas no município de Piracicaba, SP, sendo obtidos a partir de células meristemáticas para as duas espécies.

Os calos foram introduzidos e mantidos no Laboratório de Culturas Vegetais do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, empregando-se meios para multiplicação conforme as Tabelas 01 e 02. As culturas foram mantidas na ausência de luz e temperatura ambiente de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

Como os experimentos foram conduzidos com culturas de células em suspensão, os calos foram submetidos à dissociação mecânica para obtenção de células de forma mais isolada possível. O meio foi o mesmo utilizado para as culturas sólidas, porém sem a presença do agar (Tabelas 01 e 02).

As culturas foram mantidas nas mesmas condições anteriores, sob agitação constante de 120rpm. As culturas foram repicadas no máximo até três

vezes, para obtenção de um volume maior de células, com o objetivo de atender ao número necessário de repetições, quando então foram submetidas ao estresse, adicionando-se às culturas 8 $\mu$ M de cloreto de cádmio (Sigma).

Foram instalados dois experimentos específicos, um para cada espécie, utilizando-se de Delineamento Experimental do tipo Inteiramente Casualizado (PIMENTEL GOMES, 1985). Os tratamentos foram determinados a partir de estes preliminares e compreenderam: controle, 04, 24, 48 e 72 horas de exposição das culturas ao agente estressante. Cada tratamento foi repetido três vezes, perfazendo um total de 15 parcelas experimentais. A parcela correspondeu a um frasco Erlenmeyer de 250ml, contendo 80ml de meio de cultura e células em suspensão.

Células de cada tratamento foram coletadas ao final de cada período, utilizando-se de filtração das culturas com filtros de porcelana e em baixo vácuo. Estas células foram utilizadas para a extração e dosagem de açúcares livres, açúcares solúveis, amido e proteínas totais. Para a microscopia de luz, eletrônica de transmissão e de varredura, as células foram coletadas diretamente no frasco de cultura com o auxílio de uma espátula.

#### **4.1. Processamento de material biológico para a microscopia de luz (KARNOVSKY, 1965, modificado)**

As células das duas espécies vegetais foram fixadas em solução contendo 4% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído, 3% de sacarose e 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 6,8. O tempo de fixação foi de 04 horas, sendo que as células foram lavadas em solução de 3% de sacarose, 5mM de cloreto de cálcio no mesmo tampão do fixador por cerca de 90 minutos.

Tabela 01 - Composição do meio para cultura de calos de cana-de-açúcar  
(*Saccharum officinarum* L.) (MURASHIGE and SKOOG, 1962)

**Solução estoque de macronutrientes**

| <b>Composto</b>                | <b>Quant. G/1000ml</b> |
|--------------------------------|------------------------|
| Cloreto de cálcio              | 5,87                   |
| Fosfato de potássio monobásico | 2,27                   |
| Nitrato de amônio              | 22,00                  |
| Nitrato de potássio            | 25,33                  |
| Sulfato de magnésio            | 4,93                   |

**Solução estoque de micronutrientes**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Ácido bórico        | 0,620  |
| Cloreto de cobalto  | 0,0025 |
| EDTA - Sódio        | 1,86   |
| Iodeto de potássio  | 0,083  |
| Molibdato de sódio  | 0,025  |
| Sulfato de cobre    | 0,0025 |
| Sulfato de manganês | 1,690  |
| Sulfato de zinco    | 0,860  |
| Sulfato ferroso     | 1,30   |

**Componentes orgânicos**

|                  |       |
|------------------|-------|
| Ácido cítrico    | 0,15  |
| Ácido nicotínico | 1,0   |
| Glicina          | 2,0   |
| Mio-inositol     | 100,0 |
| Piridoxina       | 1,0   |
| Sacarose         | 20,0  |
| Tiamina          | 10,0  |

**Outros componentes**

|                        |      |
|------------------------|------|
| Ágar                   | 10,0 |
| Clavulin (Antibiótico) | 0,25 |

pH final ajustado para 5,8

Tabela 02 - Composição do meio para cultura de calos de laranja (*Citrus aurantium* L.) (MURASHIGE and TUCKER, 1969)

**Solução estoque de macronutrientes**

| <b>Composto</b>                | <b>Quant. g/1000ml</b> |
|--------------------------------|------------------------|
| Cloreto de cálcio              | 29,33                  |
| Fosfato de potássio bibásico   | 1,00                   |
| Fosfato de potássio monobásico | 7,50                   |
| Nitrato de amônio              | 82,5                   |
| Nitrato de potássio            | 95,0                   |
| Sulfato de magnésio            | 18,5                   |

**Solução estoque de micronutrientes**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Ácido bórico        | 0,6200 |
| Cloreto de cobalto  | 0,0025 |
| EDTA - Sódio        | 7,4500 |
| Iodeto de potássio  | 0,0830 |
| Molibdato de sódio  | 0,0250 |
| Sulfato de cobre    | 0,0025 |
| Sulfato de manganês | 1,6800 |
| Sulfato de zinco    | 0,8600 |
| Sulfato ferroso     | 5,5700 |

**Componentes orgânicos**

|                  |      |
|------------------|------|
| Ácido nicotínico | 0,50 |
| Extrato de malte | 0,50 |
| Glicina          | 0,20 |
| Glicose          | 50,0 |
| Mio-inositol     | 10,0 |
| Piridoxina       | 1,00 |
| Tiamina          | 1,00 |

**Outro componente**

|      |      |
|------|------|
| Ágar | 8,00 |
|------|------|

pH final ajustado para 5,8

As células foram tratadas a seguir com a mesma solução acima, acrescida de 0,15M de glicina e mantidas por 12 horas em temperatura de 4°C. Após, as células foram lavadas novamente em tampão cacodilato 0,1M, pH 6,8, três vezes de 30 minutos sendo a seguir lavadas rapidamente em água destilada.

As células foram desidratadas em etanol partindo-se de concentração de 70% até 100% e postas para infiltração com resina Leica 7026, utilizando-se da mistura etanol absoluto/resina nas proporções de 3:1, 2:1, 1:1 e 1:2, com tempo de duas horas em cada etapa e, finalmente, por 12 horas em resina pura. O material biológico foi emblocado em molde de gelatina com capacidade para 200µl de resina, sendo que os mesmos foram polimerizados à temperatura ambiente sob vácuo por cerca de 90 minutos.

Os blocos foram preparados para microtomia e obtidos cortes semifinos com 2µm de espessura em Ultramicrotomo LKB ULTROTOME III 8800, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular/IB/UNICAMP.

Cerca de oito cortes foram distendidos sobre cada lâmina, aderidos por aquecimento, e submetidos a diferentes métodos de coloração e citoquímica. Para evitar possíveis interferências nos testes citoquímicos foram realizados controles para cada reação.

As lâminas foram levadas à observação em microscópio de luz comum e luz polarizada, marca Olympus, modelo BX60 do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular/IB/UNICAMP. Os registros fotográficos foram feitos em negativo Kodak Gold 100 e em papel Kodak Royal.

#### **4.1.1. Coloração pelo Azul de Astra e Safranina (BUKATSCH, 1972; modificado).**

Para a análise morfológica das células, os cortes inicialmente foram tratados com solução aquosa de Safranina 1% durante 90 segundos em temperatura ambiente. Após, os cortes foram lavados em água corrente por três vezes, seguindo-se de uma lavagem em etanol 70% e outra em água destilada. A seguir, os cortes foram tratados com solução de Azul de Astra 1% por 90 minutos em estufa com temperatura de 37°C; lavados em água corrente por três vezes e em seguida em água destilada. Os cortes foram então desidratados em etanol 95% e 100%, diafanizados em xilol e montados com Entellan.

#### **4.1.2. Azul de Toluidina (AT) pH 4,0 (VIDAL, 1977).**

Para detecção de radicais aniônicos e metacromasia, os cortes foram submetidos à coloração pelo Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine, pH 4,0 durante 15 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se três banhos rápidos em água destilada. Os cortes foram secos ao ar, diafanizados em xilol durante dez minutos e montados com Entellan.

#### **4.1.3. Floroglucinol acidificado (HERR Jr., 1992)**

Com o objetivo de identificar a lignina, os cortes foram tratados com uma solução de cloreto de cálcio 20%, floroglucinol 1% e ácido clorídrico 16%. A

solução recém preparada, filtrada em lâ-de-vidro, foi gotejada sobre os cortes, que rapidamente foram cobertos com laminula. O excesso de solução corante foi removido com auxílio de papel de filtro e, as lamínulas vedadas com esmalte. As lâminas semipermanentes foram levadas à observação logo após a montagem.

#### **4.1.4. Reação de Feulgen (MELLO & VIDAL, 1978)**

Para análise morfológica dos núcleos das células, os cortes foram inicialmente submetidos à hidrólise em solução de ácido clorídrico 5N por 30 minutos em temperatura ambiente e lavados a seguir em água destilada por três vezes de cinco minutos. Os cortes distendidos sobre as lâminas, foram secos ao ar e, posteriormente, incubados com Reativo de Schiff durante 30 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz.

Os cortes foram lavados em água sulfurosa (água, solução aquosa de ácido clorídrico 1N e solução de metabissulfito de sódio 10%, na proporção de 18:1:1 (v/v/v)) por três vezes de cinco minutos cada e após, em água destilada. Os cortes foram desidratados em etanol 95% e 100% durante dois minutos em cada um, diafanizados em xilol e montadas com Entellan.

#### **4.1.5. Fast-Green Alcalino (TAS *et al.*, 1980)**

Com o propósito de identificar as proteínas básicas que se associam ao DNA nuclear, os cortes foram tratados com solução aquosa de ácido tricloroacético 5% (TCA) recém preparado, durante 15 minutos, a 90°C. Após, os

cortes foram tratados com TCA 5%, recém preparado, frio e a seguir, lavados várias vezes em água destilada.

Para coloração, os cortes foram tratados durante 30 minutos com Fast-Green 0,1%, pH 8,0, preparado em solução aquosa de fosfato de sódio monobásico 0,005M. Após, foram lavados várias vezes em água destilada, desidratados em etanol 95% e 100%, cinco minutos em cada um, diafanizados em xilol por 10 minutos e montados com Entellan.

#### **4.1.6. Método AgNOR (HOWELL & BLACK, 1980)**

Com o objetivo de evidenciar os nucléolos, empregou-se o método da impregnação pela prata. Para tanto, os cortes foram tratados com as seguintes soluções:

Solução A: Solução aquosa de gelatina 2% e ácido fórmico 1%, preparada sob temperatura de 60°C;

Solução B: Solução aquosa de nitrato de prata 50%.

As soluções A e B foram gotejadas sobre os cortes na proporção de 1:2, respectivamente. Procedeu-se a mistura das soluções, sendo os cortes em seguida cobertos com lamínula e levados à estufa, a 60°C, por sete a oito minutos. A seguir, a lamínula foi removida com um jato de água destilada e os cortes foram secos ao ar, diafanizados em xilol por dez minutos e montados com Entellan.

#### **4.1.7. Método do P.A.S. (MAIA, 1979).**

Com o objetivo de identificar polissacarídeos neutros e glicoproteínas, os cortes foram inicialmente oxidados em solução aquosa de ácido periódico 0,5%

durante nove minutos, à temperatura ambiente. Após, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas ao ar, e tratadas com Reativo de Schiff (MELLO & VIDAL, 1978) durante 30 minutos, na ausência de luz e temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes durante três minutos em água sulfurosa (Vide 4.1.4). Os cortes foram desidratados em etanol 95% e 100% por dois minutos em cada um, diafanizados em xilol por dez minutos e as lâminas montadas com Entellan.

#### **4.1.8. Xylidine Ponceau (XP) pH 2,5 (VIDAL, 1970).**

Para detecção de radicais catiônicos, os cortes foram submetidos à coloração com solução de Xilidine Ponceau 0,1%, pH 2,5 em solução de ácido acético 3% (v/v) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas em ácido acético 3% (v/v) durante 30 minutos, após em água destilada por cinco minutos. Os cortes foram desidratados em etanol 95% e 100% por cinco minutos em cada um, diafanizados em xilol durante dez minutos e as lâminas montadas com Entellan.

### **4.2. Processamento do material biológico para microscopia eletrônica**

#### **4.2.1. Microscopia eletrônica de transmissão**

Para estudos da ultra-estrutura celular, células das duas espécies vegetais foram fixadas em solução contendo 4% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído,

3% de sacarose e 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 6,8 (KARNOVSKY, 1965, modificado). O tempo de fixação foi de 18 horas à temperatura de 4°C, e a seguir os materiais foram lavados em solução de cacodilato de sódio 0,1M, acrescido de 3% de sacarose e 5mM de cloreto de cálcio por 120 minutos, com trocas com intervalos de 15 minutos.

A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1%, utilizando-se da mesma solução utilizada na lavagem anterior, porém acrescida de ferricianeto de potássio 0,8%, por um período de quatro horas à temperatura de 4°C. A seguir as células foram lavadas em tampão cacodilato e após, em água destilada, sendo desidratadas partindo-se de acetona 50% até 100%.

As células foram embebidas em mistura de Spurr (SPURR, 1969) com acetona e finalmente emblocadas em resina pura. Os blocos foram levados para polimerização em estufa à temperatura de 60°C, por 48 horas.

Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo LEICA MT-ULTRACUT, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, e dispostos sobre telas de cobre de 200 mesh. A contrastação foi realizada tratando-se os cortes com solução aquosa de acetato de uranila 2%, por 20 minutos para a laranja e por 25 minutos para a cana-de-açúcar. A seguir, os cortes foram lavados em água destilada deionizada durante várias vezes e postos para secagem por cerca de 90 minutos. Após, foram tratados com citrato de chumbo 0,2% em solução de hidróxido de sódio 1N, por cinco minutos para a laranja e por dez minutos para a cana-de-açúcar. A seguir, os cortes foram lavados em água destilada deionizada e postos para secagem ao ar. Após 24 horas, os cortes foram submetidos à cobertura com carbono no High Vacuum Coating System – MED 020 da BAL-TEC, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/Unicamp.

As telas foram levadas à observação em microscópio eletrônico de transmissão (MET), marca Zeiss, modelo LEO 906 do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP. Os registros fotográficos foram feitos em negativo KODAK 4489 e papel Kodabrome Print RCF3.

#### **4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (TANAKA, 1989, modificado)**

Para a obtenção de imagens tridimensionais das células das duas espécies estudadas, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 6,8, acrescida de 3% de sacarose. O tempo de fixação foi de 12 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem, com tampão cacodilato, as células pré-fixadas foram tratadas com solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%, no mesmo tampão do fixador, por 12 horas em temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas em água destilada, desidratadas em soluções de concentração crescente de acetona, partindo-se de 30% até 100%, e levadas à secagem, ao ponto crítico no Critical Point Dryer – CPD 020 da BALZERS.

Após a montagem das células em “stubs” apropriados, procedeu-se a deposição metálica, utilizando-se do Sputter Coater SCD 050 da BALZERS, ambos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP.

As amostras foram levadas a observação ao microscópio eletrônico de varredura, marca JEOL, modelo JSM 5800LV do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP. Os registros fotográficos foram feitos em filme T-MAX 100 e em papel Kodabrome Print RCF3.

### 4.3. Análise bioquímica

#### 4.3.1. Carboidratos

Inicialmente, células coletadas das duas espécies, por filtração em filtros de porcelana em baixo vácuo, foram liofilizadas e maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó homogêneo, que foi mantido em dessecador em ausência total de umidade.

Para a dosagem de açúcares livres, açúcares solúveis e amido, foi adotada a metodologia conforme o exposto no esquema 01.

As amostras foram tratadas com 5ml de uma mistura de álcool metílico, clorofórmio e água (MCA), na proporção de 12:5:3 (v/v). As amostras foram agitadas até completa homogeneização e mantidas em geladeira por 24 horas. Após, procedeu-se à centrifugação das amostras durante dez minutos a 3.000 rpm em centrífuga Excelsa 3, marca FANEN. Os precipitados foram ressuspensos em 5ml de MCA e levados a nova centrifugação, conforme descrito anteriormente.

Os sobrenadantes foram recolhidos após as duas centrifugações, quantificados e estocados em geladeira, para posterior dosagens de açúcares livres. Os precipitados foram ressuspensos em álcool etílico 10%, agitados até completa homogeneização e centrifugados por dez minutos a 3.000rpm. Os sobrenadantes foram, então, recolhidos, quantificados e estocados para posterior dosagem de açúcares solúveis (SCOTT & MELVIN, 1953).

Por fim, os precipitados obtidos com a centrifugação anterior, foram ressuspensos em 5ml de ácido perclórico 30% (PCA), segundo McCREADY *et al.* (1950), agitados e mantidos por cinco horas em geladeira. Após, as amostras foram centrifugadas, nas mesmas condições anteriores, e os precipitados novamente ressuspensos em 5ml de PCA, centrifugados e os sobrenadantes

das duas centrifugações foram recolhidos, quantificados e, mantidos em geladeira, para posterior dosagem de amido.

As dosagens de açúcares livres, açúcares solúveis e amido foram realizadas utilizando-se o reagente antrona, que resulta da mistura de 100ml de ácido sulfúrico concentrado e 200mg de antrona (McCREADY *et al.*, 1950). Os sobrenadantes obtidos após as centrifugações com MCA, álcool etílico 10% e PCA 30% foram separados em alíquotas de 1ml e acrescidos de 2ml do reagente antrona. A mistura foi realizada em tubos de ensaios, que foram levados ao aquecimento em banho-maria a 100°C por cinco minutos (SCOTT & MELVIN, 1953).

Após, os tubos foram resfriados rapidamente e as amostras levadas para leituras em espectrofotômetro em 620nm. Foram necessárias diluições para a análise de açúcares livres e amido, sendo que para tanto, utilizou-se água destilada.

Para a quantificação dos carboidratos, utilizou-se reta padrão obtida com soluções aquosas de glicose nas concentrações de zero, 10, 20, 40, 60 e 80µg/ml. Para o amido foi utilizado o fator de correção (0,9) segundo McCREADY *et al.* (1950).

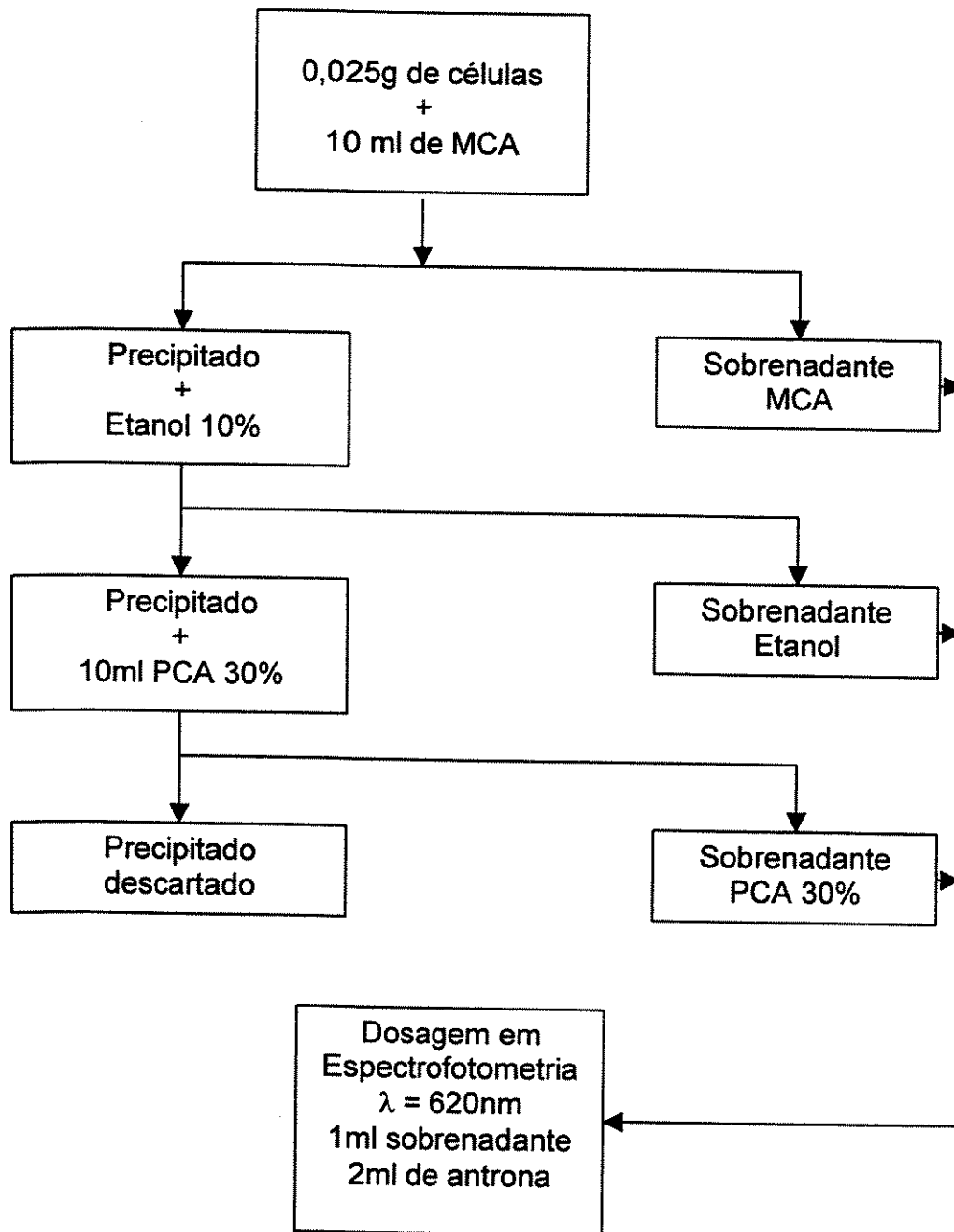
Os valores obtidos em porcentagem de açúcares livres, açúcares solúveis e amido na matéria seca, foram submetidos à análise de variância, segundo STEEL & TORRIE (1980) e as suas médias comparadas pelo Teste de Tukey 5% (PIMENTEL GOMES, 1985).

#### **4.3.2. Proteínas totais**

As células liofilizadas, conforme o descrito no item 4.3.1. foram utilizadas para a dosagem de proteínas solúveis em hidróxido de sódio (NaOH) conforme o exposto no Esquema 02.

## ESQUEMA 01

Extração e dosagem de açúcares livres, açúcares solúveis e amido.



Inicialmente, foram pesadas amostras de 0,05g de células de cana-de-açúcar e amostras de 0,025g de células de laranja. As amostras foram tratadas com 5ml de MCA, agitadas até completa homogeneização e mantidas em temperatura de 4°C, por 24 horas. Após, procedeu-se à centrifugação das amostras durante dez minutos a 3.000rpm. Os precipitados foram ressuspensos em 5ml de MCA, agitados e submetidos à nova centrifugação.

Os precipitados obtidos na segunda centrifugação foram ressuspensos em solução aquosa de NaOH 0,1N recém preparada, agitados até completa homogeneização e deixados durante toda noite em temperatura de 4°C. Após, foi realizada a primeira extração com a centrifugação da amostra durante dez minutos a 3.000rpm. O sobrenadante foi quantificado e reservado. Os precipitados foram ressuspensos novamente em 5ml de solução de NaOH 0,1N, agitados, procedendo-se a seguir nova centrifugação para obter o segundo extrato, que foi quantificado e reservado. Os precipitados foram novamente ressuspensos em NaOH 0,1N, agitados e centrifugados para a obtenção do terceiro extrato.

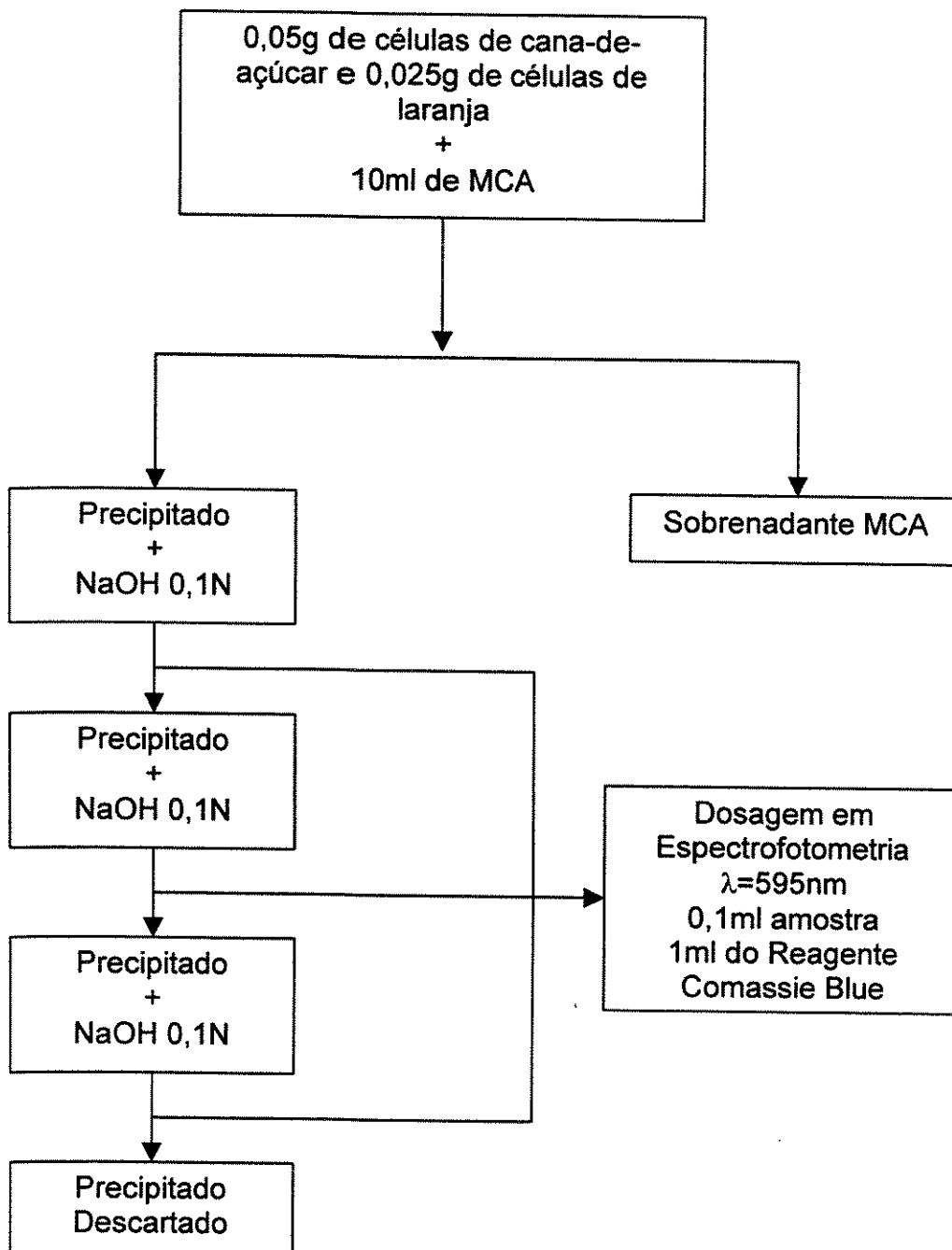
De cada extrato foi retirado uma alíquota de 0,1ml e acrescido de 1ml do Reagente Comassie Blue (BRADFORD, 1976). As amostras foram levadas para leituras em espectrofotômetro em 595nm. Foram necessárias diluições para a análise de proteínas totais, sendo que para tanto, utilizou-se solução de NaOH 0,1N.

Para a quantificação das proteínas totais, utilizou-se reta padrão obtida com concentrações de zero, 10, 20, 40, 60, 80 e 100µg/ml de soroalbumina bovina – BSA (Sigma), diluídas em solução aquosa de NaOH 0,1N.

Os valores obtidos, em porcentagem de proteínas totais na matéria seca, das duas espécies estudadas foram submetidos à análise de variância, segundo STEEL & TORRIE (1980) e as suas médias comparadas pelo Teste de Tukey 5% (PIMENTEL GOMES, 1985).

## ESQUEMA 02

Extração e dosagem de proteínas solúveis em Hidróxido de Sódio (NaOH)



## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Células de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar)**

#### **5.1.1. Microscopia de luz**

Foram observadas alterações morfológicas nas células em todos os tempos estudados, com maior evidência nos tempos mais longos de exposição ao cloreto de cádmio.

As culturas foram constituídas em grande parte de aglomerados de células que formam grumos, maiores e menores que podem conter centenas de células, sendo que as divisões celulares ocorrem intensamente na periferia, região esta que se encontra diretamente em contato com o meio de cultura.

Após 72 horas de tratamento com cloreto de cádmio, dentro dos agregados celulares foram observadas duas regiões distintas: a região previamente existente e que foi arbitrariamente denominada de região A e a região formada a partir das

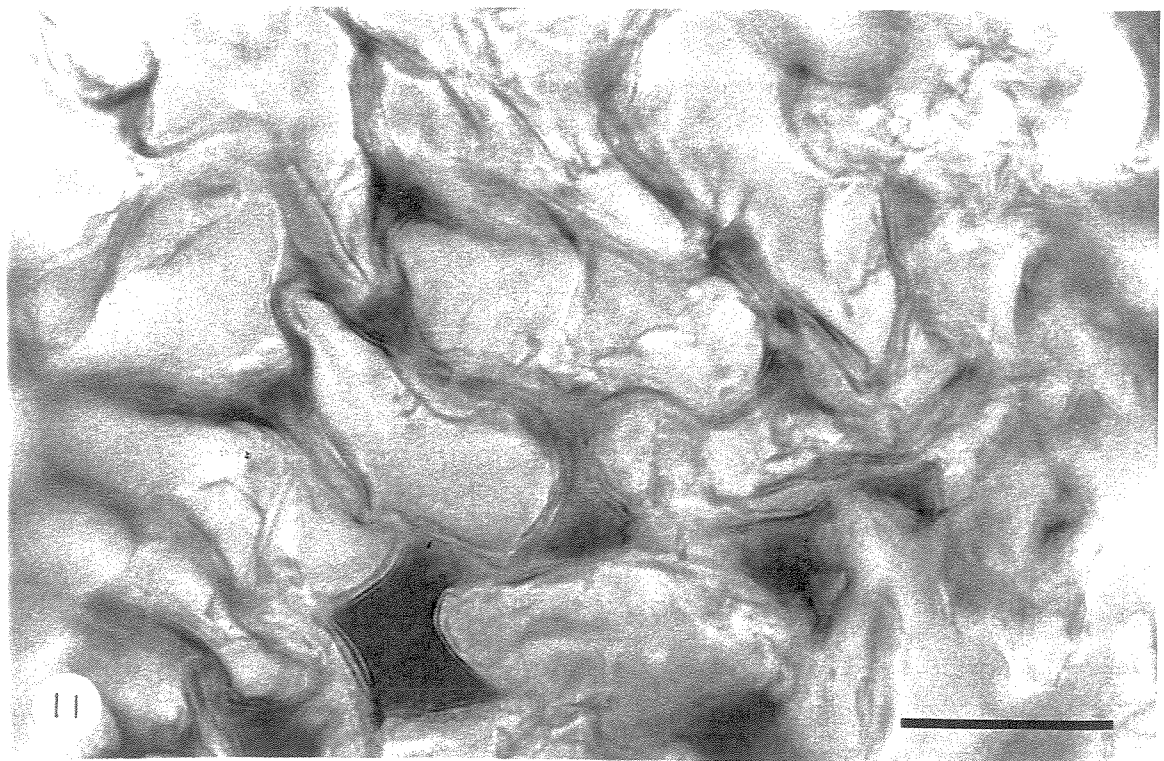
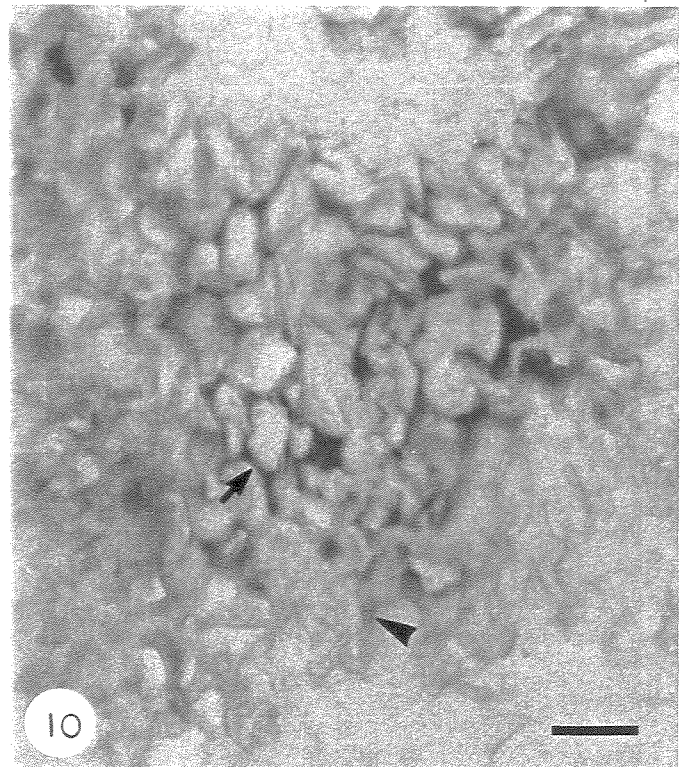
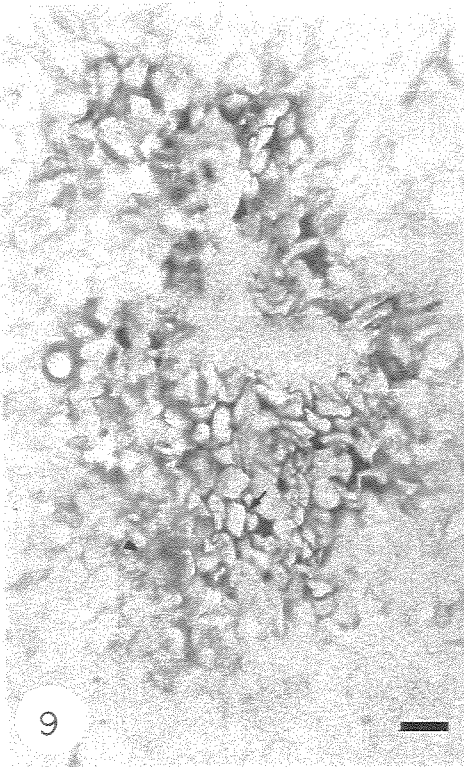
**Prancha 3 Células de *Saccharum officinarum* L. tratadas com floroglucina.**

**Figs 9:** Células tratadas por 24 horas com cloreto de cádmio. As células exibem paredes celulares fortemente coradas em vermelho (→) e células com paredes alaranjadas ( ▶ ). Observa-se que as células com paredes vermelhas formam uma espécie de halo no grumo. Estas células correspondem às células da região Intermediária, entre as regiões A e B.

**Fig. 10:** Detalhe em maior aumento das células que reagem positivamente ao reagente. Células com paredes fortemente coradas em vermelho ( ➡ ) devido à presença de lignina e células com paredes alaranjadas ( ► ).

**Fig. 11 :** Detalhe das paredes das células lignificadas.

Figs. 9 e 10 – Barra = 40µm e Fig. 11 - = 20µm.



**Prancha 4** Cortes de células de *Saccharum officinarum* L. submetidas à reação de Feulgen.

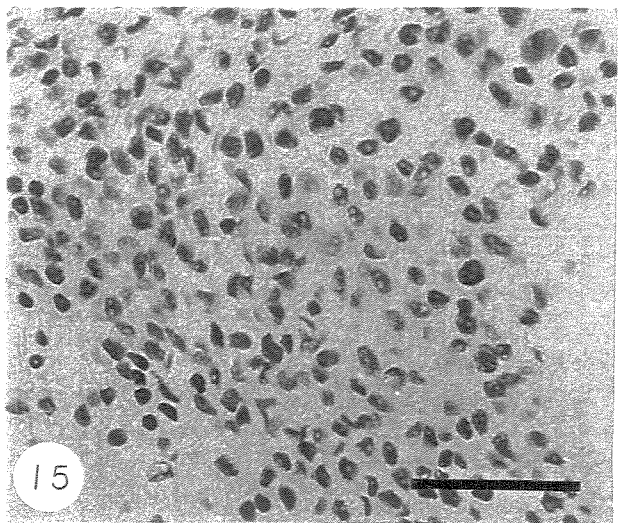
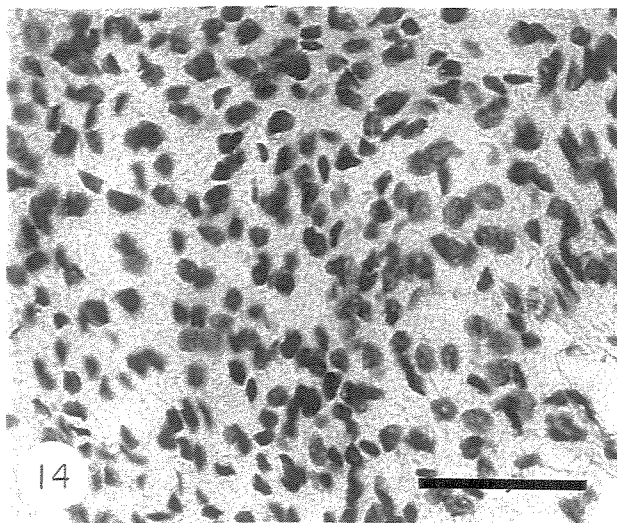
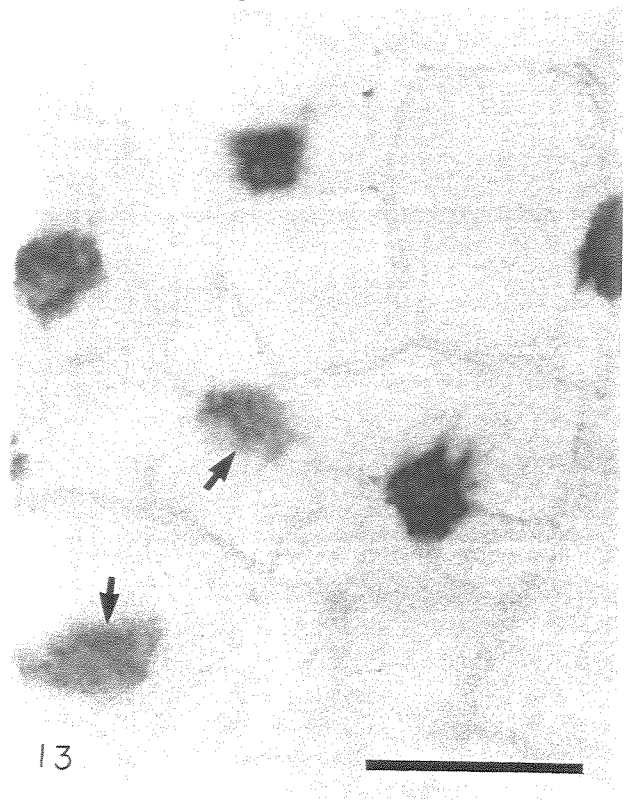
**Fig. 12:** Células controle. Núcleos esféricos, corados uniformemente com evidência da região Feulgen negativa ( → ).

**Figs. 13:** Células tratadas com cloreto de cádmio por 4 horas. Os núcleos são irregulares quanto à forma e coloração. Observa-se que ocorre degradação da cromatina ( ➡ ).

**Fig. 14:** Células tratadas com cloreto de cádmio por 48 horas. Estes núcleos que reagem positivamente ao reagente são esféricos na sua maioria, sendo possível observar a região Feulgen negativa. Os mesmos pertencem às células da região denominada de B, ou seja, de células que se multiplicaram na presença dos íons cádmio.

**Fig. 15:** Células tratadas com cloreto de cádmio por 72 horas (Região B).

Figs. 12 e 13 – Barras = 20µm e Figs. 14 e 15 – Barras = 40µm.



Com o tratamento de 4 horas (Fig. 13), a reação nos revelou núcleos deformados, com aparente degradação da cromatina. Núcleos fortemente corados, esféricos e com duas ou mais regiões Feulgen negativas, puderam ser observados (Figs. 14 e 15) para materiais com 48 e 72 horas de incubação com cádmio, respectivamente.

Na Prancha 5 podem ser observados os resultados obtidos com a coloração pelo fast-green alcalino. As células controle (Fig. 16) exibiram fraca reação ao corante, apresentando núcleos com coloração levemente esverdeada. Após a adição do cloreto de cádmio, a reação revelou aumento gradativo de núcleos com reação positiva, o que pode ser notado após 4 h (Fig. 17), 24 h (Fig. 18) e 72 h (Fig. 19) de incubação.

No controle o método da impregnação pela prata (AgNOR) revelou células com núcleos amarelados e nucléolos com coloração marrom bem evidente, além da parede celular levemente enegrecida (Fig. 20).

Nos aglomerados celulares após 72 horas de tratamento com cloreto de cádmio, na região A, houve uma resposta negativa à impregnação enquanto, na região B, são observadas células com núcleos amarelados, de coloração intensa e nucléolos fortemente destacados (Fig. 21). De forma mais detalhada (Fig. 22), observa-se a presença de mais de um nucléolo por núcleo em células tratadas. Nota-se ainda a presença de conteúdo citoplasmático corado, vacúolo e detalhe dos nucléolos nas células tratadas após 72 horas (Fig. 23).

Nas células-controle submetidas à Reação do P.A.S. (Fig. 24) apenas as paredes celulares apresentaram uma reação uniforme ao método. O corte de células tratadas revelou reação positiva ao P.A.S. somente para as paredes celulares na região A e células com conteúdo citoplasmático corado e paredes mais espessas e positivas na região B. Entre as duas regiões, foram observadas células com conteúdo citoplasmático fortemente corado e paredes celulares mais espessas que nas regiões A e B (Fig. 25).

**Prancha 5 Cortes de células de *Saccharum officinarum* L. coradas com fast-green alcalino.**

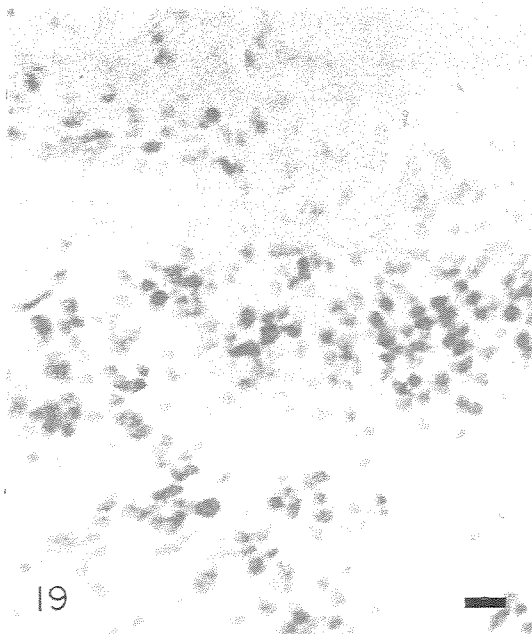
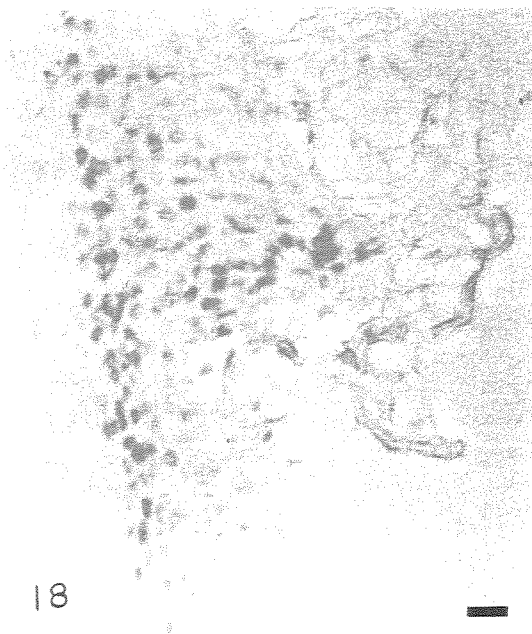
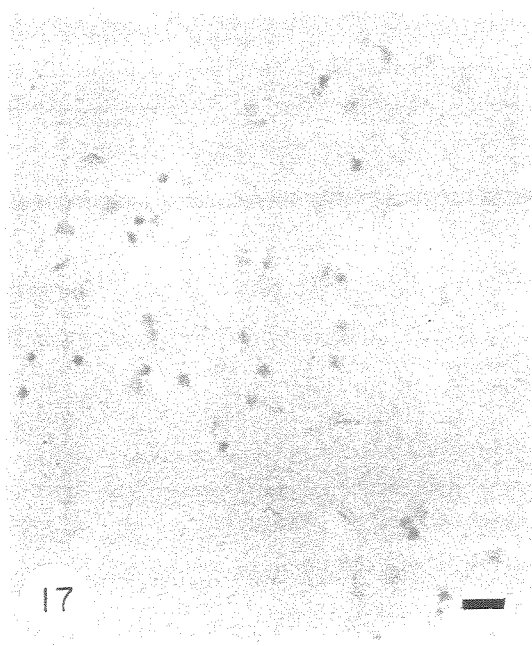
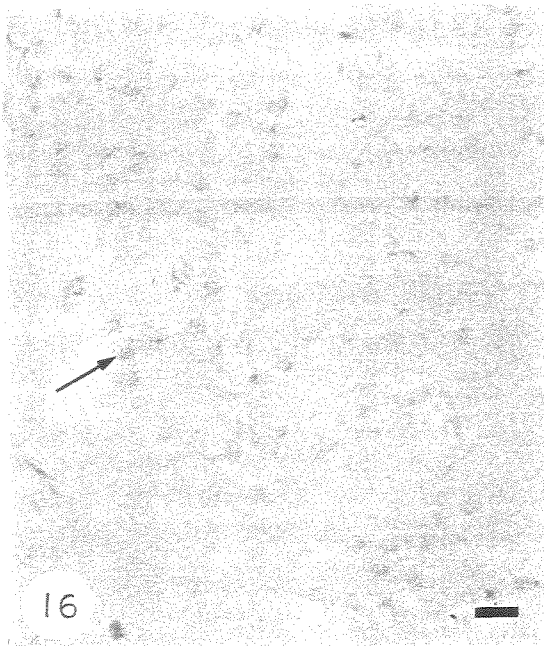
**Fig. 16** – Células controle. Ocorre fraca reação do núcleo ao corante com coloração levemente esverdeada ( → ).

**Figs. 17:** Células tratadas por 4 horas com cloreto de cádmio. Núcleos de células da região B.

**Fig. 18:** Células tratadas por 24 horas com cloreto de cádmio. Os núcleos exibem forte reação ao corante. Devido à espessura do corte, ocorre sobreposição de núcleos, o que leva a diferenças de intensidade de coloração. Os núcleos aqui observados pertencem a células da região B.

**Fig. 19:** Células tratadas por 72 horas com cloreto de cádmio. Observa-se um número maior de núcleos corados, isto devido ao tempo de tratamento, o que permite obter um número maior de células que se multiplicaram na presença dos íons cádmio. Núcleos de células da região B.

**Figs. 16-19** – Barras = 4 $\mu$ m.



**Prancha 6 Cortes de células de *Saccharum officinarum* L. submetidas ao método AgNOR.**

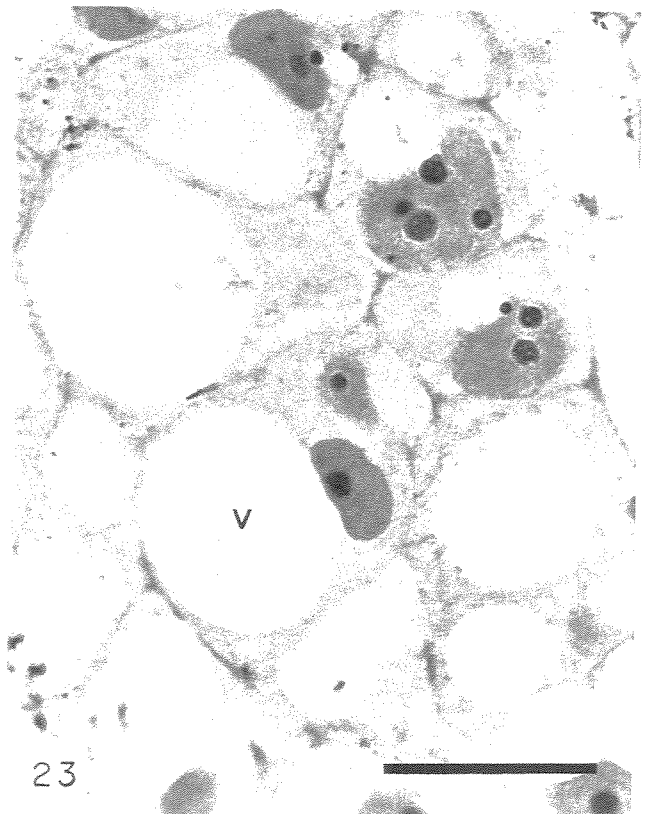
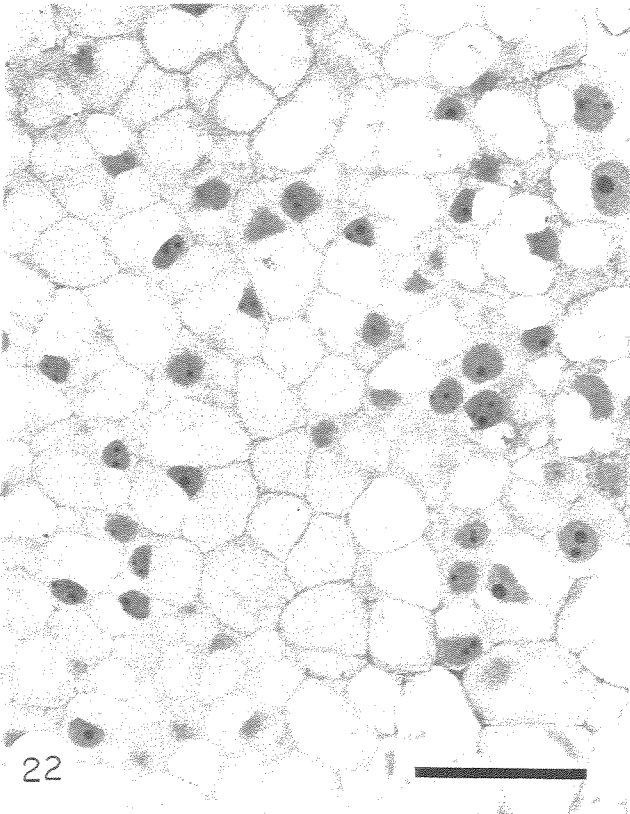
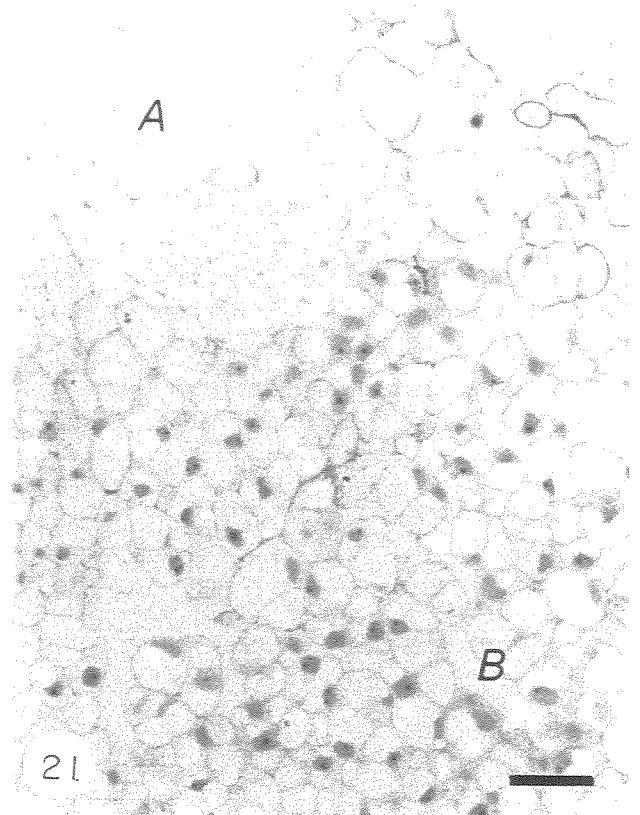
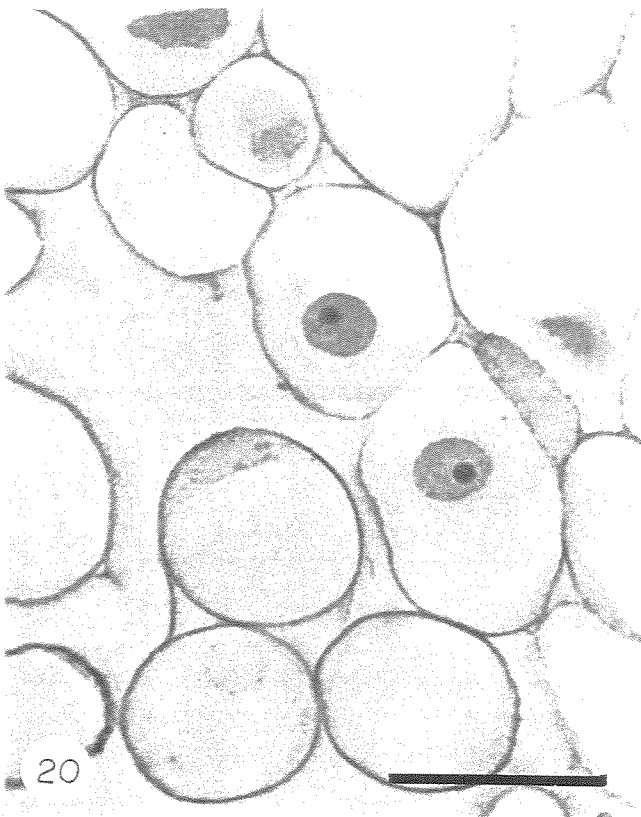
**Fig. 20:** Células controle. Núcleos esféricos corados em amarelo com nucléolo único corado em marrom. As paredes celulares estão coradas em marrom escuro e pouco conteúdo citoplasmático corado.

**Fig. 21:** Células tratadas com o cloreto de cádmio após 72 horas. Observa-se a presença das regiões A e B, interior e periferia do gramo respectivamente. Na região A, núcleos, nucléolos, conteúdo citoplasmático e paredes celulares não apresentam coloração. Na região B observam-se células com paredes e conteúdo citoplasmático levemente corado. Os núcleos são evidentes corados em amarelo, com nucléolos corados em marrom.

**Fig. 22:** Células da região B. Observam-se núcleos descompactados corados em amarelo com nucléolos corados em marrom. Nota-se a presença de mais de um nucléolo por núcleo.

**Fig. 23:** Detalhe em maior aumento de células da região B. Os nucléolos são de diâmetro irregular, observa-se a presença de conteúdo citoplasmático corado em amarelo. É possível identificar claramente a presença do vacúolo (V).

Figs. 20 e 23 – Barras = 40 $\mu$ m e Figs. 21 e 22 – Barras = 40 $\mu$ m.



**Prancha 7 Cortes de células de *Saccharum officinarum* L. submetidas à reação do PAS.**

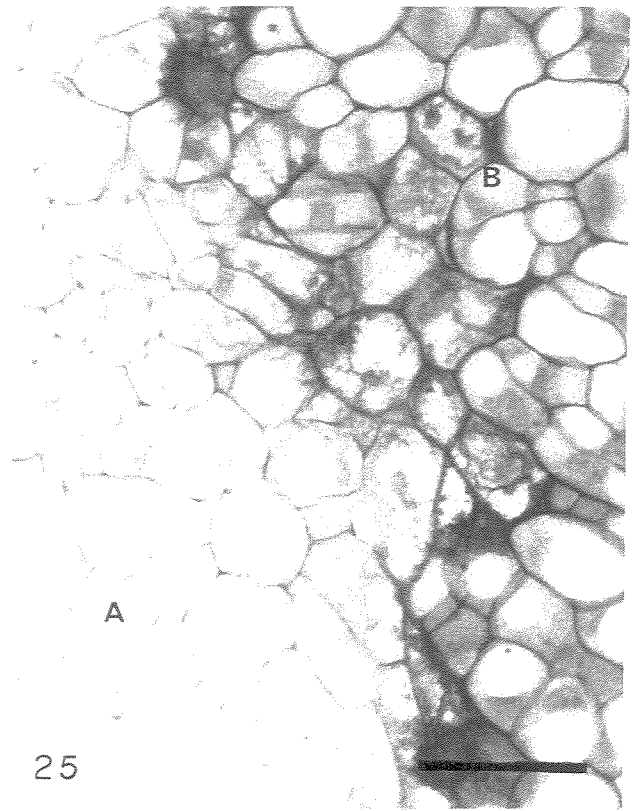
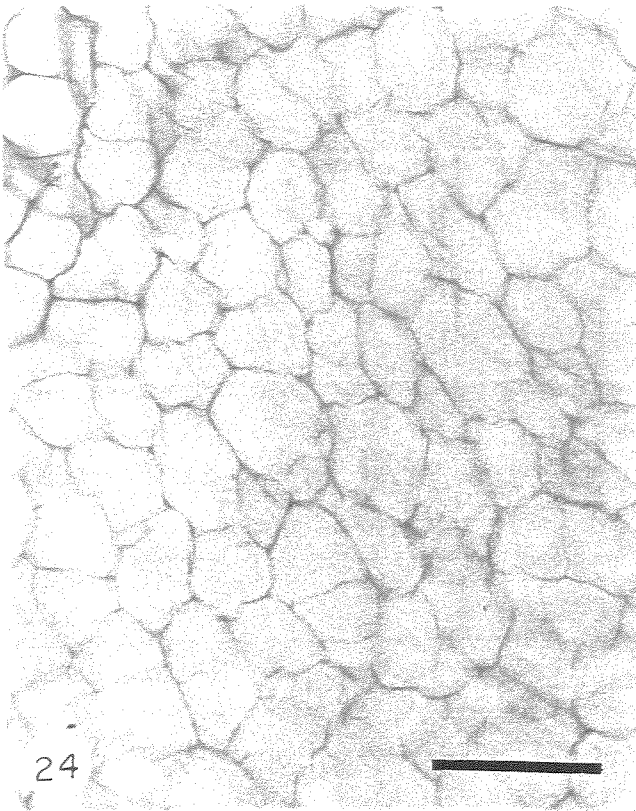
**Fig. 24:** Células controle. Paredes celulares coradas levemente em magenta, conteúdo citoplasmático não apresenta reação positiva ao reagente de Schiff.

**Figs. 25:** Células tratadas com cloreto de cádmio por 72 horas. Reação positiva das paredes celulares das células da região A (interior do grumo) e B (região periférica do grumo), porém as últimas com paredes mais espessas e conteúdo citoplasmático corado. Na região intermediária entre A e B, observam-se células com conteúdo citoplasmático de aspecto granular com reação positiva.

**Fig. 26:** Células da superfície de um grumo tratado com cloreto de cádmio por 72 horas, com material de aspecto fibrilar na superfície externa da parede celular, que é espessa. Nota-se que a célula está em final de divisão.

**Fig. 27:** Célula da superfície de um grumo tratado com cloreto de cádmio por 72 horas. Observa-se a presença de grânulos de secreção corados em magenta.

Figs. 24 e 25 – Barras = 40 $\mu$ m e Figs. 26 e 27 – Barras = 20 $\mu$ m.



A análise mais detalhada das paredes celulares intensamente coradas da região B revelou material com aspecto fibrilar na superfície externa das células (Fig. 26). Além disso, nas porções mais periféricas dessa região, foram observadas células cujo citoplasma mostrou grânulos com reação positiva ao reagente (Fig. 27), e quando observados em microscopia de luz polarizada não apresentaram o padrão típico observado para grãos de amido.

Os resultados dos materiais corados pelo xylidine ponceau (XP) encontram-se na Prancha 8. Nas células controle, apenas o núcleo e a parede celular mostraram reação positiva ao corante (Fig. 28). Com o período mais longo de exposição ao cádmio, foram verificadas regiões distintas nos agregados como nos demais métodos, correspondendo às regiões A e B (Fig. 29). Na região A, a reação ao XP foi fraca para os núcleos e praticamente negativa para as paredes celulares. Porém, na região B foram observadas células com grande quantidade de material citoplasmático corado, além dos núcleos e nucléolo. As células da região B podem ser observadas em detalhe na Figura 30.

Com o maior tempo de tratamento com cloreto de cádmio, na maioria das células observa-se, claramente, a compartimentalização do vacúolo, os núcleos e os nucléolos com reação positiva, assim como o conteúdo citoplasmático. Observou-se ainda a presença de grânulos intensamente corados (Fig. 31), que se destacam no citosol. Confirmando os resultados anteriores, a modificação que mais chamou a atenção na região mais periférica dos agregados do material tratado foi a compartimentalização do vacúolo das células.

**Prancha 8 Cortes de células de *Saccharum officinarum* L. submetidas coradas com xylidine ponceau (XP) pH 2,5.**

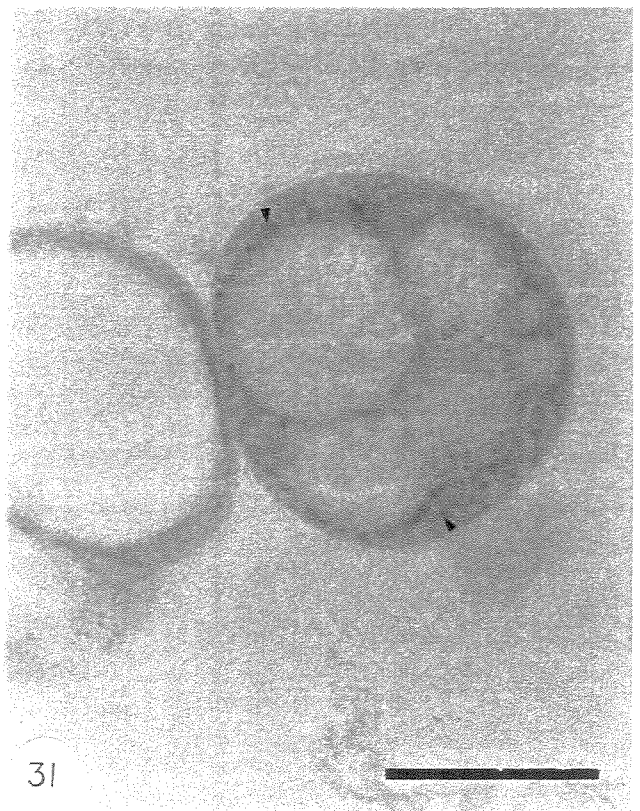
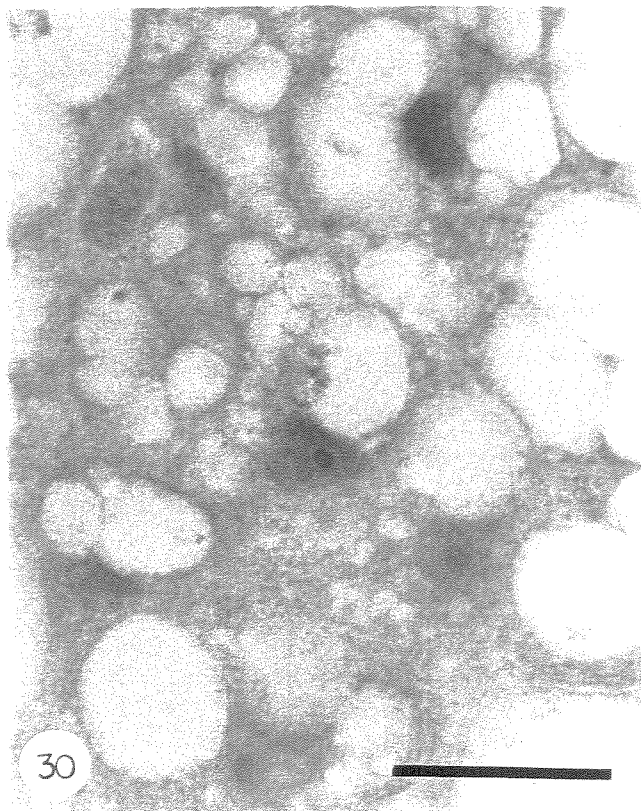
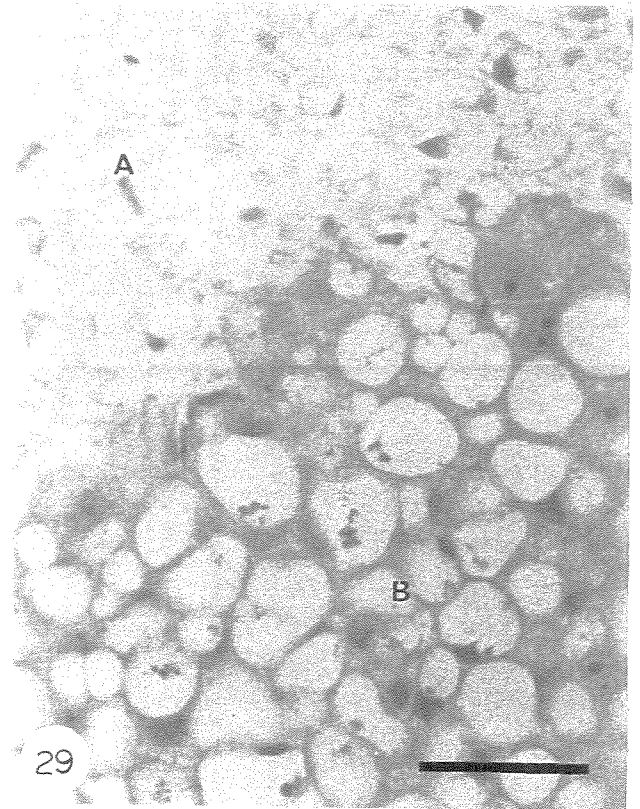
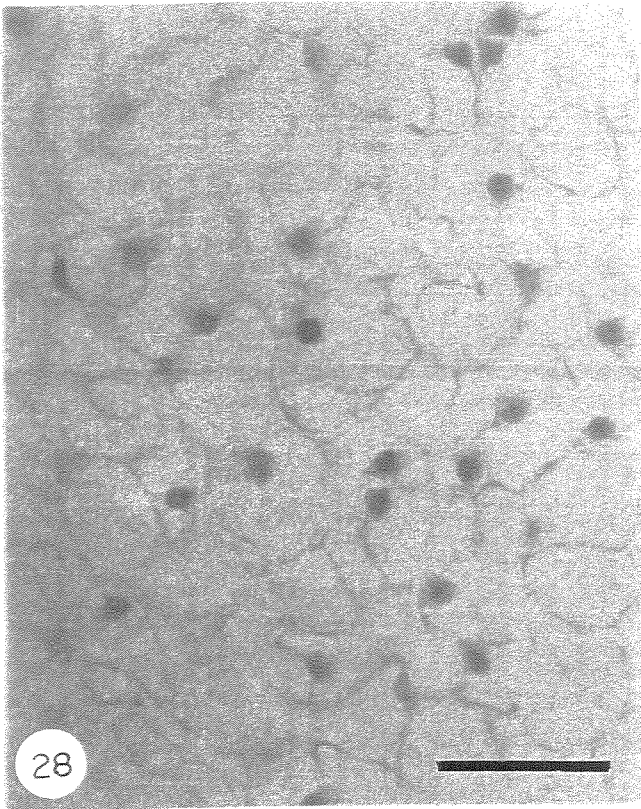
**Fig. 28:** Células controle. Reação positiva ao corante das paredes celulares e núcleos, que são esféricos, não sendo possível identificar a presença de nucléolos. Não se observa conteúdo citoplasmático corado.

**Fig. 29:** Células tratadas com cloreto de cádmio por 72 horas. Observam-se duas regiões distintas: A região A que corresponde ao interior de um grumo e B a região periférica. Na região A somente alguns núcleos reagem positivamente ao corante. Não se observa reação positiva de paredes celulares e conteúdo citoplasmático. Na região B, observam-se células que se multiplicaram na presença do agente estressante. Nota-se reação positiva de núcleos, paredes celulares e conteúdo citoplasmático.

**Figs. 30:** Detalhe de células da região B tratadas após 72 horas de exposição ao agente estressante. Reação forte ao corante, principalmente do conteúdo citoplasmático das células. Os núcleos são ovalados com possibilidade de identificação do nucléolo e vacúolo compartimentalizado.

**Fig. 31:** Célula da periferia de grumo tratado por 72 horas com cloreto de cádmio. Observa-se a compartimentalização do vacúolo e a presença de pequenos corpos protéicos corados na região citoplasmática ( ► ).

Figs. 28 e 29 – Barras = 40µm e Figs 30 e 31 – Barras = 20µm.



### 5.1.2. Microscopia eletrônica

A ultra-estrutura das células, tanto do material controle quanto do tratado com o cloreto de cádmio, pode ser observada nas Pranchas 9 e 10, respectivamente.

No controle (Fig. 32), foram observadas células com um único vacúolo, sendo o maior compartimento celular, ocupando um grande volume. O núcleo foi visualizado próximo à parede celular, com um formato variando de esférico a ovóide, com grande quantidade de cromatina condensada e exibindo apenas um nucléolo, também esférico. No citoplasma, foi notada a presença de grânulos eletrondensos. Em algumas regiões, houve uma leve retração do conteúdo citoplasmático, salientando os espaços periplasmáticos entre a membrana plasmática e a parede celular.

As organelas mostraram-se distribuídas pelo citoplasma de maneira uniforme, ocupando o pequeno espaço entre a membrana do vacúolo e a membrana plasmática. O retículo endoplasmático granular (Fig. 33) apresentou um arranjo característico, onde as cisternas se reúnem de forma paralela ou circular. As mitocôndrias sempre numerosas, não apresentaram um padrão característico quanto à forma, sendo bastante irregulares e com uma matriz mitocondrial eletrondensa.

As células do controle não apresentaram plastos diferenciados, sendo observados apenas, ocasionalmente, proplastídeos. Além disso, não foram observados complexos de Golgi em nenhum corte de material controle.

A análise do material em microscopia eletrônica de varredura (Fig. 35) revelou células esféricas, com regularidade de tamanho e com deposição de algumas estruturas de forma fibrilar em sua superfície.

**Prancha 9. Células controle de *Saccharum officinarum* L. observadas em microscopia eletrônica.**

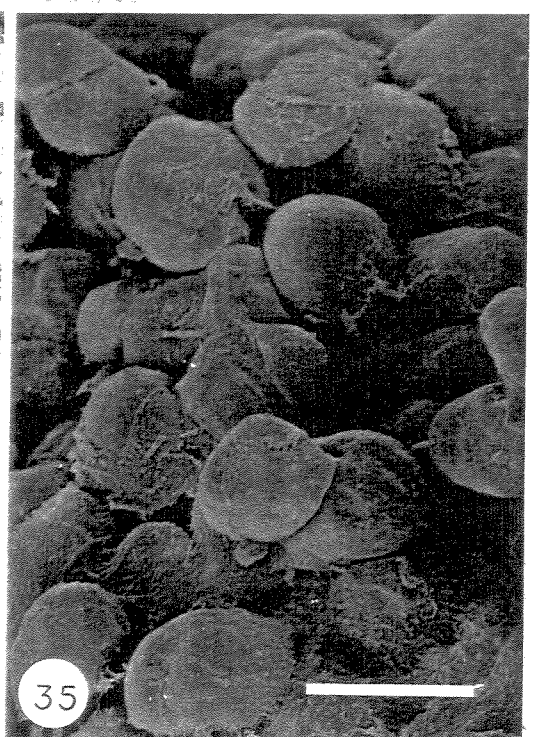
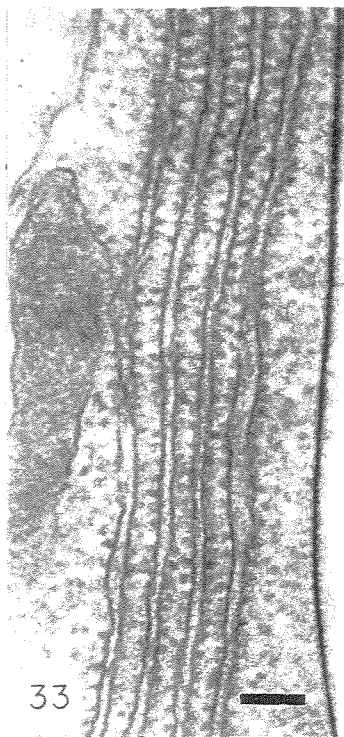
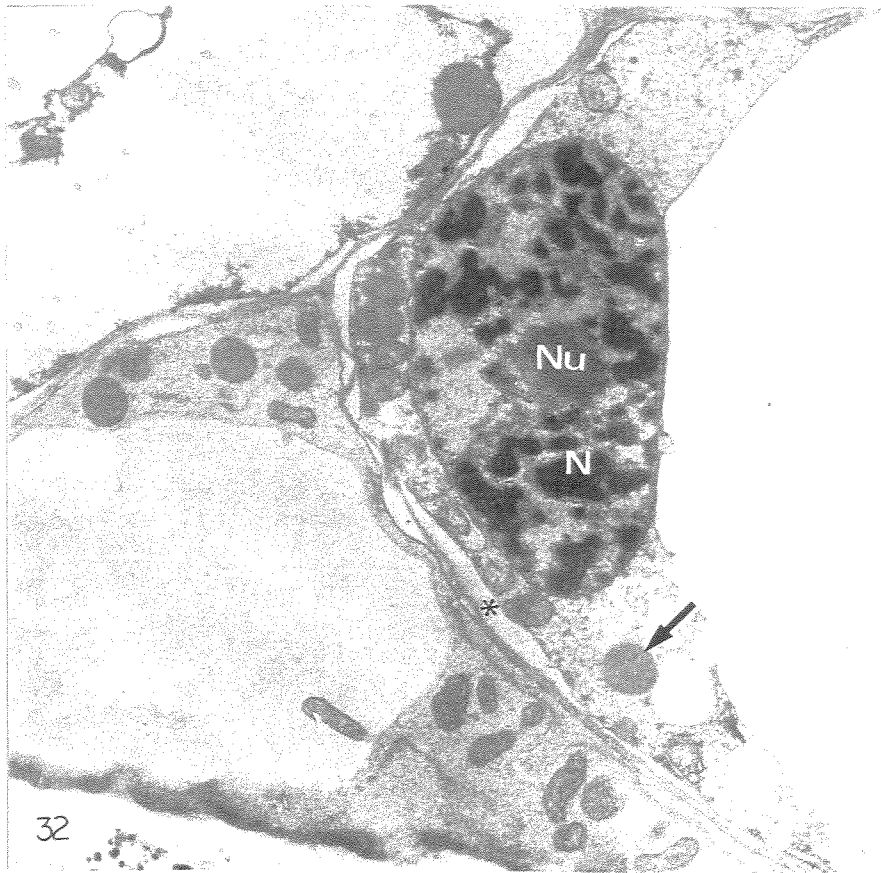
**Figs. 32:** Detalhe de uma célula observada ao microscópio eletrônico de transmissão. Observa-se o núcleo (N) com áreas de cromatina condensada, nucléolo (Nu), vacúolo único (V), espaço periplasmático ( \* ) e grânulos esféricos eletrondensos ( ➡ ).

**Fig. 33:** Retículo endoplasmático granular. Observa-se que as cisternas apresentam-se arranjadas de forma paralela.

**Fig. 34:** Mitocôndrias (m). São de forma irregular com grande variação, apresentam matriz eletrondensa, com cristas mitocondriais bastante evidentes.

**Fig. 35:** Células observadas ao microscópio eletrônico de varredura com formato esférico e fibrilas não muito numerosas na sua superfície.

Fig. 32 – Barra = 2 $\mu$ m; Fig. 33 – Barra = 0,1 $\mu$ m; Fig. 34 – Barra = 0,3 $\mu$ m e Fig. 35 – Barra = 15 $\mu$ m.



Com a adição de cloreto de cádmio ao meio de cultura (Prancha 10), as células evidenciaram alterações na sua estrutura. Os núcleos apresentaram uma grande quantidade de cromatina descondensada e no citoplasma ocorrem, um considerável aumento no número de vesículas e de grânulos eletrondensos. O retículo endoplasmático mostrou-se dilatado e, finalmente, o complexo de Golgi pode ser visualizado. (Fig. 36).

Os espaços periplasmáticos tornaram-se mais evidentes entre a membrana plasmática e a parede celular, que se mostrou toda retorcida, com camadas superpostas de regiões eletrondensas. Observou-se um vacúolo maior e outras vesículas menores, também, correspondentes a compartimentos menores de vacúolo (Fig. 36).

As mitocôndrias não mais exibem uma matriz tão eletrondensa como no material controle (Fig. 37) e foi evidente a presença de vesículas do retículo endoplasmático granular. Na parede celular, observou-se uma desfibrilação na região voltada para a lamela média (Fig. 37). As cisternas do complexo de Golgi puderam ser visualizadas com maior frequência nas células tratadas com cádmio (Fig. 38).

As células tratadas observadas ao microscópio eletrônico de varredura apresentaram uma forma bem diferente daquelas do material controle. Na Figura 39 é mostrada em detalhe uma célula com forma irregular, que ocorre principalmente na superfície dos agregados. Estas células apresentam, ainda, grande quantidade de protuberâncias e fibrilas na superfície da parede celular, que reagiram positivamente ao P.A.S., além de fissuras ao longo da parede.

**Prancha 10 Células *Saccharum officinarum* L. tratadas com cloreto de cádmio, próximas à região Intermediária, observadas em microscopia eletrônica.**

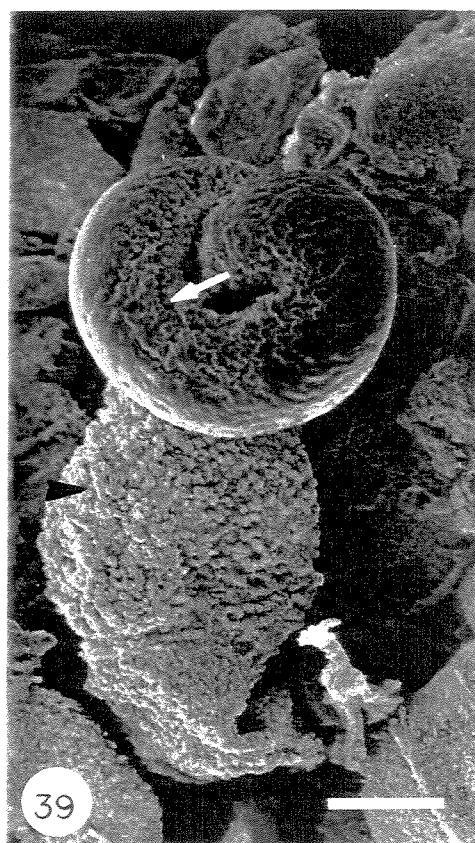
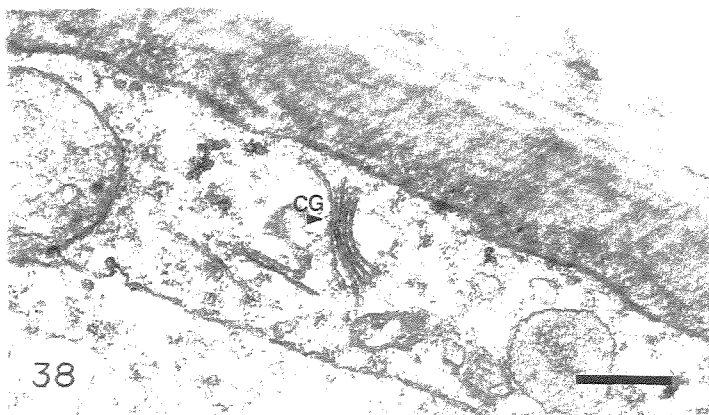
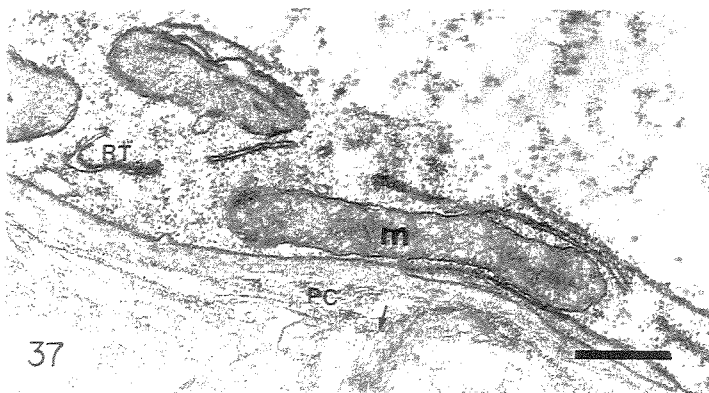
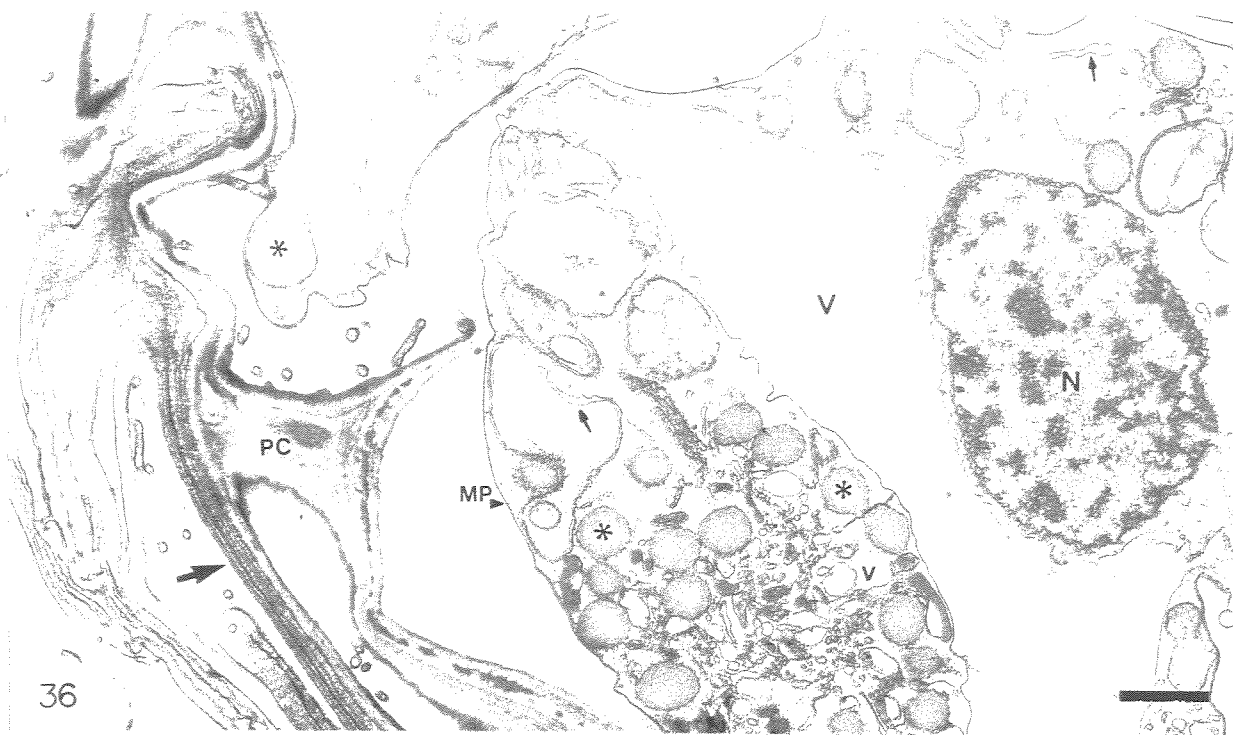
**Fig. 36:** Detalhe de uma célula tratada com o agente estressante após 48 horas. Observa-se a presença de parede celular (PC), membrana plasmática (MP), núcleo (N), vacúolo (V), grânulos esféricos eletrondensos (\*), camadas superpostas eletrondensas na parede celular ( ➡ ) e retículo endoplasmático com cisterna dilatada ( → )

**Fig. 37:** Detalhe de mitocôndrias (m), retículo endoplasmático granular (RT) e parede celular (PC) com presença de fibrilas na superfície externa (→), de células tratadas por 72 horas com cloreto de cádmio.

**Fig. 38:** Complexo de Golgi (CG) de uma célula tratada por 72 horas com cloreto de cádmio.

**Fig. 39:** Célula da superfície de um grumo tratado por 48 horas com cloreto de cádmio. A célula encontra-se alterada quanto à sua forma. Observam-se fissuras ao longo da parede (Seta branca), assim como protuberâncias na superfície da célula ( ► ).

Fig 36 – Barra = 1µm; Fig. 37 - Barra = 0,5µm; Fig. 38 - Barra = 0,5µm e Fig. 39 Barra = 20µm.



### 5.1.3. Análise bioquímica

As médias obtidas para as porcentagens de proteínas totais, açúcares livres, açúcares solúveis e amido na matéria seca das células e os resultados de comparação das mesmas, duas a duas pelo teste de Tukey 5%, para o controle e os diferentes tempos de tratamentos, podem ser observadas na Tabela 3.

Para proteínas totais a menor média foi para o tempo de 4 horas, enquanto que a maior média para o tempo de 48 horas. As médias do controle, 48 horas, 72 horas foram iguais entre si e superiores, enquanto que o controle, 72 horas e 24 horas, iguais entre si e intermediárias, apesar do tempo de 24 horas ter sido igual ao tempo de 4 horas, sendo este último tratamento inferior em relação às demais médias.

Para os açúcares livres, as médias variaram entre 3,40, para o tempo 24 horas, e 8,87, para o controle. Na comparação das médias o controle ficou isolado com a média mais alta, enquanto que os tempos de 4, 24 , 48 e 72 horas foram iguais entre si e inferiores ao controle.

Com relação às médias das quantidades de açúcares solúveis, as mesmas variaram entre 1,18, para o tempo de 24 horas, e 1,69, para o tempo de 4 horas. Pelo teste de Tukey 5%, as médias do controle, 4, 48 e 72 horas foram iguais entre si e superiores, enquanto que a média do tempo de 24 horas, inferior em relação às demais.

A quantidade de amido obtida situou-se na faixa dos 14-16%, não havendo diferenças significativas entre os valores obtidos (Tabela 3).

Na Tabela 4 podem ser observados os resultados das análises de variância para os componentes químicos que foram extraídos das células-controle e dos diferentes tempos de tratamento com cloreto de cádmio e que possibilitaram as análises dos resultados mostrados na Tabela 3. O teste F indicou diferenças significativas para o teor de proteínas totais, açúcares livres e açúcares solúveis,

enquanto que para o amido, não foram verificadas diferenças significativas para as médias observadas de tratamentos.

Os coeficientes de variação, medidos em porcentagem para cada componente químico avaliado, variaram entre 5,46 e 14,08, sendo o menor valor para proteínas totais e o maior para o amido.

**Tabela 3** - Porcentagens médias de proteínas totais, açúcares livres, açúcares solúveis e amido na matéria seca de células de *Saccharum officinarum* L. cultivadas em suspensão e submetidas a diferentes tempos de tratamento com cloreto de cádmio

| Componente<br>Químico | Médias de Tratamentos <sup>1/</sup> |       |         |        |         |
|-----------------------|-------------------------------------|-------|---------|--------|---------|
|                       | Controle                            | 4 h   | 24 h    | 48 h   | 72 h    |
| Proteínas Totais      | 11,30ab                             | 9,52c | 10,01bc | 11,76a | 11,26ab |
| Açúcares Livres       | 8,87a                               | 4,05b | 3,40b   | 4,57b  | 3,86b   |
| Açúcares Solúveis     | 1,62a                               | 1,69a | 1,18b   | 1,58a  | 1,64a   |
| Amido <sup>2/</sup>   | 16,45                               | 16,25 | 14,17   | 16,31  | 13,79   |

1/ a, b e c, indicam médias de tratamentos diferentes entre si, superior, intermediária e inferior, respectivamente, nos níveis de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

2/ As médias para este componente químico não diferem entre si conforme teste F 5% (Tabela 05).

**Tabela 4** - Resumo das análises de variância realizadas com os valores das dosagens de proteínas e açúcares de células de *Saccharum officinarum* L. cultivadas em suspensão

| Componente Químico | Quadrados Médios<br>de<br>Tratamentos <sup>1/</sup> | Coefficiente de<br>Variação (%) |
|--------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------|
| Proteínas Totais   | 2,7423 **                                           | 5,46                            |
| Açúcares Livres    | 14,9220**                                           | 13,74                           |
| Açúcares Solúveis  | 0,0131**                                            | 8,31                            |
| Amido              | 5,0647                                              | 14,08                           |

<sup>1/</sup> \*\* Indica diferenças significativas no nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

## 5.2. Células de *Citrus aurantium* L. (laranja)

### 5.2.1. Microscopia de luz

As células do material controle, coradas com safranina e azul de astra, apresentaram formato variado (Fig. 40), com paredes celulares coradas em azul, conteúdo citoplasmático levemente corado, também em azul, e os nucléolos se destacaram corados de vermelho. Na Figura 41, podem ser observados detalhes das células controle em maior aumento. Nota-se que os núcleos apresentam-se com cromatina extremamente descompactada. Os nucléolos, corados em vermelho, são esféricos e únicos em cada núcleo.

Após a exposição das células ao cádmio, suas paredes apresentaram-se mais espessas, quando comparadas ao controle e com uma coloração azulada mais intensa (Fig. 42). Observou-se ainda, uma leve coloração avermelhada do núcleo com nucléolo, em vermelho, bastante evidente. O vacúolo não foi bem visualizado e o citoplasma apresentou-se corado levemente em azul.

A coloração com azul de toluidina apresentada na Prancha 12 revelou células controle (Fig. 43) com paredes celulares metacromáticas, de coloração arroxeada, com conteúdo citoplasmático levemente corado, vacúolo e núcleos pouco corados, porém com nucléolo bastante evidente.

Com 72 horas de tratamento com o cloreto de cádmio, as células coradas com AT apresentaram suas paredes mais metacromáticas que no material controle. Não foi observado conteúdo citoplasmático com forte reação ao AT. Os núcleos apresentaram cromatina descondensada com nucléolo corado, evidente e único por núcleo (Fig. 44).

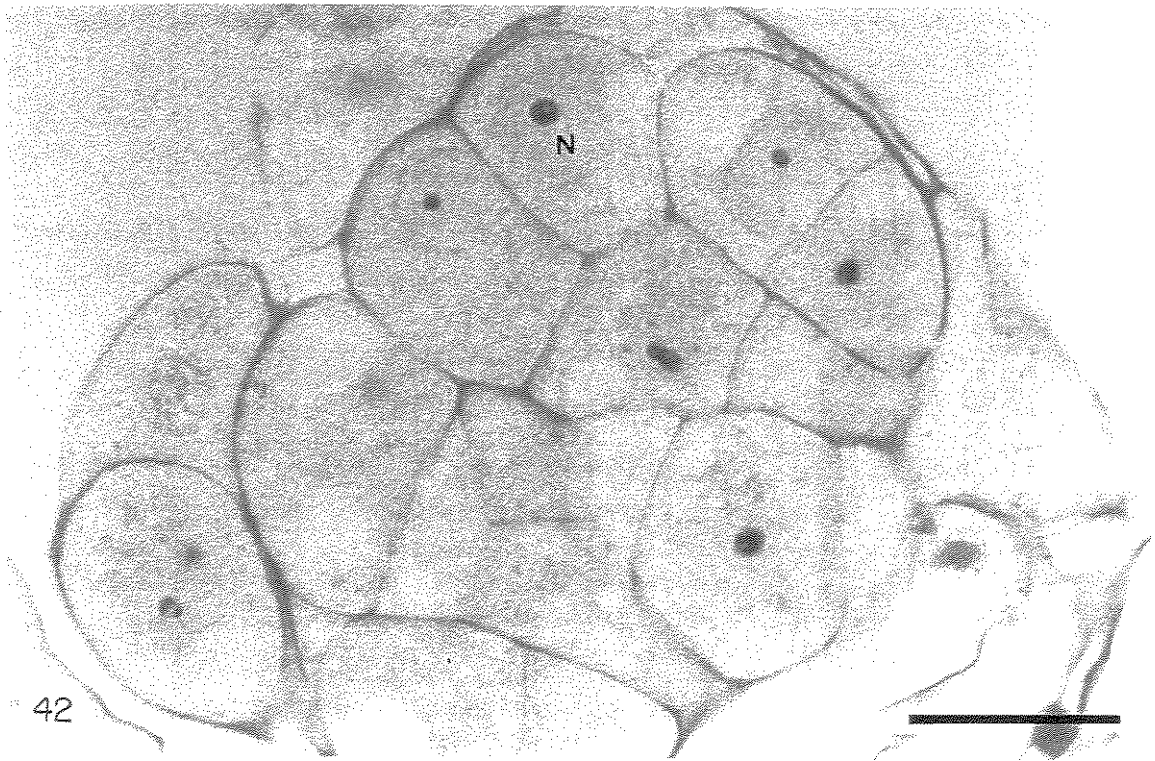
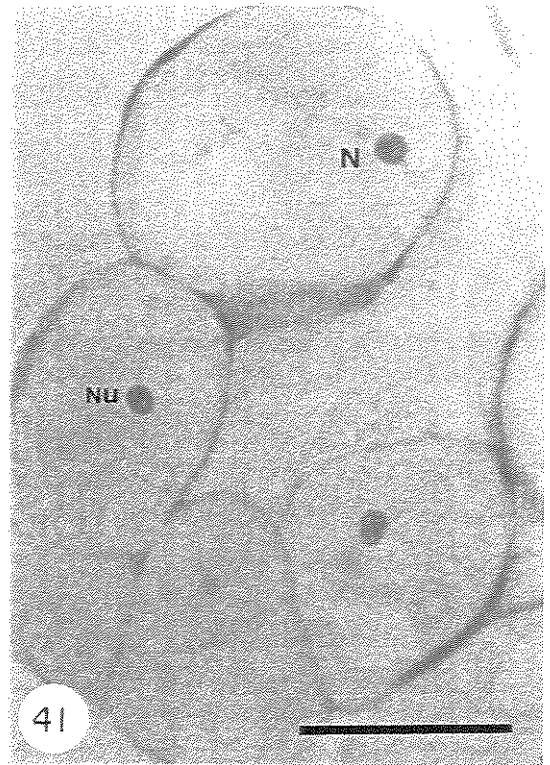
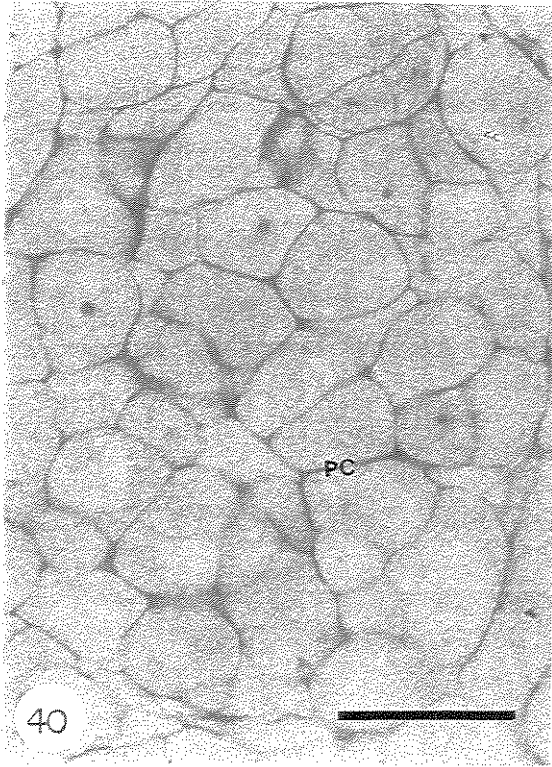
**Prancha 11 Células de *Citrus aurantium* L. coradas com azul de astra e safranina.**

**Fig. 40:** Células controle. Paredes celulares (PC) coradas em azul, conteúdo citoplasmático corado levemente em azul.

**Fig. 41:** Células controle. As paredes celulares são coradas em azul, com núcleo (N) descompactado corado levemente em vermelho e nucléolo (Nu) único corado em vermelho. Estas células estão localizadas na região periférica de um grumo.

**Fig. 42:** Células tratadas com cloreto de cádmio após 48 horas. Observam-se paredes coradas em azul, espessas, com núcleo (N) descompactado corado levemente, em vermelho e nucléolo único corado fortemente em vermelho. Observa-se a presença de conteúdo citoplasmático corado levemente em azul.

Fig. 40 - Barra = 40µm e Figs. 41 e 42 – Barra = 25µm.



Células controle e dos diferentes tempos de tratamento com cloreto de cádmio foram submetidas ao tratamento com floroglucina acidificada, mesmo não havendo indícios de deposição de lignina quando da análise das células coradas com safranina e azul de astra e, também, com azul de toluidina. Não ocorreu reação positiva das células face ao tratamento com floroglucina, tanto para o controle quanto para os diferentes tempos de exposição das células ao cádmio.

A reação de Feulgen e o fast-green alcalino, também foram utilizados para análise das células de laranja. Entretanto, esses resultados não foram concludentes quanto à influência do tratamento com o cloreto de cádmio.

Células controle submetidas à técnica de impregnação pela prata (AgNOR) podem ser observadas na Figura 45, destacando-se paredes celulares e nucléolos. Para as células expostas por 72 horas ao cloreto de cádmio, a técnica revelou paredes celulares enegrecidas, grânulos de coloração alaranjada no citoplasma, núcleos corados em amarelo e nucléolos de coloração escura. Nos diferentes tempos de tratamento, em cada núcleo foi observado apenas um único nucléolo, esférico e bem evidente (Figs. 46 e 47).

As células controle submetidas à reação do P.A.S. (Fig. 48) revelaram a presença de grãos de amido corados de magenta, dispersos no citoplasma, circundando o vacúolo ou próximos à parede celular. Nas células tratadas (Fig. 49a) foram confirmados os resultados obtidos para o material controle. Na Figura 49b, podem ser observados os grãos de amido ao microscópio de luz polarizada, com sua característica estrutura birrefringente e em forma de cruz-de-malta. Os grãos de amido apresentaram forma ovalada a esférica, com diferentes tamanhos, tanto no material controle quanto no tratado (Figs. 48 e 49).

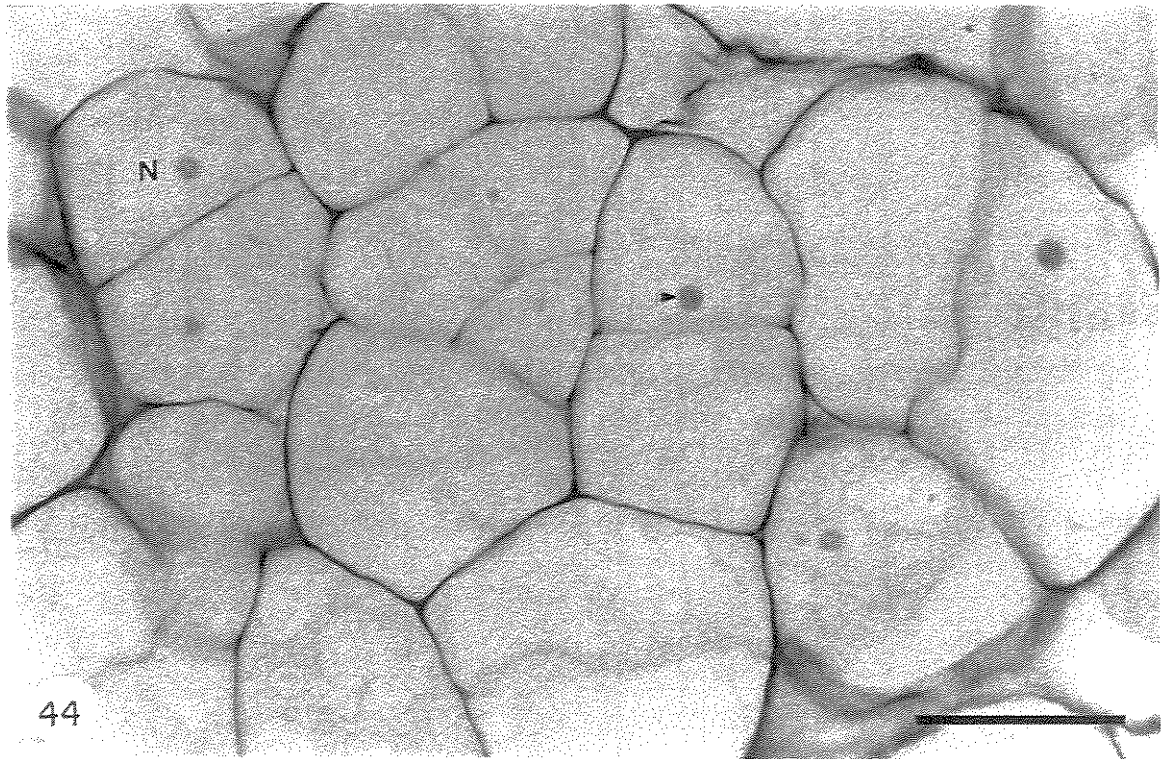
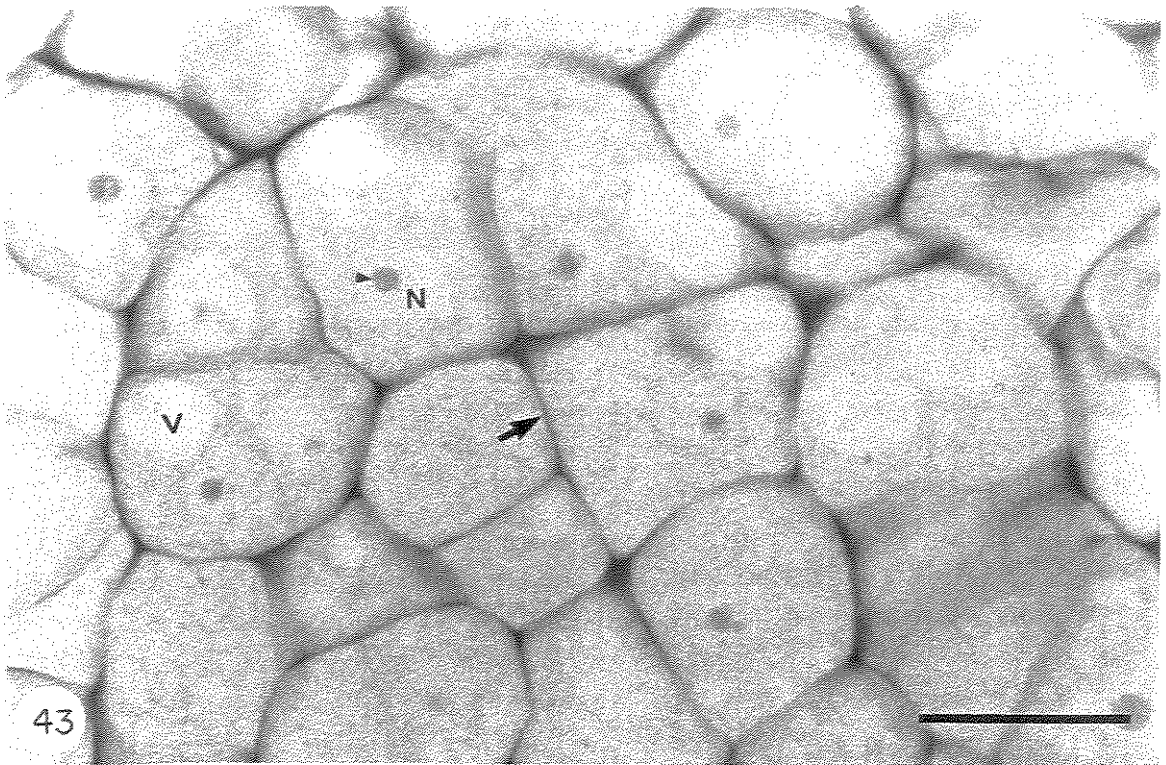
As células controle coradas pelo xylidine ponceau (XP) (Fig. 50), revelaram pouco conteúdo citoplasmático corado, assim como o núcleo, sendo notado mais nitidamente apenas o nucléolo. Nas células tratadas, a reação ao corante foi aparentemente maior do que aquela observada nas células-controle. O conteúdo citoplasmático assim como núcleo foram fracamente corados e, da mesma forma que o controle, os nucléolos apresentaram-se mais evidentes (Fig. 51).

**Prancha 12 Células de *Citrus aurantium* L. coradas com azul de toluidina pH 4,0.**

**Fig. 43:** Controle. Paredes celulares ( ➡ ) metacromáticas com coloração arroxeada, núcleo (N) descompactado com pouca reação ao corante e nucléolo ( ► ) bem evidente. Conteúdo citoplasmático levemente corado e vacúolo (V)

**Fig. 44:** Células tratadas por 72 horas com cloreto de cádmio. Paredes metacromáticas espessas, núcleo (N) com cromatina descondensada e nucléolo ( ► ) único corado.

Fig. 43 e 44 – Barra = 20µm.

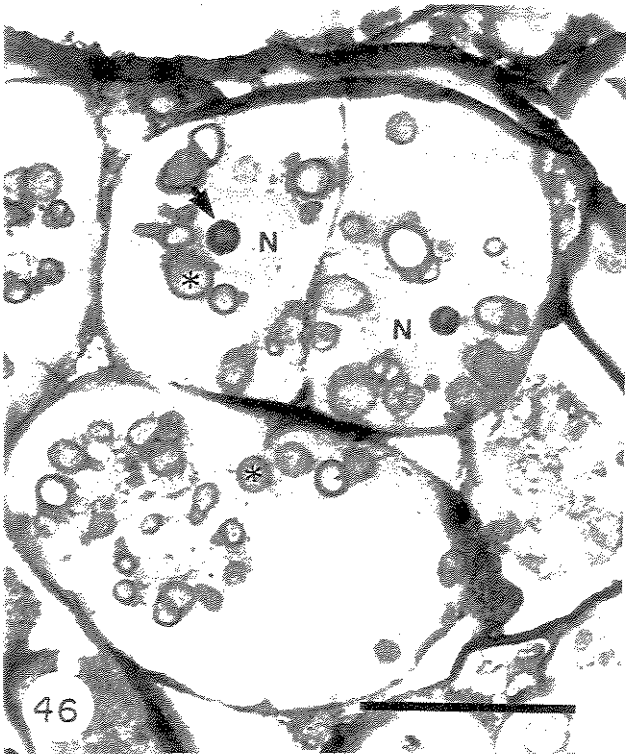
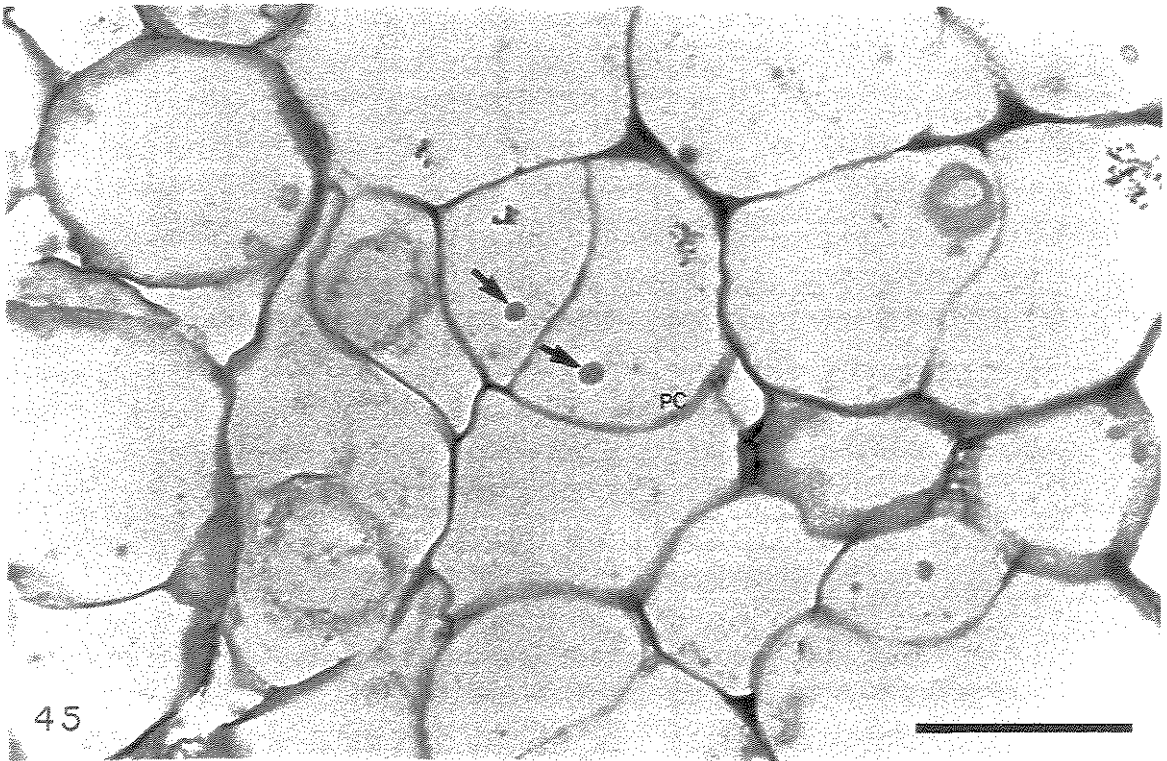


### Prancha 13 Células de *Citrus aurantium* L. submetidas ao método AgNOR

**Fig. 45:** Células controle. As paredes celulares (PC) são evidenciadas pelo método. Os nucléolos ( ➡ ) são evidentes, únicos por núcleo, sendo que este apresenta cromatina extremamente descompactada.

**Figs 46 e 47:** Células tratadas após 72 horas com cloreto de cádmio. Observam-se os núcleos (N) corados em amarelo, com nucléolo único, esférico, corado em marrom ( ➡ ). Observa-se a presença de grânulos ( \* ) alaranjados. Na figura 46 é possível observar uma célula em divisão.

Fig. 45-47 – Barras = 20µm.



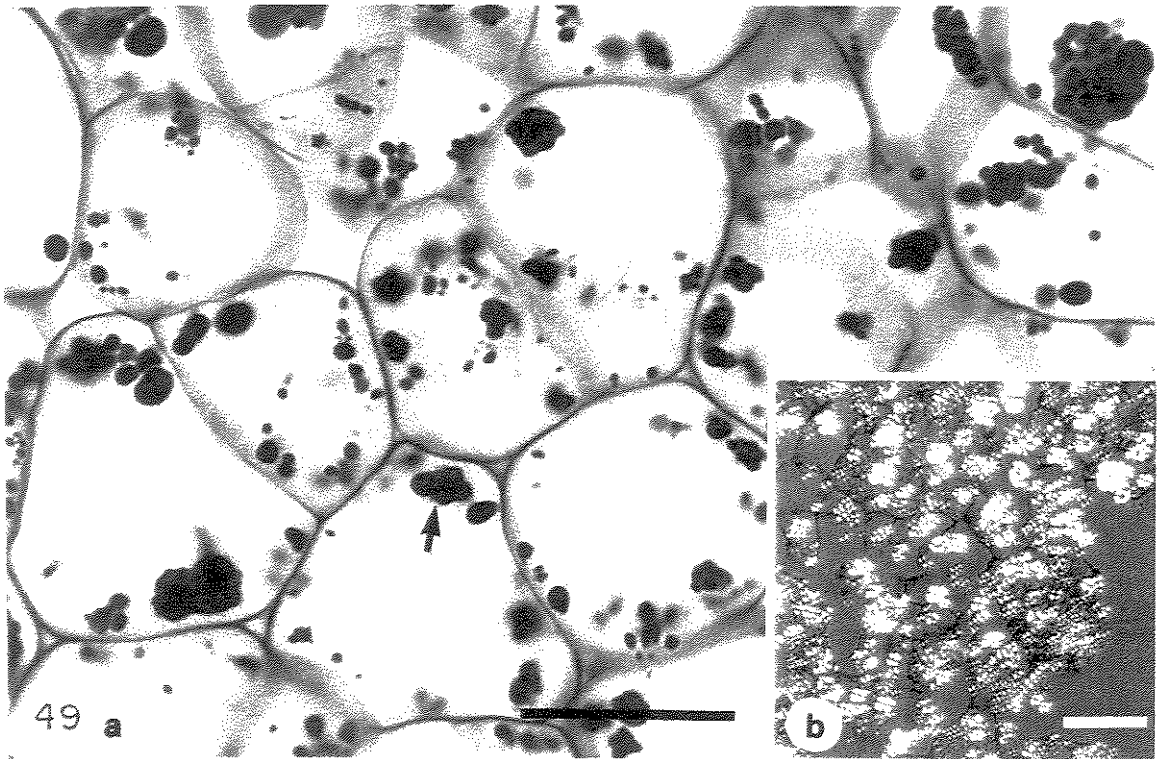
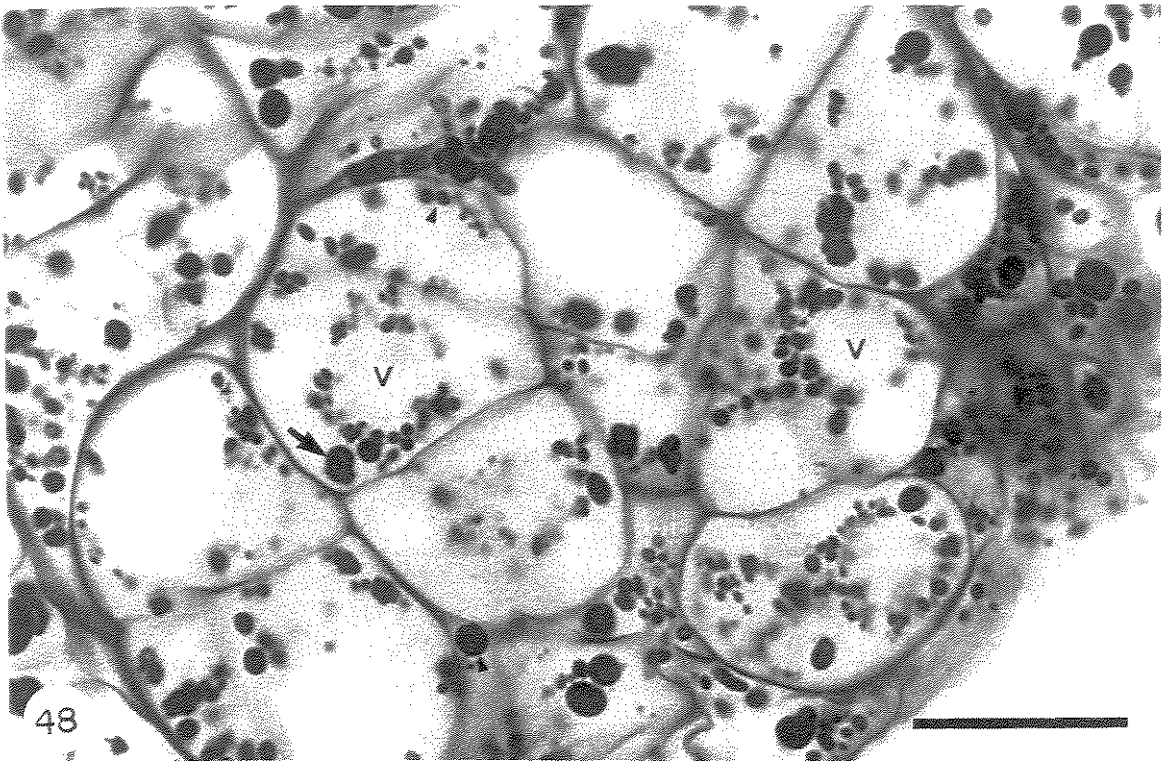
**Prancha 14 Células de *Citrus aurantium* L. submetidas à reação do PAS.**

**Fig. 48:** Células controle. Reação positiva ao corante de paredes celulares e grãos esféricos, numerosos, dispersos no citoplasma e que correspondem aos grãos de amido. Observa-se a presença de vacúolo (v) sendo circundados pelos grãos de amido.

**Fig. 49a:** Células tratadas com cloreto de cádmio após 48 horas. Reação positiva de paredes celulares e os grãos de amido ( ➡ ).

**Fig 49b:** Células tratadas com cloreto de cádmio por 48 horas e observadas em luz polarizada. Observam-se os grãos de amido com sua característica estrutura birrefringente e em forma de cruz-de-malta.

Figs. 48 e 49a – Barras = 20µm. Fig. 49b – Barra = 40µm.

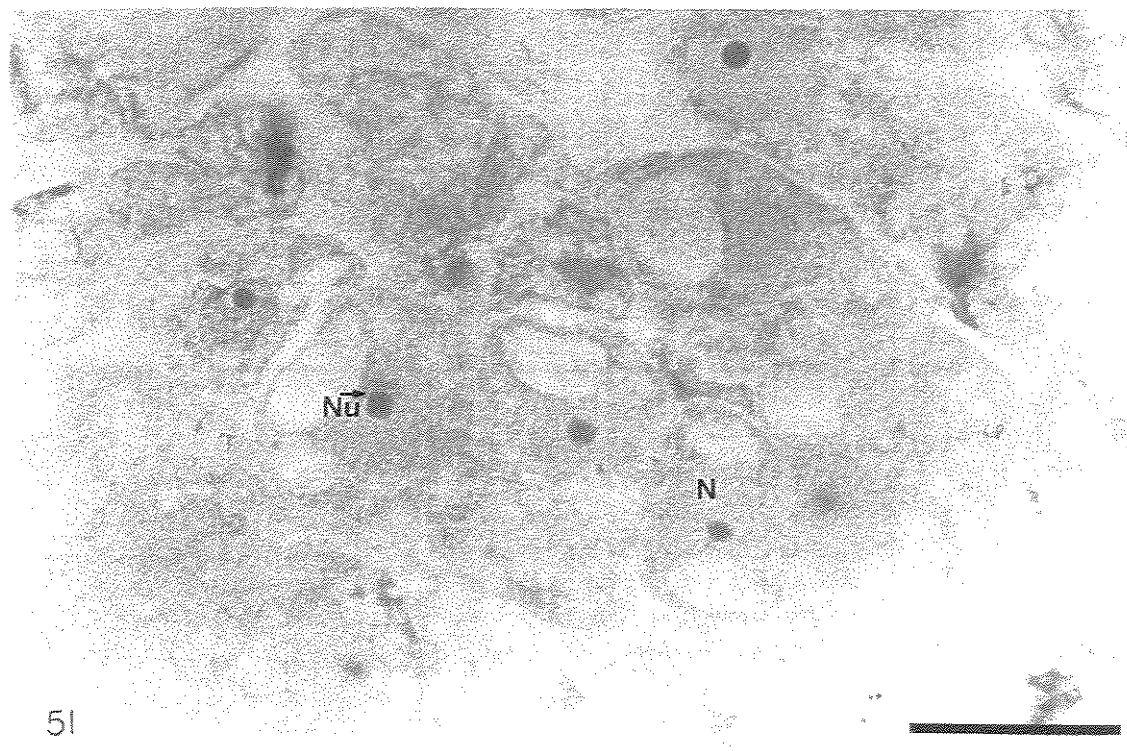
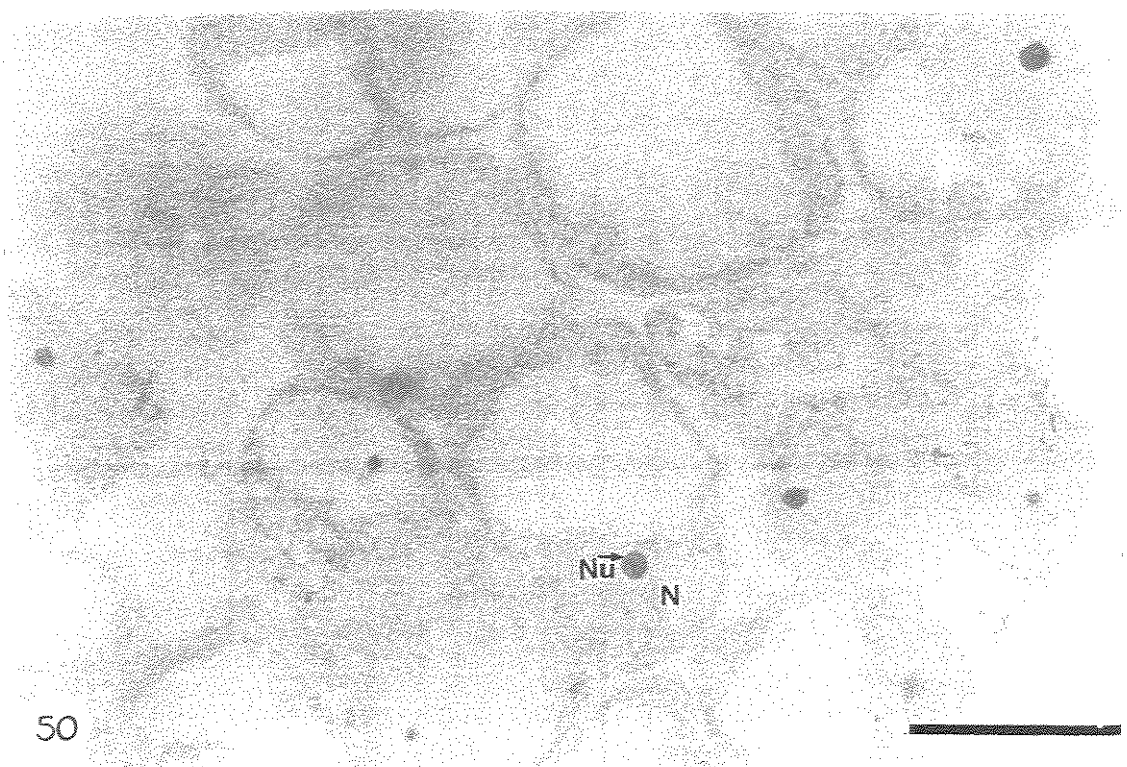


**Prancha 15 Células de *Citrus aurantium* L. coradas com xylidine ponceau (XP) pH 2,5**

**Fig. 50:** Células controle. Observa-se fraca reação das paredes celulares e material citoplasmático. Os núcleos (N) descompactados apresentam leve coloração e os nucléolos (Nu) únicos são evidentes.

**Fig. 51:** Células tratadas com cloreto de cádmio por 48 horas. Reação positiva de núcleos (N), nucléolos (Nu), paredes celulares e material citoplasmático.

Figs. 50 e 51 – Barras = 20µm.



### 5.2.2. Microscopia eletrônica

A ultra-estrutura das células controle e das células tratadas com cloreto de cádmio pode ser observada nas Pranchas 16 e 17.

As células do material controle (Fig. 52) apresentaram, normalmente, um grande vacúolo e a presença de outras vesículas de tamanho bem menor no interior do citoplasma. As paredes celulares mostraram-se relativamente delgadas. O núcleo foi visualizado sempre próximo à parede celular, com cromatina descompactada. A ultra-estrutura do núcleo pode ser observada na Figura 53, onde o nucléolo é observado em detalhe, com suas regiões granular e fibrilar, além do envoltório nuclear. Os grãos de amido são encontrados em grande quantidade nas células e o detalhe de um amiloplasto pode ser observado na Figura 54, onde, também é possível observar a presença de poliribossomos. As mitocôndrias são abundantes, cilíndricas e não muito alongadas. Organelas como cloroplastos estão ausentes e outras, como o complexo de Golgi, não são observadas com facilidade nestas células (Figs. 52-54).

Com o tratamento (Fig. 55), as paredes celulares adquiriram um aspecto mais frouxo, mas eletrondensa, sendo visualizados plasmodesmos. Os amiloplastos, alguns do tipo amebóide, estão presentes em abundância, com tamanhos variados, assim como vesículas menores que correspondem a vacúolos. A Figura 55 mostra, ainda, parte do núcleo com cromatina descondensada e cisternas do complexo de Golgi, que são observados com maior frequência nestas células. Não foi observada a presença de cloroplastos, assim como de vesículas do retículo endoplasmático.

Na microscopia eletrônica de varredura, foram observadas células esféricas com a presença de fibrilas na superfície, tanto no material controle (Fig. 56) quanto no tratado com cloreto de cádmio (Fig. 57).

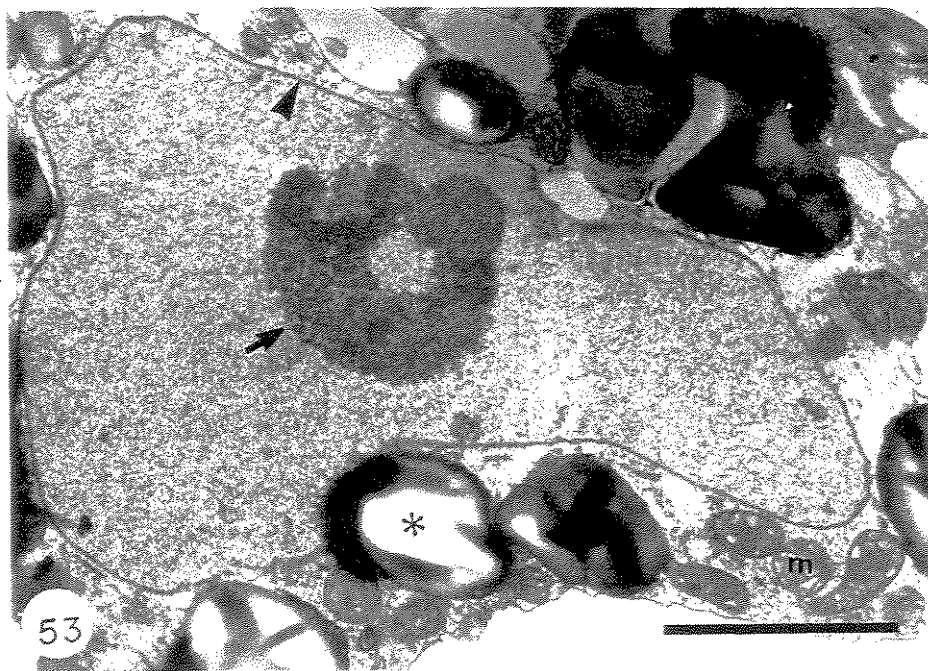
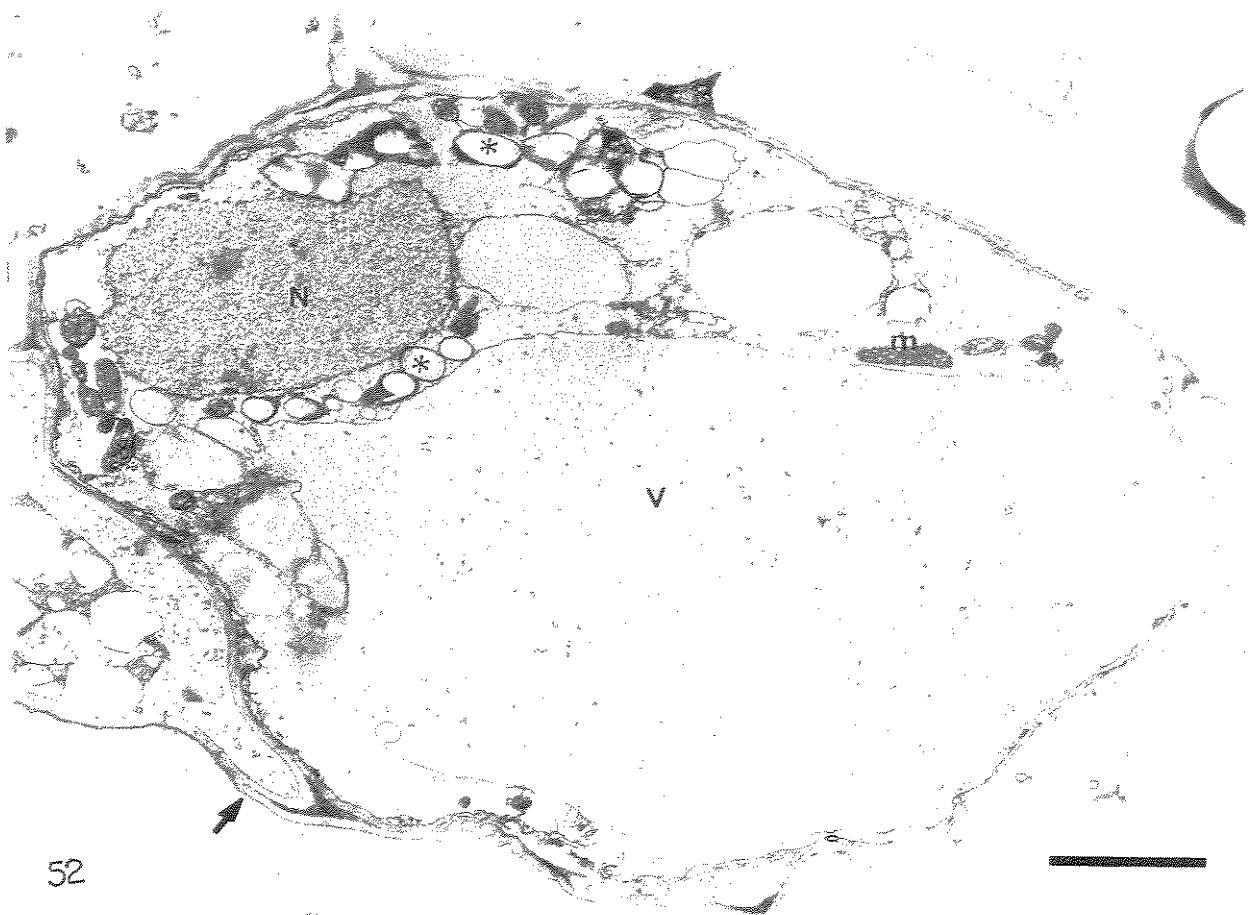
**Prancha 16 Células de *Citrus aurantium* L. observadas em microscopia eletrônica de transmissão.**

**Figs. 52:** Célula controle. Observa-se a parede celular ( ➡ ), núcleo (N), vacúolo (V), mitocôndrias (m) e amiloplastos ( \* ).

**Fig. 53:** Núcleo de uma célula-controle. O nucléolo ( ➡ ) único é bem visível com suas regiões, fibrilar e granular, bem distintas. Observa-se envoltório nuclear ( ► ), amiloplastos ( \* ) e mitocôndrias (m) próximas ao núcleo.

**Fig. 54:** Amiloplasto do tipo amebóide. Observa-se a presença de poliribossomos (PO).

Fig. 52 – Barra = 2,5µm; Fig. 53 – Barra = 2,5µm e Fig. 54 = 1µm.

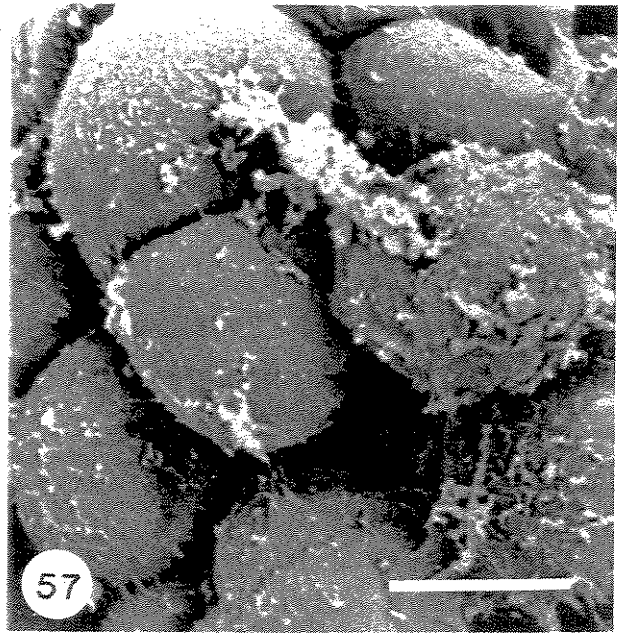
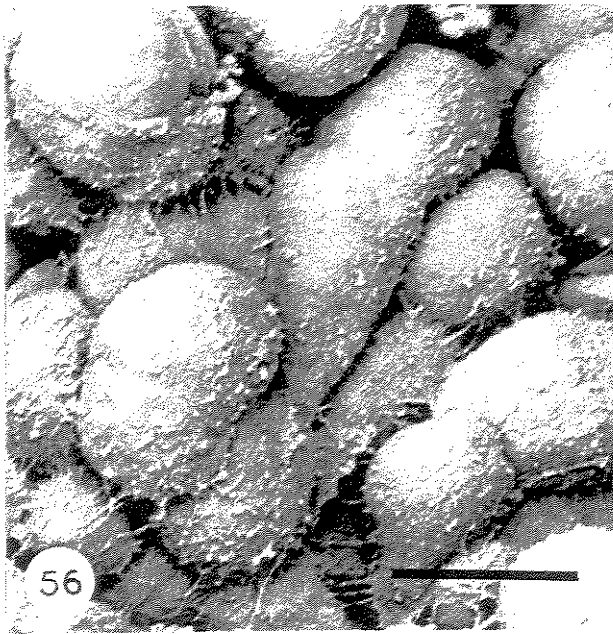
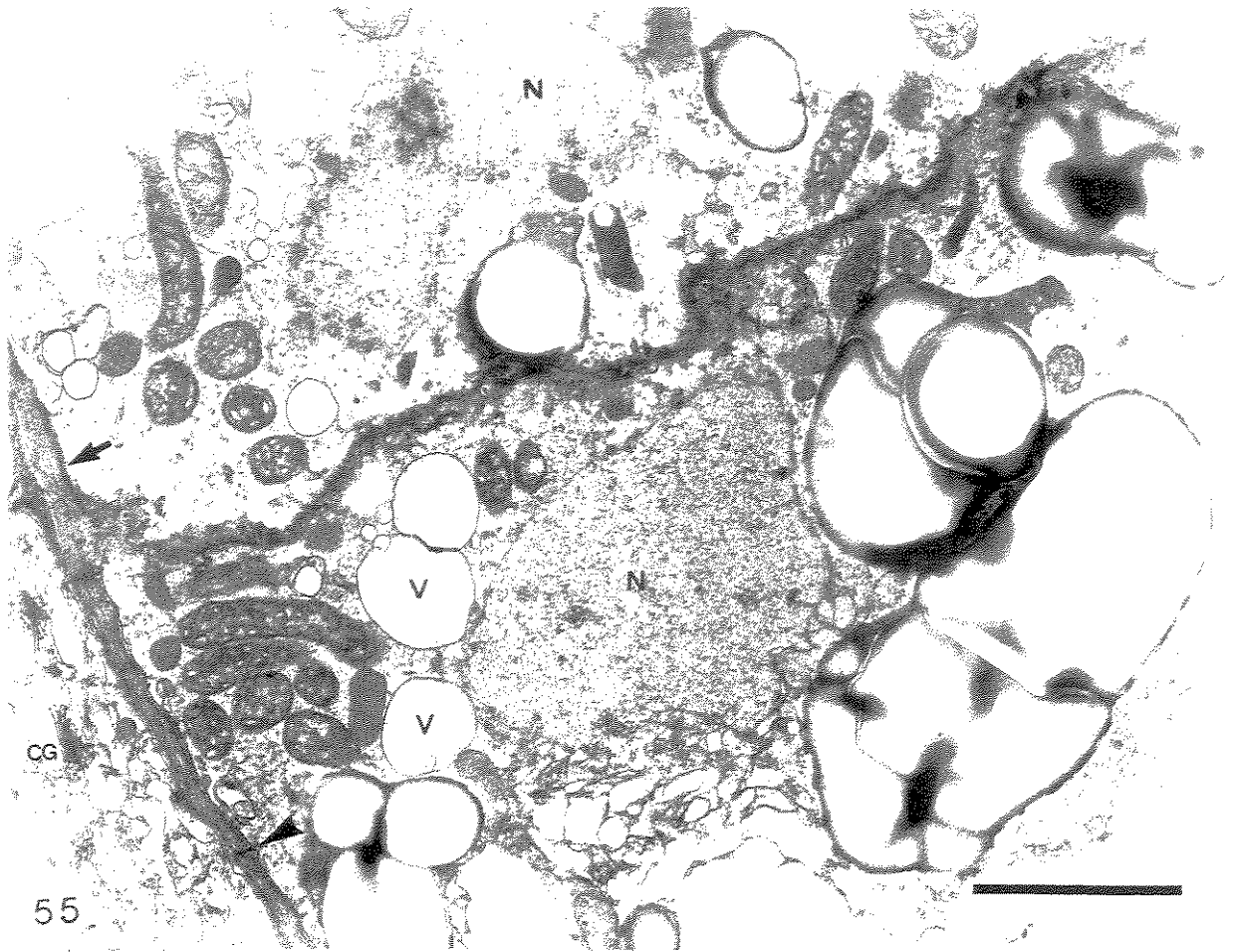


**Prancha 17** Células de *Citrus aurantium* L. observadas em microscopia eletrônica.

**Fig. 55:** Células tratadas com cloreto de cádmio por 48 horas observadas em microscópio eletrônico de transmissão. São observados núcleos (N) em corte tangencial, vacúolos (V), parede celular ( ➡ ), plasmodesmos ( ► ) e complexo de Golgi (CG).

**Fig. 56 e 57:** Células controle e tratadas com cloreto de cádmio por 48 horas observadas em microscópio eletrônico de varredura, respectivamente. As células exibem formas esféricas. Nota-se a presença de inúmeras fibrilas na superfície das paredes celulares fazendo conexão entre as células.

Fig. 55 – Barra = 2 $\mu$ m; Fig. 56 – Barra = 15 $\mu$ m e Fig. 57 – Barra = 10 $\mu$ m.



### 5.2.3. Análise bioquímica

Na Tabela 5 são apresentadas as médias em porcentagens do teor de proteínas totais, açúcares livres, açúcares solúveis e amido na matéria seca de células controle e dos diferentes tempos de tratamento com cloreto de cádmio.

As porcentagens observadas para proteínas totais, variaram entre 4,52 para 72 horas e 6,65 para o controle. Segundo o teste Tukey 5% as médias para os tempos de 4, 24, 48 e 72 horas, foram iguais e inferiores, enquanto que a média verificada para o controle foi estatisticamente diferente e superior as demais.

Para açúcares livres, as médias variaram entre 16,67 para o controle e 22,55 para o tempo de 4 horas. As médias verificadas para os tratamentos 4, 24 e 48 horas foram iguais entre si e superiores segundo o teste de Tukey 5%. Entretanto, as médias dos tempos de 48 e 24 foram iguais ao tempo de 72 horas que foram classificadas como intermediárias, apesar dos tempos de 24 e 72 horas serem iguais ao controle, que apresentou a média mais baixa.

As médias verificadas para açúcares solúveis variaram entre 0,97 para 24 horas e 1,23 para 72 horas. Na comparação das médias pelo teste de Tukey 5%, o tempo de 72 horas foi superior e sua média diferente das demais. As médias do controle e 4 horas foram iguais entre si, apesar do tempo de 4 horas ter sido igual as médias dos tempos de 24 e 48 horas, que foram inferiores.

As médias verificadas para amido variaram entre 27,05 para 72 horas e 35,54 para 48 horas, sendo que as mesmas foram iguais entre si de acordo com o teste F (Tabela 05).

Na Tabela 6 são apresentados os quadrados médios resultantes das análises de variância para as porcentagens de proteínas totais, açúcares livres, açúcares solúveis e amido na matéria seca de células não tratadas e tratadas com cloreto de cádmio e referentes aos valores obtidos nas dosagens e expressos na Tabela 5.

De acordo com o teste F (1%), existem diferenças entre as porcentagens médias de tratamentos para proteínas totais, açúcares livres e açúcares solúveis, não existindo diferenças significativas entre as médias de tratamentos para amido.

São apresentados os coeficientes de variação para os diferentes componentes químicos avaliados, sendo que o menor valor foi verificado para proteínas totais (5,58) e o maior valor para amido (10,80).

**Tabela 5** - Porcentagens médias de proteínas totais, açúcares livres, açúcares solúveis e amido na matéria seca de células de *Citrus aurantium* L. cultivadas em suspensão e submetidas a diferentes tempos de tratamento com cloreto de cádmio

| Componente<br>Químico | Médias de Tratamentos <sup>1/</sup> |        |          |         |         |
|-----------------------|-------------------------------------|--------|----------|---------|---------|
|                       | Controle                            | 4 h    | 24 h     | 48 h    | 72 h    |
| Proteínas Totais      | 6,65a                               | 5,00b  | 4,66b    | 4,54b   | 4,52b   |
| Açúcares Livres       | 16,67c                              | 22,55a | 19,93abc | 21,25ab | 17,26bc |
| Açúcares Solúveis     | 1,08b                               | 1,03bc | 0,97c    | 0,99c   | 1,23a   |
| Amido <sup>2/</sup>   | 34,95                               | 30,85  | 30,14    | 35,54   | 27,05   |

1/ a, b e c, indicam médias de tratamentos diferentes entre si, superior, intermediária e inferior, respectivamente, nos níveis de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

2/ As médias para este componente químico não diferem entre si conforme teste F 5% (Tabela 05).

**Tabela 6** - Resumo das análises de variância realizadas com os valores das médias das dosagens de proteínas e açúcares de células de *Citrus aurantium* L. cultivadas em suspensão

| Componente Químico | Quadrados Médios<br>de<br>Tratamentos <sup>1/</sup> | Coefficiente de<br>Variação (%) |
|--------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------|
| Proteínas Totais   | 2,4457 **                                           | 5,58                            |
| Açúcares Livres    | 19,1528**                                           | 8,12                            |
| Açúcares Solúveis  | 0,0036**                                            | 6,93                            |
| Amido              | 37,5733                                             | 10,80                           |

<sup>1/</sup> \*\* Indica diferenças significativas no nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Considerações sobre as culturas de células

Para o estabelecimento dos diferentes tempos de tratamento, assim como das dosagens de cloreto de cádmio utilizadas no presente trabalho, tomamos por base os conhecimentos acumulados na literatura e os dados obtidos com experimentos preliminares, utilizando-se de células de amora selvagem (*Rubus fruticosus* L.), submetidas ao estresse provocado por cádmio. As culturas celulares dessa espécie apresentam um ciclo de vida rápido, com cerca de 30 dias (CORTELAZZO *et al.*, 1996) e, além disso, ela foi utilizada em diferentes trabalhos visando a determinação das atividades enzimáticas associadas ao desenvolvimento das paredes celulares (JOSELEAU *et al.*, 1992; RUEL *et al.*, 1995), inclusive de peroxidases (JOSELEAU *et al.*, 1996). Apesar destes resultados não serem apresentados no presente trabalho, isto permitiu o estabelecimento de alterações decorrentes do uso do cádmio, antes de ser iniciado o trabalho com as espécies economicamente importantes e escolhidas para o desenvolvimento do projeto.

A dosagem escolhida foi baseada, também, nos dados obtidos na literatura (SICKO-GOAD, 1982; FERNANDEZ-PIÑAS *et al.*, 1995; SAWIDIS & REISS,

1995), levando em consideração uma dose que fosse subletal, ou seja, que induzisse danos e respostas, porém sem levar à morte das células.

As culturas de células em suspensão de cana-de-açúcar foram as mais difíceis de manuseio e condução, pois tendem a oxidar com facilidade nas condições de cultivo, além do fato de, aparentemente, apresentarem uma contaminação bacteriana que se manteve, sem, no entanto exibir sintomas característicos. O uso de antibióticos foi a solução encontrada para evitar as perdas pela infecção bacteriana (Tabela 2). O material biológico utilizado para obtenção dos dados experimentais e processamento para estudos estruturais e ultra-estruturais foi obtido de culturas sabidamente não contaminadas.

As culturas de laranja foram mais fáceis no manuseio e condução. Não se verificou oxidação das células e as contaminações foram mínimas, quase sempre por fungos saprófitas.

O material obtido a partir dos calos de cana-de-açúcar para a obtenção das culturas em suspensão, foi o de mais difícil dissociação. A cultura "in vitro" de cana-de-açúcar origina calos menos friáveis. Este fato dificulta o repique das culturas para a obtenção de suspensões. Alguns agregados celulares continuam sempre presentes, e, mesmo com sucessivas filtrações, tornou-se difícil obter uma separação eficiente dos mesmos. Isso não ocorreu com os calos de laranja, que se mostraram mais friáveis. Porém, pequenos agregados se formaram nas culturas em suspensão, com diâmetro menor do que os da cana-de-açúcar.

A formação de agregados celulares pode ser considerada uma tendência natural para culturas em suspensão, devido à contínua divisão das células presentes. Esses agregados podem conter centenas de células que, no final da curva de crescimento, diminuem em número e conseqüentemente em tamanho (STREET *et al.*, 1972). Esse fato acabou auxiliando o presente estudo, tendo em vista que as células mais superficiais do agregado receberam ação mais direta do meio de cultura, possibilitando a demarcação das duas regiões citadas nos resultados e denominadas arbitrariamente de região A e região B.

As suspensões celulares de cana-de-açúcar apresentaram resultados mais contundentes quando submetidas à ação das soluções de cloreto de cádmio nos diferentes tempos utilizados. Entretanto, uma série de alterações inequívocas foram também observadas para as suspensões celulares de laranja, demonstrando assim um forte efeito desse agente estressante na morfologia das células estudadas.

## **6.2. Alterações estruturais**

Os efeitos do cádmio nas suspensões celulares puderam ser observados em nível estrutural, através das análises em microscopia de luz comum ou plano polarizada. Estes danos foram detectados, principalmente para a cana-de-açúcar, mesmo no tempo mais curto de exposição das células ao cádmio. Nos períodos mais longos de cultura na presença do agente estressante foi possível identificar um conjunto maior de alterações nas células, permitindo uma comparação mais detalhada dentre os diferentes tratamentos e estes e as células-controle.

A utilização dos corantes safranina e azul de astra (BUKATSCH, 1972, modificado) permitiram uma análise morfológica geral, além de fornecer indícios de que as células tiveram uma alteração no seu comportamento fisiológico em função do tratamento com o cloreto de cádmio, nos diferentes tempos. A safranina é um corante básico que evidencia paredes celulares do tipo péctico-lignificadas, que se tornam avermelhadas, assim como o núcleo das células. Por outro lado, o azul de astra cora as paredes péctico-celulósicas, que ficam azuladas. A combinação destes dois corantes permite um estudo morfológico bastante detalhado das células, tendo em vista principalmente, a indicação rápida do estágio de desenvolvimento das paredes celulares.

Apesar de não ser considerada uma técnica citoquímica por não haver relação estequiométrica entre a reação corante-substrato, a coloração pela

safranina e azul de astra revelou a presença de paredes lignificadas no material tratado pelo cádmio, indicando assim haver uma resposta celular ao agente estressante. Essa resposta se manifestou de forma mais evidente nas células que inicialmente ocupavam a periferia dos agregados e é reforçada por outras observações de materiais submetidos a diferentes formas de estresse, que também acarretam lignificação dos tecidos como forma de isolar a parte injuriada do mesmo (VANCE *et al.*, 1980; WALTER, 1992).

A presença de células com paredes lignificadas apenas para as suspensões celulares de cana-de-açúcar, sugerem que elas são mais sensíveis a esse tipo de estresse. A partir da adição da solução de cloreto de cádmio, novas células se desenvolveram sob essa condição, formando a região (B), com características diferentes daquelas desenvolvidas no material controle, como compartimentalização do vacúolo, paredes celulares mais espessas e aumento no volume nuclear e no número de nucléolos.

O azul de toluidina (AT) é muito utilizado em colorações citoquímicas, por se tratar de corante básico utilizável em uma grande faixa de pH e que apresenta metacromasia. Este fenômeno está vinculado à forma planar das moléculas do corante e a possibilidade de interação entre as mesmas quando próximas umas das outras. Em situações "in situ", essa proximidade é facilitada por uma maior disponibilidade de radicais aniônicos nas estruturas celulares coradas (VIDAL, 1977).

As substâncias pécticas presentes nas paredes celulares vegetais, devido à sua forte natureza ácida, decorrente de porções poliméricas repetitivas de ácido galacturônico, possibilitam a interação entre as moléculas de AT. Assim, a excitação eletrônica de seus grupamentos cromofóricos passa a necessitar uma maior energia (comprimentos de onda menores), tendo como consequência visual uma coloração mais arroxeada. Usando o mesmo princípio, quando os radicais negativos não se encontram disponíveis, seja pela metilação das substâncias pécticas, seja pela presença de compostos fenólicos, as moléculas do corante se posicionam distantes umas das outras e a energia de excitação necessária é

menor. Nesse caso, a consequência visual no tecido é a coloração do material em tons de verde ao azul-esverdeado (SILVA *et al.*, 1997). Explicação semelhante pode ser dada aos resultados da coloração de outras estruturas celulares. Os núcleos, por exemplo, são corados em tons de verde quando a interação do DNA com proteínas é maior, acarretando uma menor disponibilidade de grupos fosfato livres.

Na cana-de-açúcar a metacromasia foi constante, tanto para os núcleos quanto para as paredes das células do material controle. Porém, com pouco tempo de tratamento com cádmio (4 horas), foi possível identificar alterações do ponto de vista morfológico, principalmente em relação à lignificação das paredes celulares.

A coloração esverdeada obtida pelo AT nas células dispostas entre as regiões A e B, confirmaram os resultados obtidos com a safranina e azul de Astra.

Em outras situações o AT foi utilizado para identificar a presença de lignina em células infectadas com fungos, já que esta é uma resposta comum de tecidos vegetais submetidos ao ataque de patógenos (SOUTHERTON & DEVERALL, 1990). O estresse provocado por metais pesados, também parece induzir a produção de lignina. WHETTEN & SEDEROFF (1995) referem-se claramente a esta possibilidade.

Diante dessas evidências uma técnica citoquímica específica para lignina foi utilizada (SOUTHERTON & DEVERALL, 1990; BARCELÓ, 1997), sendo possível confirmar, uma vez mais, a lignificação das paredes celulares como uma das respostas ao estresse provocado pelo cádmio (Plancha 3). A formação de uma espécie de gradiente de resposta, com poucas células com coloração vermelho-intensa seguida de coloração mais amarelada ao redor, pode ser considerada uma estratégia que faz com que o cádmio seja isolado de forma a provocar a morte de um pequeno número de células.

A laranja não respondeu aos tratamentos da mesma forma que a cana-de-açúcar. O emprego de SAA e AT não revelou alterações significativas quanto da exposição das células ao cloreto de cádmio, sugerindo que a dosagem utilizada

não chegou a ser nem subletal, ou ainda que as mesmas disponham de mecanismos eficientes de defesa não passíveis de detecção através da microscopia de luz. Desse modo, mesmo com a utilização de floroglucina, não foram observadas diferenças entre as paredes celulares das células-controle e as tratadas com cloreto de cádmio.

As células de cana-de-açúcar que se multiplicaram na presença do agente estressante exibiram uma alteração bastante visível quanto ao vacúolo. Foi notada claramente uma compartimentalização do mesmo, com vesículas maiores e menores. Outros autores referem-se a compartimentalização do vacúolo (SALT & WAGNER, 1993) e a complexação do cádmio por fitoquelatinas (VÖGELI-LANGE & WAGNER, 1990), como sendo um mecanismo de detoxificação de várias espécies vegetais. A estocagem de cádmio em vacúolos também é discutida por CHARDONNENS *et al.* (1998) e GRIES & WAGNER (1998), como sendo uma importante estratégia de tolerância.

Na cana-de-açúcar, dentro das condições na qual se desenvolveu o estudo, a compartimentalização parece ser um mecanismo de tolerância, possivelmente associado à produção de proteínas específicas envolvidas no processo de detoxificação. Essas proteínas teriam uma maior facilidade de transportar o íon metálico para o interior dos vacúolos, devido ao aumento da superfície de membranas do mesmo.

As células de laranja apresentaram vacúolo compartimentalizado mesmo no material controle. Apesar desse fato ter dificultado a observação da mesma resposta ocorrida para as células de cana-de-açúcar, no material tratado o número de vesículas foi aparentemente maior, e o seu tamanho menor (Pranchas 11 e 12).

O cádmio é conhecido como um potente agente capaz de induzir a formação de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen em *Tradescantia* sp e em células meristemáticas de *Allium cepa* e *Vicia faba* (STEINKELLNER *et al.*, 1998). Este metal pode também modificar ou alterar o metabolismo de DNA e RNA. "In vitro", o cádmio causa danos no processo de reparo e induz o

despareamento de bases, comportando-se como um forte mutagênico em plantas superiores (DEGRAEVE, 1981). Segundo esse autor, ele não é um mutagênico *per se*, mas incrementa a ação mutagênica de outras substâncias pela modificação de processos de reparos.

Nas duas espécies estudadas, não foi verificada a formação de micronúcleos. Entretanto, foi possível identificar claramente alterações morfológicas no núcleo, em tempos relativamente curtos (4 horas). As células de cana-de-açúcar que sofreram inicialmente os efeitos da adição do cloreto de cádmio, ao meio de cultura, mostraram-se mais alteradas (Região A – Figs. 2 e 8), com relação aos núcleos, que se tornam altamente compactados e picnóticos, quando se compara com os núcleos das células-controle (Figs. 1 e 5).

Por outro lado, as células da cana-de-açúcar que cresceram na presença do cádmio, apresentam núcleos extremamente descompactados, com um número maior de nucléolos, revelando com isto uma intensa atividade metabólica. Isto pode indicar, principalmente, atividade de transcrição e síntese de RNA ribossomal, o que está diretamente associado à atividade intensa de síntese protéica.

Os resultados das alterações nucleares foram confirmados com a utilização da reação de Feulgen e da coloração pelo fast-green em pH 8,0.

A reação de Feulgen é específica para DNA, que se cora em magenta. Essa especificidade na verdade é decorrente da eliminação de outros substratos coráveis através de hidrólise ácida com HCl. Assim, proteínas e RNA são solubilizados e, além disso, ocorre a desnaturação e depurinação do DNA, liberando assim o grupamento aldeídico do carbono 1 da desoxiribose, que tem afinidade pelo reativo de Schiff utilizado na reação (MELLO & VIDAL, 1978).

O fast-green é um corante ácido que é largamente utilizado para a coloração de proteínas. Quando preparado em soluções em pH baixo, cora todas as proteínas, uma vez que as mesmas encontram-se em valores de pH menores do que seu ponto Isoelétrico e, portanto, positivas. Em pH 8, a maioria das proteínas já se encontra negativada (pH maior do que seu pI). Entretanto, as

proteínas histônicas ainda se encontram positivadas, devido a sua grande riqueza nos aminoácidos básicos lisina e arginina. Assim, pode-se utilizar o corante nesse pH e identificar apenas as proteínas histônicas presentes no núcleo. Para melhor eficiência da reação e eliminação da competição com o corante, o DNA é removido com ácido tricloroacético a quente (MELLO, 1997).

Os resultados obtidos para as suspensões celulares de cana-de-açúcar revelaram uma resposta mais intensa aos dois métodos citados no material após tratamento com cloreto de cádmio, mesmo nos tempos mais curtos de incubação. Pode ainda ser verificado um aumento no número de nucléolos por núcleo, no material tratado, sugerindo assim uma maior atividade de síntese de ribossomos pelas células.

Os resultados da reação ao fast-green para as suspensões celulares de cana-de-açúcar revelaram na região B, uma resposta mais intensa para o material tratado, desde os tempos de exposição mais curtos (4 horas) até os mais longos (72 horas), em contraste com as células-controle, com uma resposta negativa ao método.

Uma possível explicação para este fato, além da questão da intensa atividade nuclear, refere-se à hipótese do cádmio estar alterando o complexo DNA-proteínas (DNP), sendo que o mesmo pode estar interagindo com o DNA, reduzindo sua interação com histonas, permitindo uma maior eficiência da hidrólise pelo HCl no caso da reação de Feulgen, ou uma maior eficiência na remoção do DNA no caso da coloração pelo fast-green.

No caso da laranja não foi possível obter resultados satisfatórios com as duas técnicas. Uma hipótese que pode explicar o ocorrido se refere à fixação utilizada. Fixadores à base de aldeído como o utilizado no presente trabalho, formam pontes de metileno entre as cadeias de proteína, formando uma rede mais rígida dessas moléculas. Isso poderia ter dificultado a extração das mesmas durante a hidrólise pelo HCl na reação de Feulgen para a remoção de histonas, e na hidrólise com TCA para a remoção do DNA na coloração pelo fast-green.

Nesse caso, o fixador recomendado seria o etanol ou metanol e ácido acético na proporção de 3:1 (v/v) (MELLO, 1997).

De todo o modo, como os tempos de hidrólise foram os mesmos, os resultados revelaram uma diferença significativa entre os complexos DNP dos dois materiais utilizados. Revelaram ainda que esses complexos sofrem alterações decorrentes da ação do cádmio uma vez que foi utilizado o mesmo fixador para todos os materiais e tempos de incubação, e houve reação positiva e muito evidente para as células que se multiplicaram na presença do agente estressante. Assim, pode-se sugerir que o cádmio interfere no arranjo da cromatina, facilitando tanto a remoção de histonas na reação de Feulgen, quanto do DNA na reação do fast-green.

A impregnação pela prata é um método ainda não totalmente elucidado, mas cujo princípio baseia-se na reação de redução dos íons  $\text{Ag}^+$  para  $\text{Ag}^0$  (prata metálica). Normalmente, oxida radicais vic-glicóis ou outros radicais redutores presentes em proteínas e tem sido muito utilizado na identificação de nucléolos e, no presente método, para a região organizadora nucleolar. Assim, proteínas como nucleolina e outras, incluindo fatores necessários para a transcrição e processamento de RNA, contribuem para a precipitação da prata no método AgNOR (SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993).

Na cana-de-açúcar, o número de nucléolos aumentou de forma significativa nas células que se multiplicaram na presença do cádmio (região B), sendo que na região A não foi observada reação da prata em nenhuma das células para nucléolo. Na laranja não foi constatado aumento no número de nucléolos entre as células-controle e as células tratadas.

Os resultados reforçam a hipótese de intensa atividade de síntese por parte das células de cana-de-açúcar na região B, com núcleos também maiores e de coloração amarelo-intensa e nucléolos intensamente impregnados. Um outro fato que chama a atenção é a reação positiva do material citoplasmático à prata, indicando presença de proteínas que apresentam afinidade à mesma. Em laranja, essas proteínas citoplasmáticas estiveram presentes em grande quantidade para

o material tratado, sugerindo, também nesse caso, importantes alterações provocadas pelo cádmio.

A reação do PAS – ácido periódico seguido de reativo de Schiff – é feita em duas etapas: na primeira, hidroxilas de carbonos vicinais são oxidadas pelo ácido periódico resultando em dois grupos aldeídicos no local. Em seguida, o reativo de Schiff se liga aos grupos carbonila formados (CORTELAZZO, 1992). Assim, o método identifica o material celulósico, hemicelulósico e péctico das paredes celulares e, no citoplasma, glicoproteínas e amido (MAIA, 1979).

As respostas das células tratadas com cádmio à reação do PAS foram mais contundentes para as suspensões de cana-de-açúcar. Sabe-se que as paredes celulares de monocotiledôneas apresentam uma menor quantidade de xiloglicanos, compensada por glicanos lineares formados por ligações  $\beta 1-3$  e  $\beta 1-4$  e com interações menores com o material celulósico do que os xiloglicanos (CARPITA & GIBEAUT, 1993). Essa diferença na composição poderia explicar uma maior sensibilidade dessas paredes ao agente estressante. Entretanto, mesmo nas paredes celulares de dicotiledôneas esse fenômeno é bem observado quando do envelhecimento das culturas ou exposição a oligossacarídeos com atividade biológica (HAYASHI *et al.*, 1990; RUEL *et al.*, 1995;) ou durante o envelhecimento de culturas celulares de vegetais mantidas em suspensão (STREET *et al.*, 1972; HAYASHI & YOSHIDA, 1988; JOSELEAU *et al.*, 1992).

Alterações encontradas nas paredes de células de outras espécies, como a alga *Chara vulgaris*, não resultaram diretamente da ação de metais pesados, mas foram consequência de distúrbios em vários processos metabólicos envolvendo compostos químicos das mesmas (HEUMANN, 1987). Na região B dos agregados celulares de cana-de-açúcar é possível que o mesmo fato esteja ocorrendo. Danos na parede celular foram visualizados, com muito material fibrilar desprendendo-se da mesma, que é mais espessa em relação ao material controle, sugerindo uma alteração na interação dos componentes químicos desta estrutura, em decorrência do tratamento com o cádmio. Alterações na polimerização desses

compostos podem ser sugeridas como resultado da observação dos materiais em microscopia eletrônica de varredura.

Segundo GREGER & BERTELL (1992) e BISHNOI *et al.* (1993), os metais pesados interferem no metabolismo do amido, alterando a concentração dessa reserva. Na laranja, o que mais chamou a atenção foi à presença constante de amido nas células-controle e nas células tratadas. Com o objetivo de não gerar dúvidas quanto ao componente químico referido, procedeu-se à análise das células em microscopia de luz polarizada, obtendo-se as figuras birrefringentes e características em cruz-de-malta que identificam os grãos de amido (CORTELAZZO, 1992). Esses resultados foram ainda confirmados pelas dosagens realizadas, não tendo sido observadas diferenças significativas nas quantidades de amido em todos os tempos e materiais utilizados, o que leva a crer que, pelo menos nestas condições, o cádmio parece não interferir diretamente na reserva de amido nesta espécie, assim como para a cana-de-açúcar.

Todas as técnicas utilizadas apontaram para uma atividade nuclear aumentada, sugerindo também uma intensa atividade de síntese protéica. Os resultados obtidos após a coloração pelo xylidine ponceau a pH 2,5 também indicaram esse aumento nas células do material tratado, principalmente naquelas que se multiplicaram na presença do metal, que apresentaram conteúdo citoplasmático, assim como núcleo e paredes celulares, com reação mais forte ao corante. Esse comportamento foi mais evidente para as células de cana-de-açúcar do que de laranja.

Xylidine ponceau (XP) é um corante ácido portador de dois grupos sulfato e que, no pH utilizado, permite a identificação de proteínas totais por estarem protonadas (CORTELAZZO & VIDAL, 1991).

As extrações do material protéico com NaOH 0,1N não indicaram incrementos marcantes nesse polímero, pelo contrário, revelaram uma tendência a diminuição no caso da laranja. Nas células tratadas foram extraídas mais rapidamente as proteínas do que nas células do material controle, fato este que nos chamou atenção. Entretanto, os valores obtidos não revelaram alterações

significativas para esse material, contrariando de certa forma os resultados da citoquímica para proteínas.

Uma possível explicação reside no fato de que a presença do cádmio ( $Cd^{++}$ ) poderia aumentar a quantidade de radicais positivos disponíveis e, em função da sua possível complexação com o material protéico, superestimar a quantidade de proteínas.

Outra hipótese possível seria a variação na qualidade das proteínas. É sabido que metais pesados induzem a síntese de fitoquelatinas (ROBINSON *et al.*, 1993). Assim sendo é possível que a presença de proteínas, não necessariamente as fitoquelatinas, poderiam apresentar mais radicais catiônicos disponíveis, o que contribuiria para uma reação mais intensa ao corante. Além disso, sabe-se que esse grupo de proteínas tem peso molecular menor, o que poderia contribuir para o acesso das moléculas de XP.

Uma terceira hipótese não descartável seria a de que as proteínas observadas em maior quantidade nas células tratadas, sejam menos solúveis em hidróxido de sódio, já que este foi o solvente utilizado no método de extração das mesmas.

### **6.3. Análise ultra-estrutural**

Para o entendimento das análises da ultra-estrutura das células de cana-de-açúcar e de laranja, cabe ressaltar, que elas diferem em muito de células das respectivas plantas adultas. Trata-se de células não diferenciadas, extremamente vacuolizada, que apresentam parede celular bastante delgada e capacidade ativa de divisão. É possível observar a presença de plasmodesmos (laranja) ao longo das paredes celulares, assim como retículo endoplasmático, mitocôndrias, ribossomos e núcleo. Os cloroplastos estão ausentes, devido ao fato das mesmas serem cultivadas na ausência de luz. Além disso, nas suspensões celulares não

há autonomia total das células na produção do próprio alimento, havendo sempre a necessidade de suplementação de açúcares. As vesículas do complexo de Golgi são raras no material controle e facilmente encontradas após o tratamento com o cádmio. Foi possível encontrar grande quantidade de amido, principalmente na laranja.

Danos provocados por cádmio na ultra-estrutura de células, têm sido descritos em algas (SICKO-GOAD, 1982; HEUMANN, 1987), no tubo polínico de *Tradescantia* (SAWIDIS & REISS, 1995), em cianobactérias (FERNANDES-PIÑAS *et al.*, 1995), e *Allium cepa* (WIERZBICKA, 1998). Em todos esses trabalhos, os efeitos do cádmio foram observados em períodos curtos e em doses relativamente baixas.

Os resultados obtidos, com o presente trabalho, demonstram que as células de cana-de-açúcar são muito afetadas pelo cádmio, em curto período de tempo (4 horas) e em dose relativamente baixa (8 $\mu$ M). Na laranja as respostas foram mais discretas, apesar de terem sido observadas alterações semelhantes ao material de cana-de-açúcar.

Normalmente as paredes celulares contêm pectinas que são estabilizadas por cálcio. Sabe-se ainda que, altas concentrações de sais podem reagir com as mesmas, formando pectatos (JARVIS, 1982). Grandes concentrações de metais pesados podem interferir no complexo cálcio/pectina e, podem reduzir a elasticidade da parede celular (MATSUMOTO *et al.*, 1977). Conseqüentemente, o crescimento normal das células é inibido, o diâmetro celular pode ser alterado e as paredes tornam-se mais espessas. Ao que tudo indica (Prancha 10 – Figs. 36 e 39), o cádmio se associou às paredes celulares, tornando a matriz pectica menos flexível e, com isso, salientando a formação de lamelas na mesma, individualmente mais compactadas e eletrôn-densas, mas tornando a morfologia da parede mais heterogênea do que no material controle, cujas características de parede celular primária são evidentes.

Além disso, puderam ser confirmadas a formação de fibrilas detectadas pelo método do PAS, principalmente nas células mais superficiais dos agregados

celulares, tanto para a cana-de-açúcar quanto para a laranja. Esses resultados estão de acordo com outros obtidos na literatura para suspensões celulares que receberam tratamento de oligossacarídeos com atividade biológica como referido anteriormente (JOSELEAU *et al.*, 1992; RUEL *et al.*, 1995). Alterações na parede celular também foram descritas por HEUMANN (1987) na alga *Chara vulgaris*, tratada com cádmio e chumbo.

Normalmente, concentrações entre 1 e 100-M de metais pesados, têm efeitos distintos nas organelas celulares (SAWIDIS & REISS, 1995).

Os efeitos do cádmio nas organelas citoplasmáticas foram mais evidentes para os vacúolos, que se tornam compartimentalizados, de forma mais contundente em cana-de-açúcar (Pranchas 9-10), mas também evidentes para laranja (Pranchas 16-17). A compartimentalização do vacúolo tem sido descrita como importante estratégia de defesa de outras células vegetais, funcionando como vesículas de acumulação de metais pesados, a partir de seu transporte do citosol após complexação com fitoquelatinas (GRILL *et al.*, 1989).

A facilidade com que foi possível observar as vesículas do complexo de Golgi na cana-de-açúcar (Fig. 38) e na laranja (Fig. 55), confirma os resultados obtidos na microscopia de luz, que sugerem uma maior atividade de síntese nas células que foram submetidas ao tratamento pelo cloreto de cádmio. Essa atividade pode estar relacionada ao metabolismo pós-traducional de proteínas ou à síntese e excreção de polissacarídeos.

Sabe-se que baixas concentrações de mercúrio podem causar a dilatação de membranas do retículo endoplasmático e mitocôndrias nas algas *Chara vulgaris* e *Skeletonema costatum* (SMITH, 1983). Atribui-se esse efeito a danos provocados na regulação osmótica das células (HEUMANN, 1987). Esse fato, também foi observado nas eletromicrografias das células de cana-de-açúcar e laranja tratadas pelo cádmio e mostradas no presente trabalho.

O cádmio pode inibir a ação da ATPase de membranas e, especificamente do complexo ATP-sintetase presente nas membranas de mitocôndrias (HEUMANN, 1987). Com isso, pode-se esperar que haja uma compensação

dessa perda de eficiência através do aumento do número e/ou tamanho dessas organelas para possibilitar a produção de ATP.

Os resultados obtidos para cana-de-açúcar, que apresentou mitocôndrias maiores e aparentemente mais numerosas, reforçam essa hipótese. Além disso, se o cádmio atinge o interior dessas organelas, pode afetar as reações de oxidação-redução que ocorrem na matriz, tendo em vista que seu potencial de redução ( $E_o = -0,40 \text{ V}$ ) é ligeiramente maior do que o da Acetil-CoA ( $E_o = -0,48 \text{ V}$ ), podendo assim se reduzir a cádmio metálico e diminuir a eficiência do processo respiratório. Isso reforça ainda mais a idéia do aumento de metabolismo, não obrigatoriamente para a síntese de novas moléculas, mas também para compensar uma menor eficiência nos processos de obtenção de energia pelas células. Essa idéia é ainda reforçada pelos valores obtidos com as dosagens de açúcares realizadas, tendo em vista que houve diminuição de açúcares livres (diferenças estatisticamente significativas para cana-de-açúcar) e amido (sem diferenças estatisticamente significativas, mas com uma tendência à diminuição no material tratado).

Outra característica observada no presente trabalho foi a alteração sofrida pela cromatina, cujo estado de compactação foi menor para as células tratadas. Além disso, o número e reatividade dos nucléolos observados foram maiores. Essas observações indicam uma maior atividade de replicação/transcrição do material nuclear, um aumento na síntese de ribossomos em nível nucleolar e, conseqüentemente, intensa atividade de síntese protéica.

Finalmente, deve ser considerado que os resultados obtidos no presente estudo se referem a alterações sofridas por células cultivadas em suspensão. Sabe-se que células cultivadas *in vitro* podem se apresentar mais sensíveis aos tratamentos com metais pesados do que plantas cultivadas diretamente em solos contaminados (CHUKUMURA, 1993).

De todo o modo, os resultados apontam para profundas alterações morfológicas das células cultivadas e submetidas a tratamentos com cádmio, tanto para *Saccharum officinarum* quanto para *Citrus aurantium*, apesar desta última apresentar resultados menos contundentes, indicando diferenças de respostas

com relação à monocotiledônea utilizada. Estudos posteriores com espécies de mono e dicotiledôneas poderão confirmar se esta é uma característica desses grupos ou apenas referentes às duas espécies utilizadas.

## 7. CONCLUSÕES

O cádmio, em concentração de 8  $\mu$ M, induz alterações morfológicas e ultra-estruturais a partir de 4 horas de contato com as células em cultura. Essas alterações, decorrentes da resposta ao estresse, são mais evidentes após 72 horas de tratamento com o cloreto de cádmio, nas células que se encontram na região periférica dos agregados formados pela suspensão, em contínuo processo de divisão celular e proliferação. Na região interna desses agregados, as alterações são decorrentes dos danos diretos provocados pelo metal pesado.

Na região interna, observa-se morte celular, presença de núcleos picnóticos e, principalmente, lignificação das paredes das células limítrofes à região de proliferação. Nessa região, os núcleos apresentam cromatina descondensada, aumento no número de nucléolos, compartimentalização dos vacúolos e espessamento das paredes celulares. Ocorrem ainda alterações de forma, fissuras e protuberâncias com aspecto fibrilar na superfície das células.

O tratamento com cádmio provoca alterações significativas no conteúdo de proteínas, açúcares livres e solúveis, mas não na quantidade de amido presente nas células. Essas alterações, em tratamentos mais longos, tendem a

retornar aos valores inicialmente obtidos indicando uma resposta das células à situação imposta.

Nos tempos de tratamento e nas concentrações de cádmio utilizadas, as respostas obtidas foram mais evidentes nas células de cana-de-açúcar do que nas de laranja, tanto no que diz respeito aos danos provocados nas células, quanto às respostas das mesmas ao agente estressante.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L. R.; SALGADO, L. T.; MIGUENS, F. C.; FARINA, M. e AMADO FILHO, G. M. Immunocytochemical localization of cell wall polysaccharides in the brown alga *Padina gymnospora*. **Acta Microscopica**, 8: 811-812, 1999.
- BARCELÓ, A. R. Lignification in plant cell walls. **Int. Rev. Cytol.**, 176: 87-132, 1997.
- BARCELÓ, J. and POSCHENREIDER, C. Plant water relations as affected by heavy metals: a review. **J. Plant Nutri.**, 13: 1-37, 1990.
- BAZZAZ, F.A.; CARLSON, R.W. and ROLFE, G.L. The effect of heavy metals on plants: Part I. Inhibition of gas exchange in Sunflower by Pb, Cd, Ni and Ti. **Environ. Pollut.**, 7: 242-246, 1974.
- BISHNOI, N. R.; SHEORAN, I. S. and SINGH, R. Effect of cadmium and nickel on mobilization of food reserves and activities of hydrolytic enzymes in germinating pigeon pea seeds. **Biol. Plant.**, 35: 583-589, 1993.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-54, 1976.
- BROWN, D. H. and BECKETT, R. P. Intracellular and extracellular uptake of cadmium by the moss *Rhytiadelphus squarrosus*. **Ann. Bot.**, **55**: 179-188, 1985.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, **61**: 255, 1972.
- CABRERA, C.; LORENZO, M. L. GALLEG0, C.; LÓPEZ, M. C.; LILLO, E. Cadmium levels in food and feed crops, determined by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, **40**: 1631-1633, 1992.
- CARROL, R. E. The relationship of cadmium in the air to cardiovascular disease death rates. **J. Amer. Med. Ass.**, **198**: 267-269, 1996.
- CATALDO, C. D.; GARLAND, T. R. and WILDUNG, R. E. Cadmium uptake, kinetics in intact soybean plants. **Plant. Physiol.**, **73**: 844-848, 1983.
- CARPITA, N. C. and GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in the flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.**, **3**: 1-30, 1993.
- CHARDONNENS, A. N.; BOOKUM, W. M. T.; KUIJPER, D. J.; VERKLEIJ, J. A. C. and ERNST, W. H. O. Distribution of cadmium in leaves of cadmium tolerant and sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. **Physiol. Plant.**, **104**: 75-80, 1998.

- CHUKUMURA Comparison of the accumulation of cadmium, lead and zinc in cultivated and wild plant species in the derelict Enyigbe lead-zinc mine. **Toxicol. Environ. Chem.**, **38**: 167-173, 1993.
- CORTELAZZO, A. L. Starch detection and dosage in *Canavalia ensiformis* and *C. gladiata* cotyledons, during the plantlet development. **Rev. bras. Bot.**, **15**: 157-162, 1992.
- CORTELAZZO, A. L.; MARAIS, M. F. and JOSELEAU, J. P. Changes in peroxidases in the suspension culture of *Rubus fruticosus* during growth. **Plant Cell Tis. & Organ. Cult.**, **46**: 27-33, 1996.
- CORTELAZZO, A. L. and VIDAL, B. C. Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. **Revta. bras. Bot.**, **14**: 27-33, 1991.
- COSTA, G. and MOREL, J. L. Cadmium uptake by *Lupinus albus* L.: cadmium excretion a possible mechanism of cadmium tolerance. **J. Plant Nutri.**, **16**: 1921-1929, 1993.
- DAVIS, R. D. Cadmium – a complex environmental problem – Part II – Cadmium in sludge used as fertilizer. **Experientia**, **40**: 117-234, 1984.
- DEGRAEVE, N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. **Mutation Research**, **86**: 115-135, 1981.
- EARL, K. J. and VISH, T. J. Cadmium. In: OEHME, F. W. **Toxicity of heavy metals in the environment**. (Hazardous and Toxic Substances. Part 2). New York, Marcel Dekker Inc., 1979. p.620-622.

- FERNANDEZ-PIÑAS, F.; MATEO, P. and BONILLA, I. Ultrastructural changes induced by selected cadmium concentrations in the cyanobacterium NOSTOC UAM 208. **J. Plant Physiol.**, **147**: 452-456, 1995.
- FODOR, E.; SZABÓ-NAGY, A. and ERDEI, L. The effects of cadmium on the fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. **J. Plant Physiol.**, **147**: 87-92, 1995.
- FOULKES, E. C. The concept of critical levels of toxic heavy metals in target tissues. **Crit. Rev. Toxicol.**, **20**: 327-339, 1990.
- FUHRER, J. Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiol.**, **70**: 162-167, 1982.
- GREGER, M. and BERTELL, G. Effects of Ca<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> on the carbohydrate metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **J. Exptl. Bot.**, **43**: 167-173, 1992.
- GRIES, G. E. and WAGNER, G. J. Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. **Planta**, **204**: 390-396, 1998.
- GRILL, E.; LOFFLER, S.; WINNACKER, E. L. and ZENK, M. H. Phytochelatins, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamyl-cysteine, dipeptidyl transpeptidase phytochelatin synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 6838-6842, 1989.
- HAGEMEYER, J. and WAISEL, Y. Excretion of ions Cd, Li, Na and Cl by *Tamarix aphylla*. **Physiol. Plant.**, **73**: 541-546, 1988.
- HAGHIRI, F. Cadmium uptake by plants. **J. Environ. Quality**, **2**: 93- 96, 1973.

- HALLENBECK, W. H. Human health effects of exposure to cadmium. (Cadmium – a complex environmental problem. Part. II). **Experientia**, 40: 136-142, 1984.
- HAYASHI, T. and YOSHIDA, K. Cell expansion and single-cell separation induced by colchicine in suspension-cultured soybean cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 85: 2618-2611, 1988.
- HAYASHI, T.; YOSHIDA, K. and OHSUMI, C. Regeneration of colchicine-induced single carrot cells. **Agric. Biol. Chem.**, 54: 1567-1568, 1990.
- HERR, Jr., J.M. New uses for calcium chloride solution as a mounting medium. **Biotech. Histochem.**, 67: 9-13, 1992.
- HEUMANN, H. G. Effects of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgaris*. **Protoplasma**, 136: 37-48, 1987.
- HOWELL, W. M. and BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015, 1980.
- HUANG, C. Y.; BAZZAZZ, F. A. and VANDERHOEFF, L. N. The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. **Plant Physiol.**, 54: 122-124, 1974.
- JACOBSON, K. B. and TURNER, J. E. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. **Toxicology**, 16: 1-37, 1980.
- JARVIS, M. C. The proportion of calcium bound pectin in plant cell walls. **Planta**, 154: 344-346, 1982.

- JOSELEAU, J. P.; CARTIER, N.; CHAMBAT, G.; FAIK, A. and RUEL, K. Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension cultured plant cells. **Biochimie**, **74**: 81-88, 1992.
- JOSELEAU, J. P.; CORTELAZZO, A. L.; CHAMBAT, G. and RUEL, K. Activation of peroxidases from plant cells suspensions by xyloglucan oligosaccharide elicitors. **Plant Perox. Newsletter**, **8**: 1-6, 1996.
- KARATAGLIS, S.; MOUSTAKAS, M.; SYMEONIDIS, L. Effect of heavy metals on isoperoxidases of wheat. **Biol. Plant.**, **33**: 3-9, 1991.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, **27**: 137A, 1965.
- KRUPA, Z. Cadmium induced changes in the composition and structure of the light harvesting chlorophyll a/b protein complex II in radish cotyledons. **Physiol. Plant.**, **73**: 518-524, 1988.
- KRUPA, Z.; OQUIST, G.; and HUNER, N. P. A. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* a fluorescence analysis. **Physiol. Plant.**, **88**: 626-630, 1993.
- KÜPPER, H.; KÜPPER, F. and SPILLER, M. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophyll using the example of water plants. **J. Exptl. Bot.**, **47**: 259-266, 1996.
- MAIA, V. **Técnica histológica**. São Paulo, Atheneu, 2ed, 1979. 246p.
- MALDONADO, B. A. and VANHUUSTEE, R. B. Isolation of a cationic peroxidase from cultured peanut cells. **Can. J. Bot.**, **58**: 2280-4, 1980.

- MATSUMOTO, H.; MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E. Less involvement of pectin in the precipitation of aluminum in pea roots. **Plant Cell Physiol.**, **18**: 325-335, 1977.
- McCAULL, J. Building a shorter life **Environment**, **13**: 2-15, 38-41, 1971.
- McCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V. and OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables. **Anal. Chem.**, **22**: 1156-8, 1950.
- MELLO, M. L. S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Brasillian J. Genetic**, **20**: 257-264, 1997.
- MELLO, M. L. S. e VIDAL, B. C. A Reação de Feulgen. **Ciênc. Cult.**, **30**: 665-676, 1978.
- MURASHIGE, T. and TUCKER, D. P. H. Growth factor requirements of Citrus tissue culture – In: CHAPMAN, H. D. (ed.). **Proc. First Int. Citrus Symp.**, Univ. of California, Riverside, 1969. 155-1161p.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, **15**: 473-497, 1962.
- NAGEL, K.; ADELMEIER, U. and VOIGT, J. Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **J. Plant Physiol.**, **149**: 86-90, 1996.
- OBATA, H. and UMEBAYASHI, M. Effects of cadmium on mineral nutrient concentration in plants differing in tolerance for cadmium. **J. Plant Nutr.**, **20**: 97-105, 1997.

- PAGE, A. L. and BINGHAM, F. T. Cadmium residues in the environment. **Res. Rev.**, **48**: 1-44, 1973.
- PAUL, K. G. and STIGBRAND, T. Four isoperoxidases from horseradish root. **Acta Chem. Scand.**, **24**: 3607-17, 1970.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**, Piracicaba, Nobel, 11<sup>a</sup> ed, 1985. 466p.
- POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B. and BARCELO, J. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. **Plant Physiol.**, **90**: 1365-1371, 1989.
- PRASAD, M. N. V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Env. Exptl. Bot.**, **35**: 525-545, 1995.
- RAUSER, W. E. and ACKERLEY, C. A. Localization of cadmium in granules within differentiating and mature root cells. **Can. J. Bot.**, **65**: 643-646, 1987.
- REDDY, G. N. and PRASAD, M. N. V. Cadmium induced peroxidase activity and isozymes in *Oryza sativa*. **Biochem. Arch.**, **8**: 101-106, 1992.
- ROBARDS, K. and WORSFOLD, P. Cadmium: Toxicology and Analysis. **Analyst.**, **116**: 549-568, 1991.
- ROBINSON, N. J.; TOMMEY, A. M.; KUSKE, C. and JACKSON, P. J. Plant metallothioneins. **Biochem. J.**, **295**: 1-10, 1993.
- RODRIGUES, G. S. Pesticide contamination in the South Cone: A review. **Ciênc. Cult.**, **50**: 342-55, 1998.

- RUEL, K.; CORTELAZZO, A. L.; CHAMBAT, G.; FAIK, A.; MARAIS, M. F. and JOSELEAU, J. P. Rapid wall surface rearrangements induced by oligosaccharides in suspension-cultured cells. In: TERZI, M.; CELLA, R. & FALAVIGNA, A. (eds). **Plant Molecular and Cellular Biology**, Dordrecht, Kluwer Academic Publ., p.445-455. 1995.
- SALIM, R.; AL-SUBU, M. M.; DOULEH, A.; CHENAVIER, L.; HAGEMEYER, J. Effects of root and foliar treatments of carrot plants with lead and aluminum on the growth, uptake and the distribution of uptake of metals in treated plants. **J. Environ. Sci. Health, A 27**: 1739-1758, 1992(a).
- SALIM, R.; AL-SUBU, M. M.; SAHRHAGE, E. Uptake of cadmium from water by beech leaves. **J. Environ. Sci. Health, A 27**: 603-627, 1992 (b).
- SALT, D. E. and WAGNER, G. L. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a  $\text{Cd}^{++}/\text{H}^{+}$  antiport activity. **J. Biol. Chem.**, **268**: 12297-12302, 1993.
- SANITÀ DI TOPPI, L.; LAMBARDI, M.; PECCHIONI, N.; PASSAGLI, L.; DURANTE, M. and GABBRIELLI, R. Effects of cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*. **J. Plant Physiol.**, **154**: 385-391, 1999.
- SAWIDIS, T. and REISS, H. D. Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. **Protoplasma**, **185**: 113-122, 1995.
- SCHOROEREDER, H. A. and BALASSA, J. J. Abnormal trace metals in man: cadmium. **J. Chronic. Dis.**, **14**: 236-258, 1961.
- SCHWARZACHER, H. G. and WACHTLER, F. The nucleolus. **Anat. Embriol.**, **188**: 515-536, 1993.

- SCOTT, Jr., T. A. and MELVIN, E. H. Determination of dextran with anthrone. **Anal. Chem.**, **25**: 1656-61, 1953.
- SHAH, K. and DUBEY, R. Effect of cadmium on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings. **Plant Physiol. Biochem.**, **33**: 577-584, 1995.
- SHERLOCK, J. C. Cadmium in foods and the diet. **Experientia**, **40**: 152-156, 1984.
- SICKO-GOAD, L. A morphometric analysis of algae response to low dose, short-term heavy metal exposure. **Protoplasma**, **110**: 75-86, 1982.
- SILVA, T. R. G.; CORTELAZZO, A. L. and DIETRICH, S. M. Cytological aspects of storage mobilization in seeds of *Dalbergia miscolobium* during germination and plantlet growth. **Ciênc. Cult.**, **49**: 219-222, 1997.
- SIROVER, M. A. and LOEB, L. A. Infidelity of DNA synthesis "in vitro": screening for potential metal mutagens of carcinogens. **Science**, **194**: 1434-1436, 1976.
- SMITH, M. A. The effect of heavy metals on the cytoplasmic fine structure of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta). **Protoplasma**, **116**: 14-23, 1983.
- SOUTHERTON, S. G. and DEVERALL, B. J. Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. **Physiol. And Mol. Plant Pathol.**, **36**: 483-494, 1990.
- SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **J. Ultrastruct. Res.**, **26**: 31, 1969.

- STEEL, R. G. D. and TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. 2<sup>a</sup> ed. New York, McGraw-Hill, 1980. 633p.
- STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T-H.; HORAK, O.; KUNDI, M. and KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Env. Mol. Mutagen.**, **31**: 183-191, 1998.
- STREET, E. M.; DAVEY, M. R. and SUTTON-JONES, B. Ultrastructure of plant cells growing in suspension culture. **Symp. Biol. Hung.**, **14**: 145-159, 1972.
- TANAKA, K. High resolution scanning electron microscopy of the cell. **Biol. Cell**, **65**: 89-98, 1989.
- TAS, J.; VAN DER PLOEG, M.; MITCHELL, J. P. and COHN, N. S. Protein staining methods in quantitative cytochemistry. **J. Microsc.**, **119**: 295-311, 1980.
- VALLEE, B. L. and ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Ann. Rev. Biochem.**, **41**: 91-129, 1972.
- VANCE, C. P.; KIRR, T. K. and SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Ann. Ver. Phytopathol.**, **18**: 259-288, 1980.
- VASSILEV, A., BEROVA, M. and ZLATEV, Z. Influence of Cd<sup>2+</sup> on growth, chlorophyll content and water relations in young barley plants. **Biol. Plant.**, **41**: 601-606, 1998.
- VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. **Ann. Histochem.**, **15**: 289-96, 1970.

VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Mol. Biol.**, **22**: 45-64, 1977.

VÖGELI-LANGE, R. and WAGNER, G. J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. **Plant Physiol.**, **92**: 1086-1093, 1990.

WAALKES, M. P.; COOGAN, T. P.; BARTER, R. A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. **Crit. Rev. Toxicol.**, **22**: 175-201, 1992.

WALTER, M. H. Regulation of lignification in defense. In: BOLLET, T. MEINS, F. (eds). **Genes involved in plant defense**. Springer, Vien, pp. 327-352, 1992.

WHETTEN, R and SEDEROFF, R. Lignin Biosynthesis. **Plant Cell**, **7**: 1001-1013, 1995.

WIERZBICKA, M. Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips – ultrastructural studies. **Plant Sci.**, **133**: 105-119, 1998.

ZENK, M. H. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. **Gene**, **179**: 21-30, 1996.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE