

**“Relação Entre Estresse Oxidativo e a
Tolerância ao Alumínio (Al^{3+}) em Milho”**

Patricia Regina Salvatti Boscolo

Dissertação de Mestrado

Unicamp – 2001

Orientador: Prof. Dr. Renato Atilio Jorge

2001.2.1008



**Ao Pedro
por estar presente,
e com isso me dar forças.**

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Prof. Dr. Renato Atilio Jorge, pela orientação, apoio, dedicação, paciência e, principalmente, pela amizade.
- ✓ À minha mãe, Cleide, por sempre acreditar em mim.
- ✓ À minha avó Concilia, pelo apoio carinhoso.
- ✓ À Luciana, Sérgio e Isabella, pelo carinho constante.
- ✓ À Heloísa, sem a qual esse trabalho não teria surgido.
- ✓ A todos os meus amigos, que com sua amizade, participaram de todos os momentos: os ruins – ajudando a superar, e os bons – compartilhando a alegria.
- ✓ Aos colegas do laboratório, pela amizade e companheirismo.
- ✓ A todos os funcionários do Instituto de Química que, consciente ou inconscientemente, colaboraram nos grandes e nos pequenos detalhes para que esse trabalho fosse realizado.
- ✓ Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp por ter cedido as sementes e pela colaboração no desenvolvimento do projeto.
- ✓ À Faep, pelo auxílio financeiro na importação de reagentes.
- ✓ À Fapesp, pelo auxílio financeiro na forma de reserva técnica e bolsa.

Resumo

O objetivo do trabalho foi estudar a relação entre a toxidez do íon Al^{3+} e o estresse oxidativo em duas linhagens de milho, Cat 100-6 e S1587-17 - tolerante e sensível ao Al^{3+} , respectivamente. As observações visuais dos danos e da presença do Al^{3+} nas raízes, feitas com hematoxilina, indicaram que o milho tolerante possui mecanismos de defesa que possibilitam a exclusão do íon da raiz. A atividade de enzimas constituintes do sistema de defesa antioxidante PX, CAT, SOD e GR foram determinadas nos ápices das raízes das duas linhagens em diferentes concentrações e tempos de exposição ao Al^{3+} . As atividades encontradas para a SOD e PX foram 1,7 e 2,0 vezes maiores, respectivamente, na linhagem sensível ao alumínio, em $36 \mu\text{M}$ de Al^{3+} em 48 horas. Os resultados encontrados indicaram que o Al^{3+} interfere no processo de respiração celular, induzindo um aumento na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) no S1587-17. Os resultados mostraram que o Al^{3+} não induz oxidação de proteínas no Cat 100-6, enquanto há uma indução no S 1587-17. Esta indução foi dose e tempo-dependente e em $36 \mu\text{M}$ Al^{3+} em 48 horas de tratamento, observou-se a formação de 20 ± 2 nmol de carbonilas por mg de proteínas. Como o Al^{3+} não induziu a peroxidação de lipídeos, concluiu-se que a oxidação de proteínas é a via de degradação celular das ERO para o S 1587-17. Finalmente, o estresse oxidativo no milho sensível, consequência do tratamento com alumínio, induziu apoptose nas células da ponta da raiz. Todos esses resultados indicam que o Al^{3+} induz estresse oxidativo somente no milho sensível e que esse quadro é consequência da toxidez do alumínio em solos ácidos, e não sua causa.

Abstract

The objective of this work was to study the relation between Al-toxicity and oxidative stress in two maize lines, Cat100-6, Al-tolerant, and S1587-17, Al-sensitive. The injury caused by Al^{3+} and its presence, observed visually in roots using hematoxylin, indicated that tolerant maize has defense mechanisms that exclude the ion from roots. PX, CAT, SOD and GR activities were determined in root tips of both line maize, exposed to different Al^{3+} concentrations and time of exposure. SOD and PX found were 1,7 and 2,0 times greater, respectively, in sensitive maize treated by $36 \mu M$ of Al^{3+} in 48 hours. The results indicated that Al^{3+} interfere in cellular respiration process, increasing the formation of reactive oxygen species (ROS) in S1587-17. Al^{3+} exposure did not induce protein oxidation in Cat100-6, but induced in S1587-17. This induction was dose and time dependent and after $36 \mu M$ for 48 hours of Al^{3+} , it was observed the formation of 20 ± 2 nmol of carbonyls by mg of protein. However, Al^{3+} did not induce lipid peroxidation. These results indicated that cellular degradation of ROS in S1587-17 was for protein oxidation. Finally, oxidative stress in sensitive line induced apoptose in root tip cells. All results indicate that Al^{3+} induce oxidative stress just in sensitive maize and this is a consequence of aluminum toxicity in acidic soils, and not your cause.

CURRICULUM VITAE

Patricia Regina Salvatti Boscolo

Atividade Atual

2001

- **Analista Químico**
no Laboratório de Resíduos e Meio Ambiente da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.

Pós Graduação

1999 – 2001

- **Mestrado**
em Química pelo Instituto de Química da Unicamp.

Graduação

1995 – 1999

- **Bacharel em Química**
pelo Instituto de Química da Unicamp.

Técnico

1992 – 1994

- **Técnica em Química**
pela Escola Técnica Estadual Conselheiro Antonio Prado – ETECAP.

Prêmio

1999

- **Prêmio Lavoisier**
concedido pelo Conselho Regional de Química IV Região ao melhor aluno do Instituto de Química da Unicamp no período de 1996 a 1999.

Atividades Profissionais

2001

- **Química**
no Setor de Desenvolvimento de Métodos do LARA-MG – Laboratório Regional de Apoio Animal, do Ministério da Agricultura.

2000

- **Estagiária Docente**
QF632- Físico-Química Experimental do IQ da Unicamp.

1996 – 1997

- **Estagiária**
em laboratórios de pesquisa da FEQ da Unicamp.

1995

- **Estagiária**
no Laboratório de Controle de Qualidade da Robert Bosch Ltda.

Publicação e Projetos Científicos

2000

- **“Aluminum tolerance in maize”**
Menossi M, Maron LG, Jorge RA, Felix JM, Fukada MK, Stukart GC , Boscolo PRS, Mussi L, Kalvan HC, Bergamo RF, Ottoboni LMM, and Arruda P; Proceedings of the Workshop on Improving Phosphorus Acquisition Efficiency in Marginal Soils, EMBRAPA, Sete Lagoas, MG, Brasil, XIV1-XIV4.

1999

- **Bolsista de Verão**
no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Apoio: CNPq

1997-1999

- **Iniciação Científica**
no Instituto de Química da Unicamp. Apoio: CNPq e Fapesp.

Participação em Encontros e Congressos Científicos

2001

- **24ª Reunião Anual da SBQ**
- **XXX Reunião Anual da SBBq**

2000

- **XXIX Reunião Anual da SBBq**
- **Encontro Química Nova na Escola**
- **I Encontro Regional de Professores de Química**

1999

- **XXVIII Reunião Anual da SBBq**
- **International Workshop of Genetic Analysis and Engineering of Aluminum Tolerance in Plants**

1998

- **XXVII Reunião Anual da SBBq**
- **VI Congresso de Iniciação Científica da Unicamp**

Índice

1. Introdução	1
2. Objetivos	6
3. Materiais e Métodos	7
3.1 Reagentes e equipamentos	7
3.2 Sementes e germinação	8
3.3 Determinação do crescimento relativo da raiz	8
3.4 Determinação da atividade de alumínio nas soluções nutrientes	11
3.5 Visualização de Al ³⁺ na rizosfera utilizando hematoxilina	12
3.6 Quantificação de proteínas	12
3.7 Determinação da atividade de Superóxido Dismutase (SOD)	14
3.8 Determinação da atividade de Peroxidase (PX)	17
3.9 Determinação da atividade de Catalase (CAT)	20
3.10 Determinação da atividade de Glutathione Redutase (GR)	21
3.11 Determinação de possíveis reações não enzimáticas nos extratos	26
3.12 Determinação de peroxidação de Lipídeos	27
3.12.1 Ácido tiobarbitúrico	27
3.12.2 Alaranjado de xilenol	29
3.12.3 Cromatografia líquida de alta eficiência	31
3.13 Determinação de oxidação de proteínas	34
3.14 Detecção de apoptose	36
4. Resultados	38
4.1 Crescimento relativo da raiz	38
4.2 Atividade de alumínio nas soluções nutrientes	40
4.3 Visualização de alumínio na rizosfera com hematoxilina	41
4.4 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	48
4.5 Atividade da Peroxidase (PX)	51
4.6 Atividade da Catalase (CAT)	55
4.7 Atividade da Glutathione (GR)	56

4.8 Reações não enzimáticas nos extratos protéicos	60
4.9 Peroxidação de lipídeos	61
4.9.1 Ácido tiobarbitúrico	61
4.9.2 Alaranjado de xilenol	62
4.9.3 cromatografia líquida de alta eficiência	63
4.10 Oxidação de proteínas	66
4.11 Apoptose	69
5. Discussão	71
5.1 Aspectos gerais	71
5.2 Crescimento relativo da raiz	71
5.3 Superóxido Dismutase	72
5.4 Catalase e Peroxidase	74
5.5 Glutathione Redutase	76
5.6 Peroxidação de lipídeos	78
5.7 Oxidação de proteínas	80
5.8 Apoptose	82
5.9 O estresse oxidativo é causa ou consequência da toxidez do Al^{3+} ?	83
6. Conclusões	86
7. Bibliografia	87

1. Introdução

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante da crosta terrestre, depois do oxigênio e silício (Ma *et al*, 2001) e é tóxico a muitos organismos, incluindo plantas, peixes e mamíferos (MacDiarmid e Gardner, 1998). No solo, ele é encontrado na forma do íon Al^{3+} e, quanto às plantas, é o fator determinante da baixa produtividade agrícola em solos ácidos, os quais correspondem a 40% das terras aráveis do mundo (Foy *et al*, 1978). Esse é um quadro atual que atinge o cerrado, o qual está presente em 11 estados brasileiros e no distrito federal (tabela 1), uma área de 205 milhões de hectares (24,5 % do território nacional), dos quais 112 milhões são considerados impróprios para o cultivo.

Tabela 1: Distribuição da área territorial do cerrado pelos estados brasileiros e distrito federal. Considerando a área total do Brasil, o cerrado cobre 24,5 % do território (Caruso, 1997).

ESTADOS	ÁREA (%)
Minas Gerais	66.0
Tocantins	86.8
Mato Grosso	47.8
Mato Grosso do Sul	61.7
Piauí	64.8
Bahia	14.7
Maranhão	43.5
Ceará	1.4
Pará	0.9
Rondônia	16.9
Goiás	100.0
Distrito Federal	100.0
Total Brasil	24.5

Existem algumas espécies de plantas que são resistentes a quantidades fitotóxicas de alumínio. Em termos gerais, a resistência tem sido classificada em: mecanismo de exclusão de alumínio das raízes e mecanismos de resistência interna, nos quais o íon é tolerado no citosol. Os mecanismos de exclusão compreendem a imobilização do íon nas paredes celulares, efluxo ativo do íon

(Taylor, 1991), aumento do pH na rizosfera (Degenhardt *et al*, 1998), tornando o alumínio insolúvel, e liberação de ácidos orgânicos, principalmente cítrico e málico, que complexariam o íon na rizosfera, reduzindo sua atividade. Este último tipo de mecanismo foi observado em várias plantas (Delhaize *et al*, 1993b; Pellet *et al*, 1995; Jorge e Arruda, 1997; Larsen *et al*, 1998; Zheng *et al*, 1998, Ryan e Delhaize, 2001).

Mecanismos de tolerância interna também têm sido propostos, como a complexação do Al^{3+} por polipeptídeos (Basu *et al*, 1994) e ácidos orgânicos (Suhayda e Haugh, 1986), compartimentalização do íon no vacúolo (Taylor, 1991) e síntese de determinadas proteínas (Taylor *et al*, 1997; Somers *et al*, 1996). Contudo, não existem evidências diretas destes mecanismos e os trabalhos sobre tolerância ao íon Al^{3+} a nível intracelular são escassos.

Apesar dos efeitos tóxicos do alumínio serem bastante conhecidos, não se conhecem as causas da toxidez (Ryan e Delhaize, 2001). O principal sintoma da toxidez do Al^{3+} é a inibição do crescimento da raiz nas primeiras horas de exposição ao íon (Delhaize *et al*, 1993a) em concentrações micromolares (Ma *et al*, 2001). Algumas espécies de plantas são mais sensíveis ao Al^{3+} e variações podem ocorrer entre genótipos de uma mesma espécie. A exposição ao Al^{3+} causa danos às células das raízes, danos estes que atingem a célula desde a parede celular até o núcleo, causando um baixo crescimento e uma diminuição na produtividade.

O alumínio se liga forte e rapidamente aos sítios negativos da parede celular, interferindo na capacidade de troca iônica da parede (Matsumoto, 2000). A exposição ao íon induz a formação de calose, interfere na deposição de polissacarídeos na parede celular e aumenta sua rigidez por interação com pectinas (Rout *et al*, 2001). O Al^{3+} também interage fortemente com a membrana plasmática, alterando funções relacionadas a ela e interferindo em potenciais elétricos. A interferência causada pelo Al^{3+} na aquisição de água e elementos essenciais à célula, como cálcio, magnésio, fósforo e potássio, também já é conhecida (Rout *et al*, 2001). A entrada de alumínio no simplasma é rápida (Lazof *et al*, 1994) e Jones *et al* (1998a,b) sugeriram que vários sítios intracelulares

podem ser afetados pelo alumínio. Uma vez dentro da célula, o alumínio também interfere em processos relacionados ao núcleo, já que trabalhos indicam que o alumínio inibe o processo de divisão celular e pode ser encontrado associado ao DNA (Morimura e Matsumoto, 1978) e cromatina (Matsumoto *et al*, 1977).

Inúmeros artigos têm sido publicados nos últimos dez anos relacionando espécies reativas de oxigênio a determinados estímulos em plantas, em um processo conhecido como estresse oxidativo. Esses estímulos podem ser, por exemplo, variações de temperatura, exposição a metais, a ozônio, deficiência mineral e falta de água. Poucas publicações tratam especificadamente do estresse oxidativo induzido por alumínio, as quais indicam que existe uma relação entre a toxicidade do íon Al^{+3} e a produção de enzimas relacionadas a espécies oxidativas de oxigênio e a peroxidação de lipídios (Cakmak e Horst, 1991; Verstraeten *et al*, 1997, Yamamoto *et al*, 2001).

A produção de espécies reativas de oxigênio provém de reações da flavina desidrogenase, transporte de elétrons na mitocôndria e fotossíntese (Lamb e Dixon, 1997) e é um processo contínuo sob condições aeróbicas. Calcula-se que cerca de 2% do consumo mitocondrial de oxigênio resulta na produção do íon superóxido $O^{\cdot-}$ (Cadenas *et al*, 1977). Apesar da moderada reatividade química do superóxido em água, este íon pode contribuir para a formação de outras espécies mais reativas, como água oxigenada (H_2O_2) e radical hidroxila $\cdot OH$. A mitocôndria possui um eficiente sistema antioxidante de defesa, representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathionas peroxidase e redutase, NAD(P)H transidrogenase, entre outras (Vercesi *et al*, 1997). Em condições fisiológicas, o sistema oxidante/antioxidante está balanceado. Porém, sob condições nas quais um excesso de espécies reativas de oxigênio está presente, induzida por um determinado estímulo, instala-se um quadro de estresse oxidativo. Suas consequências variam de célula para célula e a mitocôndria não somente produz espécies reativas de oxigênio, como também é o sítio primário da toxidez (Gille e Sigler, 1995). Um dano importante relatado é a liberação descontrolada de cálcio pela mitocôndria e inibição da síntese de ATP. Além disso, em células endoteliais, H_2O_2 provoca uma redução nos níveis de glutathiona e ATP (Spragg *et al*, 1985),

liberação de cálcio, aumento da permeabilidade da membrana e danos aos mecanismos de transdução de sinal (Vercellotti *et al*, 1991; Ryter e Tyrrell, 1998).

Além da peroxidação de lipídeos, espécies reativas de oxigênio podem causar danos às membranas (Kristian e Siesjo, 1998) através da inibição da metilação de fosfolipídeos, processo importante para o ajuste da fluidez da membrana e para a atividade de enzimas ligadas a ela. Apesar dos danos causados a lipídeos e proteínas serem parcialmente reparados por novas sínteses, os danos causados ao DNA dificultam a habilidade sintética das células e sua habilidade de replicação. Além disso, ocorre uma diminuição significativa nos níveis de NAD⁺ e ATP, o que pode provocar a morte da célula (Berger, 1991).

Cakmak e Horst (1991) estudaram o efeito do alumínio na peroxidação de lipídeos e nas atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase e guaiacol peroxidase em pontas de raízes de um cultivar de soja sensível ao alumínio. A peroxidação de lipídeos aumentou significativamente somente após 24 horas de tratamento com 40 µM de AlCl₃ e foi estimulada na presença de ferro. A atividade de SOD também aumentou, indicando que o íon superóxido estava presente dentro da célula em maior quantidade após tratamento com alumínio. Além disso, a atividade da peroxidase foi acentuada tanto em tratamentos com baixa concentração de alumínio quanto em tratamentos mais curtos (24 horas). No entanto, os autores não fizeram o mesmo estudo em um cultivar tolerante, o que poderia fornecer uma melhor discussão dos resultados com relação à toxidez ao alumínio.

Um estudo sobre a capacidade do Al³⁺, além de outros íons metálicos como Ga³⁺ e La³⁺, em promover danos oxidativos às membranas de cérebros de ratos, foi feito por Verstraeten *et al* (1997), que observaram um aumento na peroxidação de lipídeos e na concentração de carbonilas associadas a proteínas em mielina e em membranas sinápticas, *in vivo* e *in vitro*. Os autores propõem que esses metais formam clusteres de fosfolipídeos negativamente carregados nas membranas que promovem reações de redução. Segundo Levine *et al* (1990), a introdução de grupos carbonílicos em resíduos de amino ácidos de proteínas é característica de uma modificação oxidativa.

Richards *et al* (1998), analisando mudanças nas expressões genéticas de *Arabidopsis thaliana* após 2 horas de tratamento com alumínio, observaram que dos genes induzidos, 4 são conhecidos por serem induzidos em condições de estresse oxidativo, indicando que os íons alumínio promovem um quadro de estresse oxidativo nas células da planta.

Os resultados mostrados na literatura até o momento indicam que pode haver uma relação entre estresse oxidativo e o efeito tóxico dos íons alumínio. Deste modo, o estudo dessa possível relação entre o estresse oxidativo e a fitotoxicidade do alumínio é importante, pois permitirá maior compreensão da ação deste íon a nível intracelular. A obtenção dessas informações poderá colaborar para um futuro aumento da produtividade agrícola em solos ácidos, ajudando na elucidação dos mecanismos de toxidez das plantas ao Al^{3+} , que apesar de intensos estudos, continuam sem ser completamente entendidos.

2. Objetivos

De forma geral, o objetivo do trabalho é estudar a relação entre a toxidez e/ou a tolerância ao alumínio (Al^{3+}) e o estresse oxidativo em duas linhagens de milho:

- ✓ Verificar se a exposição das linhagens de milho ao alumínio gera um quadro de estresse oxidativo e em qual das linhagens isso ocorre;
- ✓ observar qual é a intensidade desse estresse oxidativo em função da concentração de alumínio;
- ✓ observar qual é o perfil da indução desse estresse em função do tempo de exposição ao alumínio;
- ✓ verificar qual o comportamento das atividades enzimáticas e da degradação celular por peroxidação de lipídeos e oxidação de proteínas em função da concentração e do tempo de exposição ao alumínio;
- ✓ observar se o estresse oxidativo causa morte celular programada nas células da ponta da raiz através da detecção de altos índices de fragmentação cromatínica;
- ✓ relacionar o sistema de defesa enzimático com mecanismos de tolerância ao alumínio já conhecidos;
- ✓ relacionar os efeitos do estresse oxidativo com os efeitos da toxidez ao alumínio também já conhecidos;
- ✓ comparar os todos os resultados obtidos para a linhagem tolerante com a sensível e
- ✓ verificar se o estresse oxidativo é causa ou consequência da toxidez ao alumínio.

3. Materiais e Métodos

3.1 – Reagentes e equipamentos

Os reagentes Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA), Ácido Tricloroacético (TCA), Guanidina Hidroclórica, L-Metionina, *Nitro Blue Tetrazolium*, Riboflavina, Guaiacol, Glutathiona Oxidada (GSSG), β -NADPH, Ácido 5,5'-Ditiobis-Nitrobenzóico foram obtidos da Sigma (EUA). O reagente BioRad Protein Assay para quantificação de proteínas foi obtido da BioRad e o *kit In Situ Cell Death Detection* para detecção de apoptose da Boehringer Mannheim (Alemanha). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Os equipamentos utilizados estão listados a seguir:

- Espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A Diode Array
- Controlador de temperatura Hewlett Packard 89090A ($\pm 0,1^\circ\text{C}$)
- Microbalança Perkin Elmer AD-6 Autobalance
- Balança Analítica Mettler AE200 ($\pm 0,1$ mg)
- Microcentrífuga Revan 14000D
- Balança Técnica Mettler PJ 4000 ($\pm 0,1$ g)
- Banho Termostatizado Büchi 461 Water Bath (30 – 100 °C)
- Vortex Biomatic 1005/853
- Capela de Fluxo Laminar Horizontal VECO
- Autoclave Vertical Phoenix
- Estufa de Cultura 002CB Fanem Ltda
- Microscópio Zeiss
- Estereoscópio Leica
- Cromatógrafo Líquido 600E, Detetor 484 e Registrador 746 Waters

O espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A Diode Array utilizado para as medidas cinéticas possui um detetor formado por um arranjo de diodos. Este tipo de detector permite que a absorvância seja medida nos comprimentos de onda de 190 a 820 nm quase instantaneamente. Isso permite que as determinações

cinéticas sejam feitas adquirindo-se espectros de absorção em intervalos de até, no mínimo, 2 segundos. Assim, a variação da absorbância em um determinado comprimento de onda pode ser visualizada pelos gráficos de absorbância em função do tempo, como também pela variação do perfil de todo o espectro de absorbância em função do comprimento de onda, já que em cada medida, todo o espectro é adquirido.

3.2 – Sementes e germinação

As linhagens aproximadamente isogênicas CAT 100-6, tolerante ao alumínio, e seu variante somaclonal S1587-17, sensível ao alumínio, foram obtidas do Banco de Sementes do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp – CBMEG.

As sementes das duas linhagens foram esterilizadas com uma solução 1:4 de hipoclorito de sódio (NaClO) por 10 minutos, contendo 1 gota de uma solução 50% em volume de surfactante Tween 20. Este surfactante foi utilizado para redução da tensão superficial, eliminando as bolhas de ar das sementes e, portanto, aumentando a eficiência da esterilização. A solução de hipoclorito de sódio foi preparada a partir da diluição do hipoclorito de sódio comercial, marca Cândida, de concentração 2,0-2,5%, mantido em geladeira.

Após a esterilização, as sementes foram transferidas para uma capela de fluxo laminar e lavadas 8 vezes com água destilada deionizada esterilizada em autoclave para a total retirada do NaClO. As sementes das duas linhagens foram então colocadas para germinação em papel de filtro umedecido, dentro de uma estufa a 30°C, no escuro, em condições assépticas por 60 horas.

3.3 – Determinação do crescimento relativo da raiz

O crescimento relativo da raiz (CRR) é uma medida relativa entre o crescimento de raízes das plantas tratadas em soluções contendo diferentes concentrações de alumínio e de raízes tratadas em uma solução controle, sem alumínio, em função do tempo. A partir dessa medida é possível observar o efeito do íon Al^{3+} no crescimento das plantas.

Após 60 horas de germinação, as plantas foram transferidas para potes de plástico contendo solução nutriente com 0 (controle), 6, 36 e 60 μM de Al^{3+} . A solução nutriente utilizada possuía a seguinte composição: 500 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 500 μM KNO_3 , 2 μM KH_2PO_4 , 250 μM NH_4NO_3 , 125 μM MgSO_4 , 2 μM MnCl_2 , 2 μM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$.EDTA, 11 μM H_3BO_3 , 0,35 μM ZnSO_4 , 0,2 μM CuSO_4 e 0,2 μM Na_2MoO_4 , com pH ajustado em 4,1 com HCl (Jorge e Arruda, 1997). As soluções de MgSO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ foram padronizadas conforme Flaschka (1969) e os demais sais foram secos em estufa a 80°C por uma noite, antes do preparo das soluções. A solução de alumínio 0,01 mol L^{-1} foi preparada a partir de cloreto de alumínio AlCl_3 e padronizada através de retrotitulação de EDTA com sulfato de zinco Padrão 0,01 mol L^{-1} , em solução tampão $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{KCl}/\text{NaOH}$ pH 10, utilizando Zincon como indicador (Kinnunem e Merikanto, 1955). Diferentes quantidades dessa solução de alumínio foram adicionadas aos frascos para obtenção das soluções contendo 6, 12, 36 e 60 μM de Al^{3+} .

O sistema montado para o tratamento das plantas pode ser visualizado na figura 1. A aeração e agitação da solução nutriente foram feitas utilizando-se ar comprimido previamente tratado, que era passado por um frasco contendo uma solução concentrada de hidróxido de sódio. Esse tratamento foi feito para diminuição da quantidade de CO_2 do ar, que provoca abaixamento do pH da solução nutriente em tratamentos muito longos. Além disso, as plantas eram colocadas em placas de isopor para que permanecessem suspensas na solução.

A temperatura da sala foi controlada em aproximadamente 25 °C utilizando-se um ar condicionado e as plantas foram iluminadas 18 horas por dia, através de duas lâmpadas brancas fluorescentes e duas luzes GroLux, marca Sylvania F40WT12.



Figura 1: Sistema utilizado para tratamento das plantas em soluções nutrientes contendo 0 (controle), 6, 12, 36 e 60 μM de Al^{3+} , em pH 4,1. As soluções eram aeradas e agitadas através de ar comprimido. Este passava previamente por uma solução concentrada de NaOH para diminuição da quantidade de CO_2 do ar, evitando o abaixamento do pH da solução durante tratamento.

As raízes submetidas aos tratamentos foram medidas com uma régua com precisão de 0,5 mm em intervalos de tempo. A determinação do crescimento relativo da raiz (CRR) é feita segundo a equação 1.

$$CRR = \frac{T_f - T_i}{C_f - C_i} \quad [1]$$

onde T_f e C_f são os comprimentos das raízes das plantas, em cm, em um determinado tempo de tratamento em solução nutriente com alumínio e controle, respectivamente, e T_i e C_i são os comprimentos das raízes imediatamente anterior ao início do tratamento. O CRR em tempo zero é definido como sendo 1.

As diferenças $T_f - T_i$ e $C_f - C_i$, na equação, representam a média de, no mínimo, 8 plantas. A média amostral e o desvio padrão foram determinados segundo as equações 2 e 3, respectivamente (Barros Neto *et al*, 1995):

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [2]$$

$$s = \sqrt{\left(\frac{1}{N-1}\right) \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad [3]$$

nas quais: \bar{x}_i – i-ésima observação
 x – média amostral
 N – número total de observações
 s – desvio padrão

No cálculo de CRR, o desvio foi determinado segundo a propagação de erros para a equação 4, conforme equação 5 (Squires, 1968).

$$Z = \frac{A}{B} \quad [4]$$

$$\Delta Z = Z \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2} \quad [5]$$

3.4 – Determinação da atividade de alumínio nas soluções nutrientes

A espécie tóxica de alumínio é Al^{3+} . Em uma solução aquosa com pH 4,1, acima de 90% do alumínio está na forma tóxica (figura 2). Entretanto, em soluções contendo outras espécies químicas e em solos, o Al^{3+} pode participar de reações de complexação com vários ligantes. Assim, a quantidade de alumínio tóxico às plantas é mais bem refletida pela atividade química do íon Al^{3+} do que pela sua concentração molar. A atividade dos íons alumínio nas soluções nutrientes, em pH 4,1, foi determinada utilizando-se o programa Geochem 2.0 (Parker *et al*, 1995).

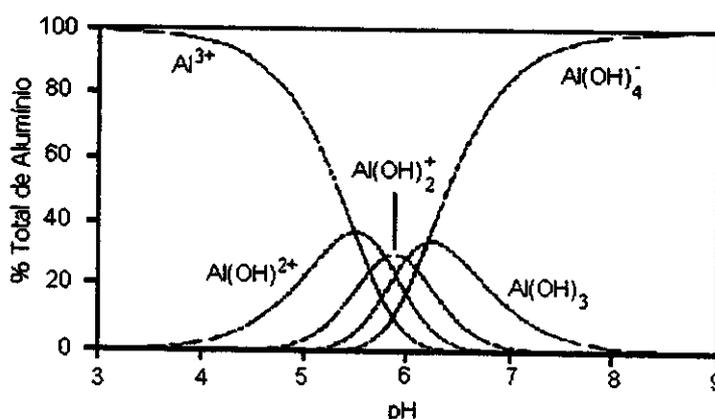


Figura 2: Distribuição em porcentagem do íon Al^{3+} e seus complexos $Al(OH)_n$ em solução aquosa com 1 μM total de alumínio, segundo o pH da solução (Harris *et al*, 1996).

3.5 – Visualização de Al^{3+} na rizosfera utilizando hematoxilina

As raízes foram tratadas com solução nutriente contendo 0, 6, 12, 36 e 60 μM de Al^{3+} , por 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Após tratamento, as raízes foram lavadas com água destilada deionizada por 20 minutos, imersas em solução de hematoxilina por 30 minutos e lavadas novamente com água destilada deionizada por 20 minutos. A solução de hematoxilina contém 0,2 g de hematoxilina e 0,02 g de iodato de potássio (KIO_3) em 100 mL de água destilada deionizada e foi preparada no dia anterior à análise (Delhaize *et al*, 1993a). As pontas foram cortadas e fotografadas em um Estereoscópio MZ12₅ LEICA.

3.6 – Quantificação de proteínas

A quantidade de proteínas em cada extrato foi determinada segundo Bradford (1976). Foi utilizado o reagente BioRad Protein Assay, que após interações com as proteínas absorve em 595 nm. Uma curva analítica com Albumina Bovina (BSA) foi construída para relacionar a intensidade da Absorbância a 595 nm e a quantidade de proteínas (figura 3).

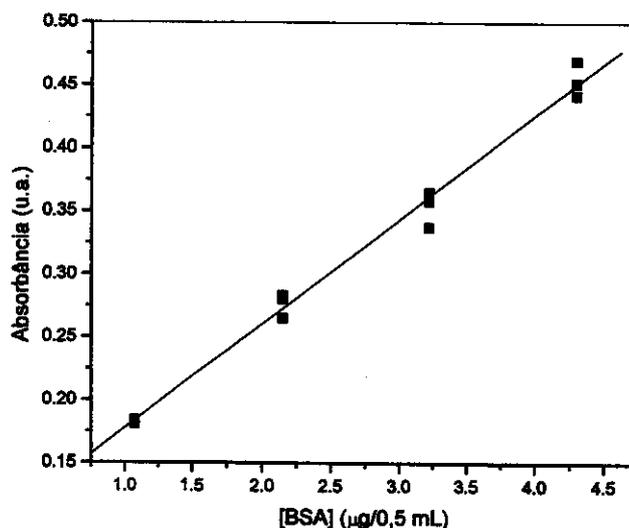


Figura 3: Curva analítica de absorvância em função da quantidade de BSA, construída variando-se a concentração de proteína e adicionando-se corante. As medidas foram realizadas a 595 nm em duplicata, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico com capacidade para 600 µL.

As medidas de absorção foram feitas em duplicata, em dois dias diferentes, obtendo-se um total de quatro pontos para cada concentração de proteínas observada. Todos os pontos obtidos estão na figura 3 e mostram uma dependência linear entre a absorvância e a quantidade de proteína BSA na faixa de concentração de 1,0 a 4,5 µg por 0,5 mL de solução. A equação 6 foi obtida a partir do gráfico e utilizada para a determinação da concentração de proteínas nos extratos:

$$Abs = 0,095 + 0,083.[proteínas] \quad [6]$$

na qual: Abs – Absorvância (u.a.)

[proteínas] – concentração de proteínas (µg/0,5mL)

3.7 – Determinação da atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1) foi feita segundo o método descrito abaixo, modificado de Giannopolitis e Ries (1977) e Beyer e Fridovich (1987). Para as análises dose dependentes, após 48 horas de tratamento, as pontas das raízes tratadas com 0, 6, 12, 36 e 60 μM de alumínio foram cortadas em (5 - 6) mm , após terem sido lavadas 3 vezes com água destilada deionizada. Já as análises tempo dependentes, as plantas foram tratadas com 36 μM de alumínio por 24, 48 e 72 horas. O tempo inicial ($t = 0$ h) corresponde às plantas não tratadas. Após os tratamentos, as pontas foram maceradas em almofariz com 1 mL de tampão HEPES/KOH pH 7,8 50 mM e EDTA 0,1 mM. A mistura foi centrifugada por 8 minutos a 10000 g e o sobrenadante permaneceu em gelo até a análise. As proteínas do extrato obtido foram quantificadas segundo Bradford (1976) conforme item 3.6.

A mistura de reação utilizada foi constituída por tampão HEPES/KOH pH 7,8 50 mM, EDTA 0,1 mM, carbonato de sódio (Na_2CO_3) 50 mM, L-metionina 12 mM e riboflavina 1 μM , para um volume final de 2,5 mL. Por último foram adicionados 50 μL de extrato e *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) para uma concentração final de 7,5 μM em uma cubeta de vidro de 5 cm de caminho óptico. O espectro de absorção foi adquirido e a cubeta foi transferida para um suporte e exposta por 5 minutos à luz fluorescente (Sylvania F15WT2). Este suporte, construído em nosso laboratório, garantia que todas as amostras permanecessem a 4 cm da lâmpada, recebendo, assim, a mesma quantidade de luz. Após a iluminação, novo espectro de absorção foi obtido e a variação da absorbância a 560 nm foi calculada subtraindo-se a absorção inicial da final, após exposição à luz.

Beauchamp e Fridovich (1971) definiram 1 unidade (U) de Superóxido Dismutase como a quantidade de enzima que inibe 50% da reação fotoquímica de redução do *Nitro Blue Tetrazolium*. Asada *et al*, (1974) observaram que a relação entre a concentração de SOD e as velocidades de reação na presença e na ausência da enzima quando utilizaram o sistema xantine/xantine oxidase, eram descritas pela equação 7.

$$\frac{V}{v} = 1 + K'[SOD] \quad [7]$$

na qual: V – velocidade de reação na ausência de SOD
 v – velocidade de reação na presença de SOD
 $[SOD]$ – concentração de SOD
 K' - constante

A constante K' corresponde ao coeficiente angular da reta descrita pela equação 7 acima e está relacionada com a concentração de NBT e a afinidade da enzima SOD e NBT com o radical superóxido O_2^- (Asada *et al*, 1974).

Para 50% de inibição da reação do NBT, o produto $K'[SOD]$ é igual a 1. Assim, Giannopolitis e Ries (1977) redefiniram que 1 unidade de SOD é a quantidade de enzima para a qual o produto $K'[SOD]$ é igual a 1. Com isso, a atividade da enzima pode ser obtida diretamente a partir da equação 9.

$$K'[SOD] = \left(\frac{V}{v}\right) - 1 \quad [8]$$

$$SOD(\text{unidades}) = \left(\frac{V}{v}\right) - 1 \quad [9]$$

Substituindo V e v pelas absorbâncias após 5 minutos de reação na ausência e na presença de enzima, respectivamente, tem-se a equação 10 que foi utilizada para determinação da atividade enzimática da SOD.

$$SOD(\text{unidades}) = \left(\frac{A_{aus}}{A_{pre}}\right) - 1 \quad [10]$$

Como o método de análise está baseado em uma reação catalisada por luz, alguns testes preliminares foram feitos para verificar se a luz ambiente iria interferir nas medidas. Assim, reações na ausência de extrato foram feitas, sendo

que uma recebeu iluminação da lâmpada fluorescente e a outra ficou exposta somente à iluminação da sala. Além disso, uma alíquota de extrato foi adicionada para verificar se ocorria inibição da reação. Os espectros de absorção obtidos para as amostras teste podem ser visualizados na figura 4. As determinações foram feitas em duplicata e as absorções abaixo de 400 nm foram desconsideradas devido à grande absorção do vidro da cubeta.

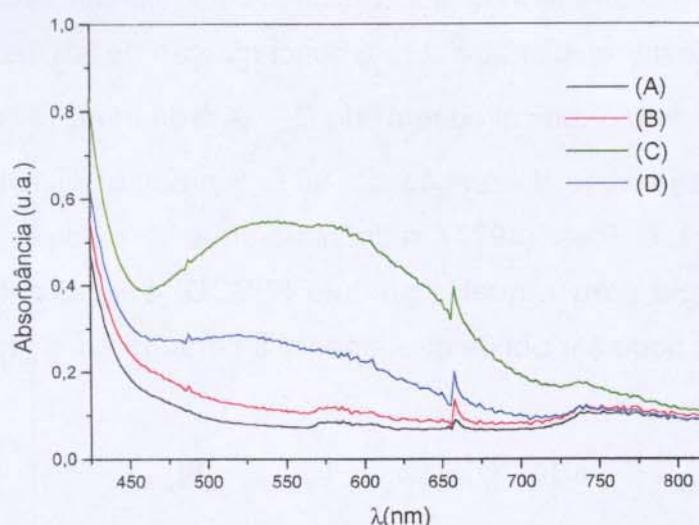


Figura 4: Espectros após 5 minutos de reação da redução do *Nitro Blue Tetrazolium*: curva (A) – espectro da mistura de reação logo após adição de NBT, (branco); curva B – exposição à luz ambiente; curva C – exposição à luz fluorescente e curva D – mistura de reação contendo 50 μL de extrato e exposto à luz fluorescente. A descontinuidade observada em 656 nm é característica do detetor.

A variação de absorbância foi determinada subtraindo-se o valor da absorção a 560 nm obtido na curva A. Observou-se que a variação da absorbância a 560 nm para a amostra exposta somente à luz ambiente (curva B) durante 5 minutos foi de $0,03 \pm 0,02$, enquanto que a variação na absorção da amostra iluminada (curva C) foi de $0,46 \pm 0,02$. Como, durante o método de análise, as amostras permanecem exposta à luz ambiente somente durante a aquisição

dos espectros de absorção, menos de 15 segundos, a reação provocada por essa iluminação foi desconsiderada.

Através da curva D correspondente à amostra contendo 50 μL de extrato de proteínas, observa-se a inibição da reação de fotorredução do NBT. A diferença de absorbância observada para essa amostra foi de $0,18 \pm 0,02$, significativamente diferente da absorbância da reação sem extrato.

3.8 – Determinação da atividade de Peroxidase (PX)

Para as análises dose dependentes, entre 10 e 15 plantas foram tratadas em soluções nutrientes contendo 0, 6, 12, 36 e 60 μM de alumínio por 48 horas, enquanto que para as análises tempo dependente, a concentração de 36 μM foi escolhida para o tratamento, que teve duração de 24, 48 e 72 horas. Além disso, a atividade da Peroxidase foi determinada nas plantas sem tratamento, após o período de germinação, o que corresponde ao tempo zero.

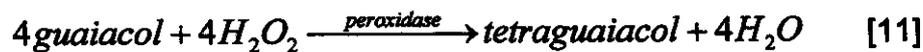
A atividade da enzima Peroxidase (EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método descrito abaixo, utilizando-se como substrato o guaiacol, modificado de Cakmak e Horst (1991). Após o tratamento, as raízes das plantas foram lavadas 3 vezes com água destilada deionizada para retirada da solução nutriente que poderia interferir nas análises devido à grande quantidade de íons presentes. As pontas das raízes foram cortadas em (5 – 6) mm, secas levemente com papel de filtro e transferidas para um almofariz, sendo então maceradas com 1 mL de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 6,8. A mistura foi mantida em gelo para evitar degradação das proteínas. Para a separação do sobrenadante, a mistura foi centrifugada a 10000 g por 8 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática. A concentração de proteínas foi feita segundo Bradford (1976), conforme descrito no item 3.6.

A solução de análise foi preparada em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, contendo tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 6,8, guaiacol 8 mM e 25 μL do extrato de proteínas. A reação foi iniciada com a adição de 200 μL de H_2O_2 0,1 mol L^{-1} , obtendo uma solução 8 mM na cubeta, e a variação da absorbância a 470 nm foi monitorada em função do tempo por 75 segundos, com

agitação magnética (400 rpm) utilizando-se um agitador magnético próprio para ser utilizado diretamente na cubeta de quartzo. A temperatura foi mantida constante em 25 °C.

Uma unidade de qualquer enzima é definida como a quantidade que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto, sob condições específicas (Dixon e Webb, 1964). A temperatura deve ser mantida constante e é sugerido que esta deva ser 25°C. Assim, para a Peroxidase (PX), uma unidade é a quantidade de enzima que catalisa a degradação de 1 μmol de H₂O₂.

A variação da absorbância a 470 nm corresponde à formação do tetraguaiacol, produto da reação entre o guaiacol, que atua como doador de átomos de hidrogênio, e a água oxigenada, que atua como receptor de átomos de hidrogênio. A reação pode ser representada pela seguinte equação 11.



Através do coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) obtido por Chance e Maehly (1955) e utilizado por Baccouch *et al.*, (1998), a concentração do tetraguaiacol após 1 minuto de reação pode ser determinada utilizando-se a Lei de Beer.

$$Abs = \epsilon bc \quad [12]$$

$$c = \frac{Abs}{\epsilon b} \quad [13]$$

nas quais: Abs – Absorbância (u.a.)

ϵ - coeficiente de absorvidade molar ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

b – caminho óptico (cm)

c – concentração (mM)

Como o tetraguaiacol é obtido a partir de 4 H₂O₂, para a determinação da quantidade em μmol consumida de substrato (H₂O₂) em 1 minuto de reação, o valor da concentração de tetraguaiacol deve ser multiplicado por 4. Esse valor deve ser multiplicado ainda pelo volume da cubeta, para conversão de μmolar em μmol. Dividindo-se pela quantidade de proteínas quantificadas no extrato e o volume do extrato adicionado, a correção com relação à quantidade de proteínas em cada amostra é feita. Além disso, multiplicando-se também duas vezes por 1000 para a conversão da concentração de mM para μM e da quantidade de proteínas de μg para mg, obtém-se a equação 14. O valor da atividade da enzima é expresso em Unidades mg⁻¹ de proteína, ou seja, μmol H₂O₂ /mg proteína em 1 minuto.

$$U = \frac{4 \cdot 10^6 \cdot V_C \cdot Abs}{V_E \cdot [prot] \cdot \epsilon \cdot b} \quad [14]$$

na qual: V_C – Volume final na cubeta de análise (L)
V_E – Volume de extrato adicionado (μL)
[prot] – concentração de proteínas no extrato (μg μL⁻¹)

Para verificar se ocorria formação do tetraguaiacol a partir da reação direta entre guaiacol e H₂O₂, observou-se a variação da absorbância a 470 nm na ausência de extrato. A figura 5 mostra que não ocorre reação entre o guaiacol e a água oxigenada detectável por esse método e que o tetraguaiacol formado provém da reação catalisada pela Peroxidase.

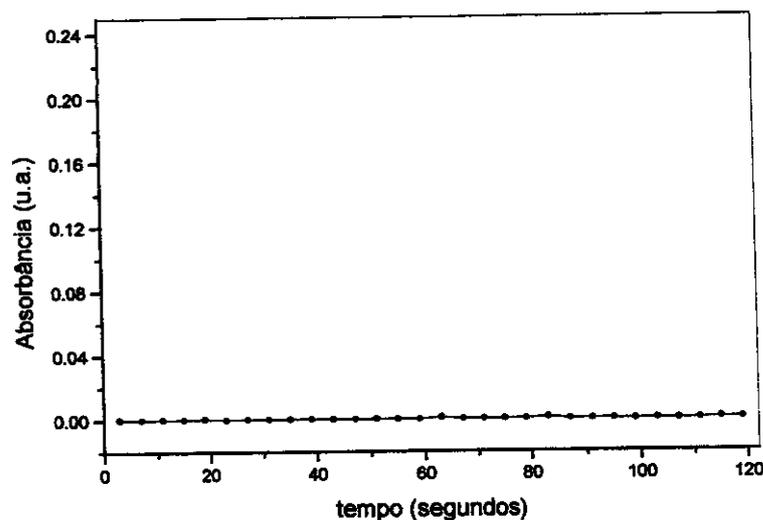


Figura 5: Variação da absorvância a 470 nm em função do tempo. A mistura de reação consiste em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 6,8, guaiacol 8 mM e H_2O_2 8 mM. A temperatura foi mantida a 25 °C, com agitação magnética de 400 rpm.

3.9 – Determinação da atividade de Catalase (CAT)

A atividade da enzima Catalase (EC 1.11.1.6) foi determinada segundo Cakmak e Horst (1991), adaptado de Chance e Maehly (1955). Após tratamento, as pontas das raízes foram cortadas em (5 – 6) mm e maceradas em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 6,8. Após centrifugação, a quantidade de proteínas nos extratos foi determinada pelo método Bradford (1976) conforme item 3.6.

A mistura de reação foi diretamente preparada em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e continha $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 6,8 e 300 μL do extrato de proteínas. Após adição de 200 μL de solução 0,1 mol L^{-1} de H_2O_2 , a diminuição da absorvância a 240 nm foi monitorada por 2 minutos, com agitação magnética (400 rpm) utilizando-se um micro agitador magnético. A temperatura foi mantida a 25 °C por um controlador de temperatura.

Para determinar a quantidade em mols de H_2O_2 consumida, utilizou-se o coeficiente de absorvidade molar ϵ - 39,4 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Cakmak *et al*, 1993) e a Lei de Beer (equação 12), a atividade da enzima catalase foi determinada em Unidades mg^{-1} de proteínas. Uma unidade (U) de enzima é definida como a

quantidade que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato (H_2O_2) por minuto, sob condições específicas.

A absorbância a 240 nm foi monitorada em uma mistura de reação na ausência de extrato de proteínas para verificar se a H_2O_2 não se degradava no meio reacional. Observou-se que não ocorre variação da absorbância a 240 nm, indicando que a água oxigenada não reage no meio reacional na ausência do extrato de proteínas. Assim, qualquer variação na absorbância na presença de extrato será devido às reações enzimáticas.

$$U = \frac{1.10^6 \cdot V_C \cdot Abs}{V_E \cdot [prot] \cdot \epsilon \cdot b} \quad [15]$$

A equação 15 que é utilizada para cálculo da atividade da Catalase é bastante semelhante à da Peroxidase (equação 14). A atividade enzimática é expressa em Unidades mg^{-1} de proteína ou $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1}$ proteína em 1 minuto.

3.10 – Determinação da atividade de Glutathione Redutase (GR)

O método utilizado inicialmente para a determinação da atividade da Glutathione Redutase (EC 1.6.4.2) em função da concentração e do tempo de tratamento com alumínio, consistiu no monitoramento da degradação do NADPH a 340 nm, modificado de Schaedle e Bassham (1977) e utilizado por Gosset *et al*, (1996).

As pontas das raízes, após lavagem com água destilada deionizada, foram cortadas e maceradas em almofariz com 1 mL de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 6,8. A mistura foi centrifugada a 10000 g durante 8 minutos e o sobrenadante coletado para análise da atividade da enzima.

A mistura de reação foi preparada diretamente na cubeta de vidro de 5 cm de caminho ótico e consistiu em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5 50 mM, EDTA 0,5 mM, glutathione oxidada (GSSG) 0,14 mM e 50 μL do extrato obtido das pontas das raízes, para um volume final de 2,5 mL. Após zerar o equipamento, adicionou-

se NADPH para obtenção de uma solução 0,05 mM e, após agitação, o decaimento da absorbância em 340 nm foi monitorada durante 5 minutos.

A velocidade de degradação do NADPH foi determinada em unidades de absorbância por minuto e a atividade da enzima a partir da definição de que uma unidade de Glutathione Redutase (GR) é a quantidade de enzima que catalisa a reação de 1 nmol de NADPH por minuto. Assim, utilizando-se a Lei de Beer (equação 12) e o coeficiente de absorvidade molar ϵ do NADPH ($6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a atividade da GR foi determinada segundo equação 16. A atividade da enzima é expressa em Unidades mg^{-1} proteína, que é o mesmo que nmol NADPH mg^{-1} proteína por minuto.

$$U = \frac{1 \cdot 10^9 \cdot V_C \cdot Abs}{V_E \cdot [prot] \cdot \epsilon \cdot b} \quad [16]$$

na qual: V_C – Volume final na cubeta de análise (L)
 V_E – Volume de extrato adicionado (μL)
[prot] – concentração de proteínas no extrato ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)

Para verificar se o NADPH reagia com a GSSG somente na presença do extrato obtido a partir das pontas das raízes, a absorbância a 340 nm foi monitorada em função do tempo na ausência do extrato. A figura 6 mostra que não ocorre degradação do NADPH e que a diminuição da absorbância quando o extrato de proteínas é adicionado se deve às reações enzimáticas.

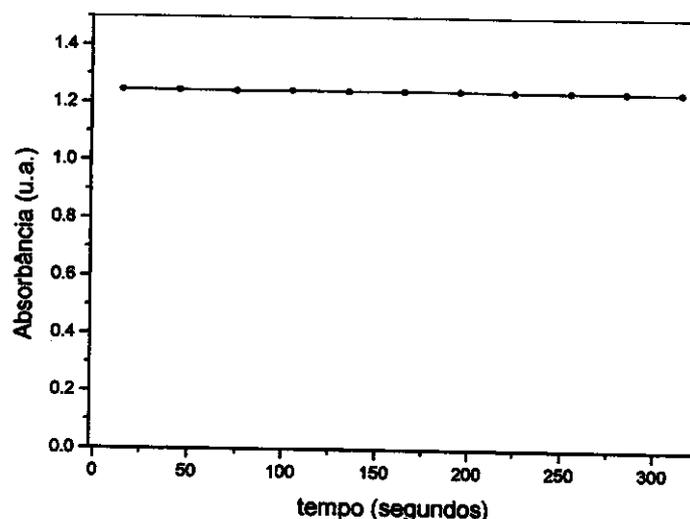


Figura 6: Absorbância a 340 nm correspondente ao NADPH em função do tempo. A mistura de reação continha tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM, GSSG 0,14 mM e NADPH 0,05 mM. Nenhuma variação da absorbância foi observada na ausência do extrato de proteínas, mostrando que NADPH e GSSG reagem somente na presença de glutathione redutase.

Depois de repetidas análises, observou-se que os resultados obtidos por esse método variavam muito. Outro método de análise para GR foi testado, apresentando melhores resultados com relação à reprodutibilidade. Assim, a determinação da atividade da Glutathione Redutase em função da concentração de alumínio foi feita utilizando-se o método baseado no reagente de Ellman, proposto inicialmente por Srere *et al* (1963) e utilizado com modificações por outros autores, como Gonzáles *et al* (1998). As análises da GR em função da concentração e do tempo de tratamento foram repetidas, apresentando resultados diferentes dos obtidos inicialmente.

O método utilizado está baseado no monitoramento da formação do ácido tio 2-nitrobenzóico (TNB) a partir da reação do ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) com glutathione reduzida (GSH), conforme figura 7. Este método possui uma sensibilidade no mínimo 4 vezes maior do que o baseado no monitoramento direto da degradação de NADPH (Smith *et al*, 1988), já que o coeficiente de

absortividade molar do TNB ($13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) é duas vezes maior do que o do NADPH ($6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e para cada GSSG que reage com NADPH, são formadas duas moléculas de GSH (figura 7).

As pontas das raízes, após lavagem com água destilada deionizada, foram cortadas e maceradas em almofariz com 1 mL de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 7,5. A mistura foi centrifugada a 10000 g durante 8 minutos e o sobrenadante coletado para análise da atividade da enzima.

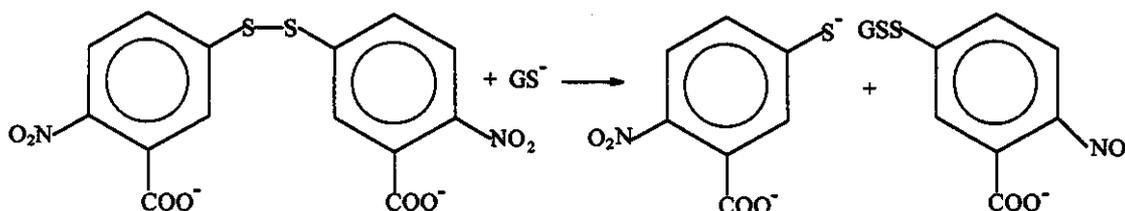
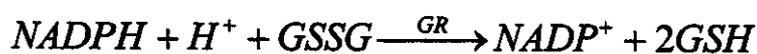


Figura 7: reações envolvidas no método de análise de Glutaciona Redutase utilizando-se o reagente de Ellman (Smith *et al*, 1988). Este método está baseado no monitoramento da formação do ânion do TNB a 412 nm (Tietze, 1969).

A mistura de reação foi preparada diretamente na cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico e consistiu em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM, NADPH 0,05 mM em tampão fosfato pH 7,5, DTNB 0,75 mM e 50 μL do extrato obtido das pontas das raízes, para um volume final de 2,5 mL. Após zerar o equipamento, adicionou-se GSSG preparada em tampão fosfato pH 7,5 para obtenção de uma solução 0,14 mM e a absorbância em 412 nm foi monitorada durante 2 minutos, com agitação magnética (400 rpm).

Uma unidade de Glutaciona Redutase (GR) é a quantidade de enzima que catalisa a reação de 1 nmol de NADPH por 2 minutos. Utilizando-se a Lei de Beer e o coeficiente de absortividade molar ϵ do TNB ($13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a atividade da GR foi determinada segundo equação 17. A atividade da enzima é expressa em

Unidades mg^{-1} proteína, que é o mesmo que $\text{nmol NADPH mg}^{-1}$ proteína por 2 minutos. A quantidade de proteínas foi determinada para cada extrato pelo método Bradford (1976). O número 2 no denominador é devido a estequiometria da reação, já que para cada NADPH que reage, dois TNB serão gerados (figura 7).

$$U = \frac{1.10^9 \cdot V_C \cdot Abs}{2V_E \cdot [prot] \cdot \epsilon \cdot b} \quad [17]$$

na qual: V_C – Volume final na cubeta de análise (L)
 Abs – Absorbância após 2 minutos de reação (u. a.)
 V_E – Volume de extrato adicionado (μL)
 $[prot]$ – concentração de proteínas no extrato ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)
 ϵ - coeficiente de absorvidade molar ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
 b – caminho ótico (cm)

Para verificar se o NADPH reagia com a GSSG somente na presença do extrato obtido a partir das pontas das raízes, a absorbância a 412 nm foi monitorada em função do tempo na ausência do extrato. Observou-se um aumento da absorbância, indicando que estava ocorrendo reação entre GSH e DTNB, como pode ser observado na figura 8. Essa GSH não poderia ser devido à reação entre NADPH e GSSG, já que não era observada degradação de NADPH a partir da diminuição da absorbância a 340 nm. Assim, poderia ser contaminação do reagente GSSG com GSH ou hidrólise da GSSG, já que esta estava sendo preparada em água destilada deionizada. A solução de GSSG foi então preparada em solução tampão de fosfato pH 7,5 e novos testes foram feitos. Observou-se que não mais ocorria a reação na ausência de extrato proteico, indicando que a reação observada anteriormente era devido à hidrólise da glutathiona oxidada (figura 8).

As análises feitas anteriormente com o método de observação da degradação de NADPH a 340 nm pode ter fornecido resultados com grande variação devido à hidrólise de GSSG. Apesar da solução ser preparada no dia, as

análises eram realizadas no decorrer de todo o dia em ordem aleatória. Com o passar do tempo, a concentração de GSSG utilizada nas análises ia diminuindo, o que influenciava a velocidade de reação e, conseqüentemente, a determinação da atividade enzimática.

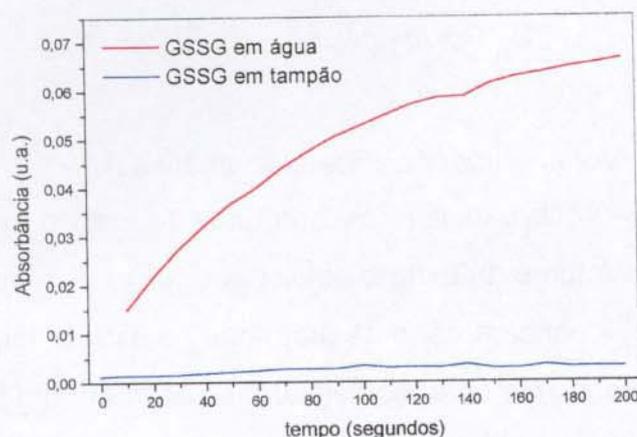


Figura 8: Gráfico de Absorbância (u.a.) a 412 nm em função do tempo (s) na ausência de extrato de proteínas. a) curva em vermelho foi obtida utilizando-se solução de GSSG em água destilada deionizada, indicando a presença de glutathiona reduzida (GSH) proveniente da hidrólise de GSSG; b) curva em azul foi obtida utilizando-se solução de GSSG preparada em tampão de fosfato 50 mM pH 7,5.

3.11 – Determinação de possíveis reações não enzimáticas nos extratos

Após germinação em condições assépticas, plantas do Cat100-6 e S1587-17 foram tratadas por 48 horas em soluções nutrientes contendo 0 e 36 μM de Al^{3+} . As pontas das raízes foram então lavadas, cortadas em (5 – 6) mm e maceradas em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 7,5, seguido de centrifugação a 10000 g por 8 minutos. O sobrenadante foi então autoclavado por 20 minutos e as enzimas Peroxidase, Superóxido Dismutase e Glutathiona Redutase foram determinadas conforme itens 3.8, 3.7 e 3.10, respectivamente.

3.12 – Determinação de peroxidação de lipídeos

3.12.1 – Ácido tiobarbitúrico

A determinação de peroxidação de lipídeos nas pontas das raízes de plantas tratadas por 48 horas em solução nutriente contendo 0 (controle) e 36 μM de Al^{3+} foi feita por três métodos diferentes. O primeiro deles foi através da reação de produtos da peroxidação de lipídeos, principalmente o malonaldeído (MDA), com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Baccouch *et al*, 1998). A reação entre MDA e TBA forma um produto de cor vermelha, com alto coeficiente de absorvidade molar ($153.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que absorve na faixa de 520 a 540, com máximo em 532 nm, o qual é formado por uma adição nucleofílica catalisada por ácido.

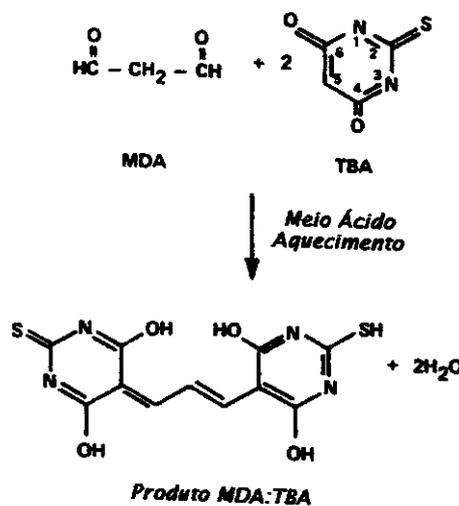


Figura 9: Esquema de formação do produto de reação entre MDA e TBA. O produto é formado por um mecanismo de adição nucleofílica, no qual o carbono 5 do TBA promove um ataque ao carbono 1 do MDA, seguido de uma desidratação e um novo ataque por outra molécula de TBA (Janero, 1990).

Após tratamento, as pontas das raízes das duas linhagens de milho foram cortadas em (5 – 6) mm, secas com papel de filtro e pesadas. As raízes foram então trituradas com nitrogênio líquido em tubos de centrifuga de 1,5 mL (tipo "ependorf") contendo 20% (m/v) de ácido tricloroacético e 0,5% (m/v) de ácido

tiobarbitúrico. A mistura foi então aquecida por 30 minutos a 90 °C e rapidamente resfriada em um banho de gelo. Após centrifugação a 10000 g por 8 minutos, a absorbância a 532 nm do sobrenadante foi determinada utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico e capacidade de 500 µL. O mesmo procedimento foi feito com a solução reagente sem amostra, o que serviu de branco para zerar o espectrofotômetro HP 8452A Diode Array. A concentração de MDA nas amostras foi calculada utilizando-se a Lei de Beer e a peroxidação de lipídeos foi calculada pela equação 18 e expressa em nmol de MDA por g de raiz fresca.

$$\text{peroxidação} = \frac{Abs_{532} \cdot V_{ext} \cdot 10^6}{\epsilon b m} \quad [18]$$

na qual: Abs_{532} – Absorbância a 532 nm (u.a.)
 V_{ext} – volume de extração (mL)
 ϵ - coeficiente de absorvidade molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
 b – caminho ótico (cm)
 m – massa de raiz fresca (g)

Para verificar se ocorreria a formação do produto desejado nas condições do método, soluções com diferentes concentrações de MDA foram preparadas a partir da hidrólise em pH 2,0 de tetraetoxipropano (TEP). A presença de MDA nestas soluções iniciais foi determinada pela absorbância a 244 nm. A reação de MDA com TBA foi promovida pela adição de 100 µL de solução amostra à solução reagente. Após 10 minutos, espectros de absorbância na faixa de 420 a 500 nm foram adquiridos para cada amostra. Na figura 10 observa-se que a reação entre MDA e TBA ocorre nestas condições, formando um produto que absorve em 532 nm.

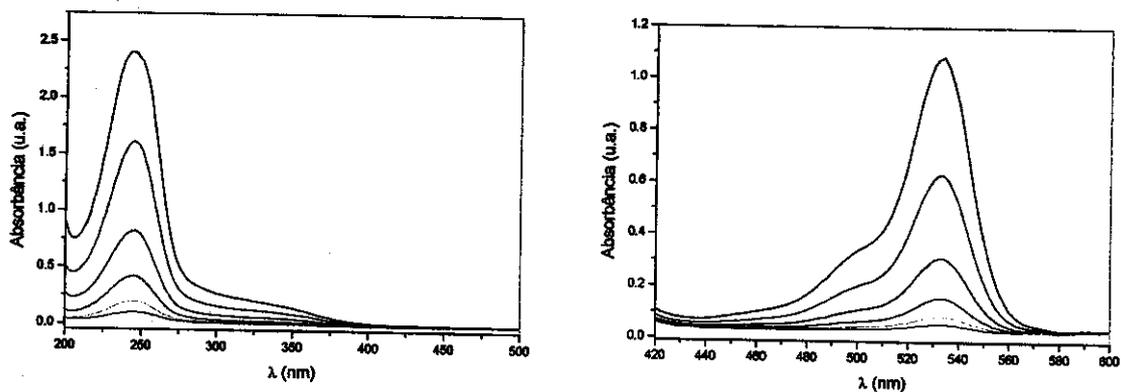


Figura 10: gráficos de absorvância (u.a.) em função do comprimento de onda (nm) para: a) soluções de diferentes concentrações de MDA preparadas a partir da hidrólise de TEP e b) produto da reação das soluções contendo MDA (gráfico a) com TBA em meio ácido por 10 minutos.

3.12.2 – Alaranjado de xilenol

A oxidação de lipídeos (LH) pode gerar a formação de hidroperóxidos (LOOH), conforme esquema apresentado na figura 11. A quantificação de LOOH nas pontas de raízes de milho tratados e não tratados com 36 μM de Al³⁺ foi feita segundo método proposto por Hermes-Lima *et al* (1995). O método está baseado na oxidação de Fe²⁺ pelos LOOH em pH ácido na presença do complexo colorido Fe³⁺ – alaranjado de xilenol.

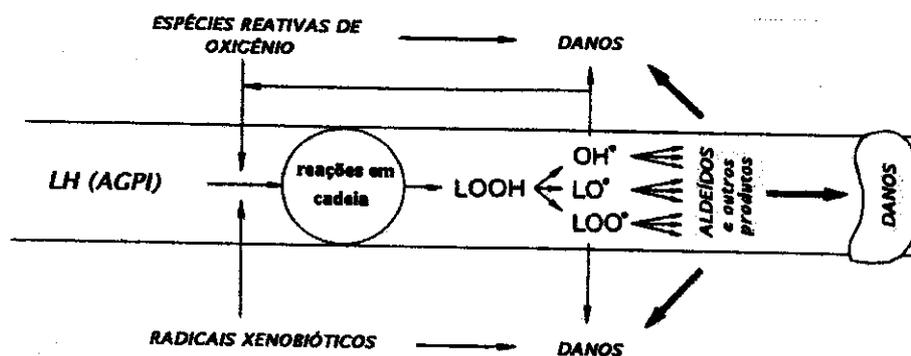


Figura 11: esquema de possíveis rotas de degradação celular induzida por espécies reativas de oxigênio. Os radicais livres iniciam o processo de peroxidação após atacar os ácidos graxos polinsaturados (AGPI), o que promove uma reação cíclica, na qual mais radicais são formados e mais AGPI são degradados a uma série de produtos. Muitos

desses produtos, como os aldeídos, são muito reativos dentro e fora da membrana (Esterbauer *et al*, 1991).

Após tratamento, as pontas das raízes foram cortadas em (5 – 6) mm, levemente secas em papel de filtro, pesadas e maceradas em metanol a 0 °C, com um volume tal que a proporção de 1:5 (massa de raiz em miligramas/ volume de metanol em μL) fosse mantida em todas as amostras. A mistura foi centrifugada a 10000 g por 10 minutos e 100 μL de sobrenadante foram adicionados à solução reagente. Esta era composta por: 250 μL de $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de FeSO_4 , 100 μL de $0,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, 100 μL de $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de alaranjado de xilenol. Após 12 horas de reação, a absorbância a 580 nm foi medida. Água oxigenada foi adicionada (5 nmol) e após 1 hora de reação, nova medida de absorbância foi realizada. O grau de peroxidação foi determinado em duplicata segundo equação 19 e expresso em nmol g^{-1} de raiz fresca. O fator 6 de multiplicação provém da extração 1:5 ($\text{mg}/\mu\text{L}$) com metanol e o fator 1000 transforma miligramas em gramas.

$$\text{peroxidação} = \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{H_2O_2} - Abs_{amostra}} \cdot \frac{n_{H_2O_2}}{V_{amostra}} \cdot 6.1000 \quad [19]$$

na qual: $Abs_{amostra}$ – absorbância após 12 horas de reação (u.a.)
 $Abs_{H_2O_2}$ – absorbância após adição de 5 nmol de H_2O_2 (u.a.)
 $n_{H_2O_2}$ – número de mols de H_2O_2 adicionado (mol)
 $V_{amostra}$ – volume de extrato adicionado (μL)

A reação com água oxigenada foi testada em um extrato protéico e a formação do complexo colorido que absorve em 580 nm pode ser visualizada no gráfico da figura 12.

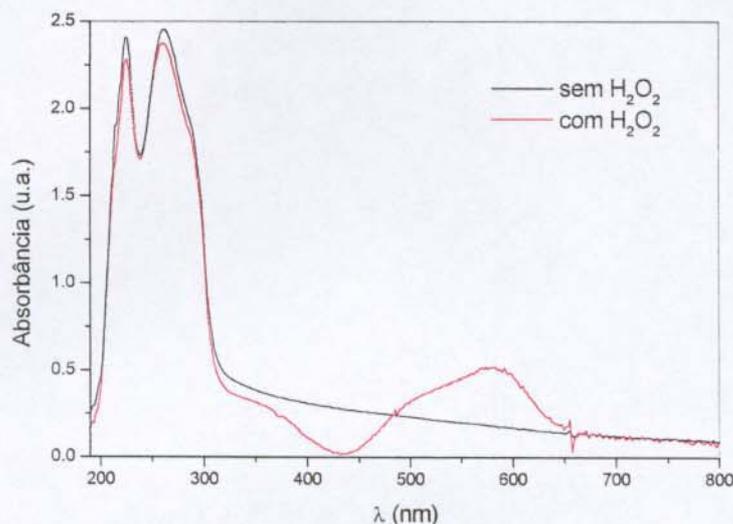


Figura 12: espectro de absorvância em função do comprimento de onda (nm) para um extrato protéico, com e sem água oxigenada, submetido à determinação de peróxidos pelo método do alaranjado de xilenol.

3.12.3 – Cromatografia líquida de alta eficiência

Após tratamento, as raízes dos dois genótipos, tratadas em solução nutriente contendo 0 e 36 μM de Al^{3+} por 48 horas, foram cortadas a 5 mm a partir do ápice e maceradas com 1 mL de tampão fosfato 1 mM pH 6,8. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,45 μm . Aliquotas de 10 μL foram injetadas em um cromatógrafo Waters 600E, acoplado a um detetor Waters 484 e um registrador Waters 746, utilizando-se uma coluna HP ODS Hypersil 5 μm (4,6 x 100 mm). A fase móvel utilizada constituiu-se de 14% (v/v) de acetonitrila, contendo 50 mM de brometo de tetrabutilamônio em tampão fosfato 50 mM pH 6,8 (Bull e Marnett, 1985) a 1,0 mL/min. O tempo de retenção para o malonaldeído nestas condições foi de 2,36 minutos, conforme mostra o cromatograma da figura 13. Os sinais observados em torno de 5 minutos podem ser de produtos decorrentes de polimerização do malonaldeído (Bull e Marnett, 1985).

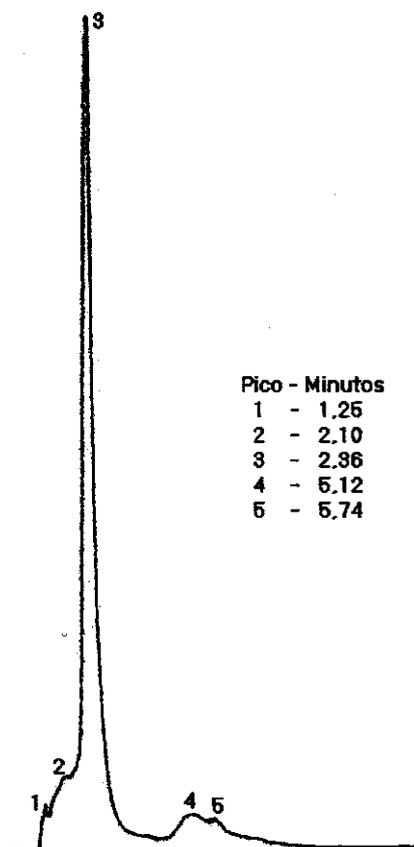


Figura 13: cromatograma de uma alíquota de 10 μL de solução padrão obtida a partir da hidrólise de tetraetoxipropano em meio ácido. A fase móvel utilizada foi 14% (v/v) de acetonitrila em tampão fosfato 1 mM pH 6,8, contendo 50 mM de brometo de tetrametilamônio a 1,0 mL min^{-1} .

Para verificar interferências nos sinais, a solução de HCl, utilizada na obtenção das soluções padrão de MDA, e a solução tampão utilizada na extração do MDA das pontas das raízes foram injetadas no cromatógrafo. Os sinais encontrados foram muitos pequenos e em tempos de retenção distintos do MDA.

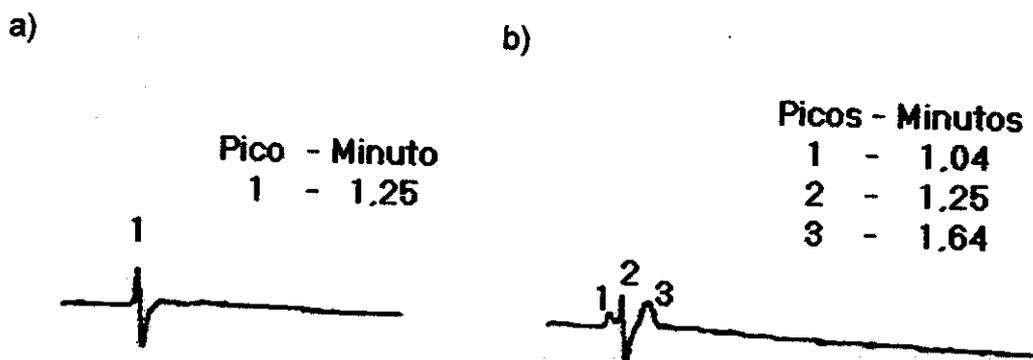


Figura 14: cromatograma de a) 10 μL de solução de ácido clorídrico (HCl) pH 2 utilizada na hidrólise de TEP e b) solução tampão de extração. As condições de eluição foram exatamente as mesmas utilizadas para a obtenção dos cromatogramas das soluções padrão.

Uma curva de calibração foi construída utilizando-se como padrão o malonaldeído gerado a partir da hidrólise ácida do tetraetoxipropano (TEP). O comprimento de onda de máxima absorção de 267 nm e a concentração de MDA presente nas soluções padrão ($\epsilon - 34.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foram determinados através de um espectrofotômetro HP8452A Diode Array. A partir dos valores de área e de concentração encontrados, o gráfico da figura 15 foi construído e a equação 20 obtida com coeficiente de correlação de 0,9993.

$$[MDA] = -1,644 \cdot 10^{-4} + 3,988 \cdot 10^{-11} \{ \text{área} \} \quad 20$$

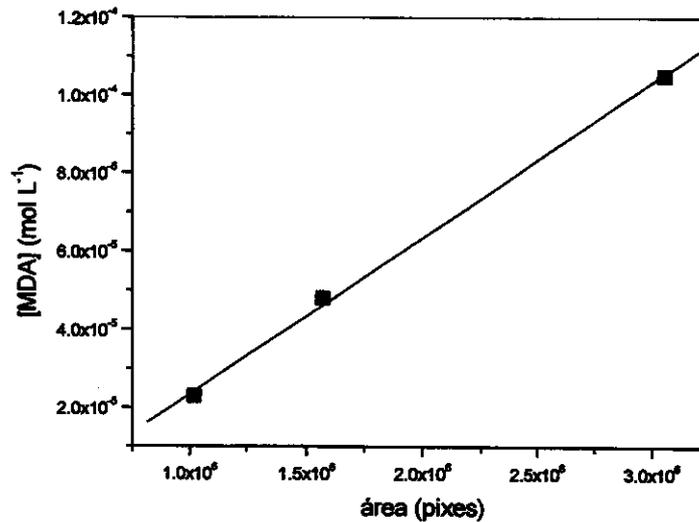


Figura 15: gráfico da concentração de malonaldeído (MDA) em função da área do pico observado a 2,36 minutos. A concentração foi determinada pela absorvância da solução a 267 nm e o coeficiente de absorvidade molar do MDA ($34.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), aplicando-se a Lei de Beer.

3.13 – Determinação de oxidação de proteínas

A determinação do grau de oxidação das proteínas foi feita conforme método descrito abaixo, modificado de Levine *et al* (1990) e Reznick e Packer (1994). Após tratamentos, as pontas das raízes foram cortadas em (5 – 6) mm, secas com papel de filtro, pesadas e maceradas em almofariz com 1 mL de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 25 mM pH 7,0. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 10000 g para retirada da fração sólida.

Uma alíquota de 250 μL de uma solução 8 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em 2 M de ácido clorídrico (HCl) foi adicionada a 750 μL da solução de proteínas obtida. A mistura foi mantida no escuro e agitadas a cada 10 minutos. Após 1 hora de reação, 500 μL de ácido tricloacético (TCA) a 30% em volume foram adicionados para precipitação das proteínas. Após agitação, a mistura foi centrifugada a 10000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado três vezes com uma solução 1:1 de etanol e acetato de etila, tomando-se o cuidado para que a amostra ficasse em repouso 10 minutos após

adição da mistura. Após lavagem, 500 μ L de guanidina 6 M em 20 mM de KH_2PO_4 pH 2,3 foram adicionados e as proteínas ressuspensas por agitação em vortex a 37 $^\circ\text{C}$. Nova centrifugação foi feita para retirada de qualquer material em suspensão e a absorbância das amostras na faixa entre 360 e 390 nm foi determinada.

Este método de análise foi utilizado para estudar se radicais livres poderiam ser uma das causas de pancreatite aguda, gerando danos oxidativos em proteínas (Reinheckel *et al*, 1998). Ele está baseado na reação entre a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) e as carbonilas presentes nas proteínas, formando grupos funcionais denominados de iminas, também conhecidos como Bases de Schiff. A reação entre as carbonilas presentes nas proteínas e a 2,4-DNPH pode ser representada genericamente pela equação química da figura 16.

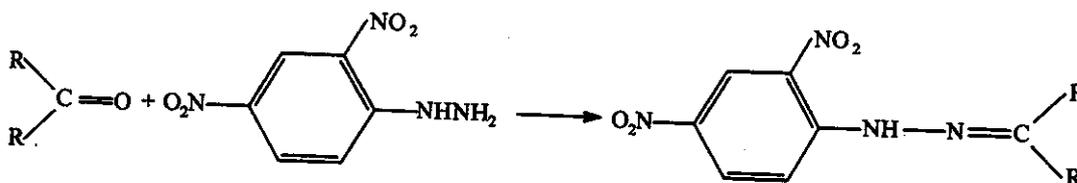


Figura 16: Equação geral representando a reação entre carbonilas e a 2,4-dinitrofenilhidrazina, formando uma imina. A 2,4-DNPH é bastante utilizada para determinação de carbonilas pois seu grupo fenil torna a imina formada bastante estável (Streitwieser *et al*, 1992).

A equação utilizada para a determinação do aumento na oxidação de proteínas e a propagação de erros na determinação do Δ foram feitas conforme equação 21 e 22, respectivamente (Squires, 1968).

$$\Delta\text{Carbonilas} = \text{Carb}_{\text{tratada}} - \text{Carb}_{\text{controle}} \quad [21]$$

na qual: $\text{Carb}_{\text{tratadas}}$ – quantidade de carbonilas encontrada nas plantas expostas a uma certa concentração de Al^{3+} ;

Carb_{controle} - quantidade de carbonilas encontrada nas plantas controle.

$$\Delta R = \sqrt{\Delta A^2 + \Delta B^2} \quad [22]$$

As carbonilas que reagem nesse tipo de reação são as carbonilas pertencentes às funções orgânicas aldeído e cetona. Essas carbonilas são provenientes da reação entre espécies reativas de oxigênio e amino ácidos, como histidina e triptofano (Halliwell e Gutteridge, 1999).

3.14 – Detecção de apoptose

Para detecção de fragmentação cromatínica em células radiculares, as pontas das raízes das duas linhagens expostas a 36 μM de Al^{3+} foram seccionadas em (5 – 6) mm e fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} pH 7,2 por 48 horas. Após desidratação com soluções etanólicas, as raízes foram diafanizadas em xilol e incluídas em Paraplast Plus (Oxford). Os cortes histológicos com 7 μm de espessura foram obtidos em um micrótomo Micron. O material foi submetido à detecção de fragmentação cromatínica através do kit *In Situ Cell Death Detection* (Boehringer Mannheim, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. As peroxidases presentes nos cortes foram inativadas com uma solução de água oxigenada 3% (v/v) em metanol e estes passaram por um processo de permeabilização com Triton 0,1% (v/v) em tampão fosfato pH 7,2. Através da reação enzimática com Terminal Deoxinucleotidil Transferase (TdT) por 1 hora a 37°C, nucleotídeos marcados com fluoresceína foram adicionados aos sítios de fragmentação cromatínica. Anticorpos antifluoresceína, contendo peroxidase, foram adicionados e os cortes foram imersos por 15 minutos em uma solução de diaminobenzidina 0,01% (m/v) em água oxigenada 0,1% (v/v). Após lavagem com água destilada, os cortes foram contracolorados com o corante verde de metila e observados ao microscópio Zeiss. Esses experimentos foram realizados no Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp, sob orientação do doutorando Pedro Henrique Schildknecht.

O método TUNEL está baseado na detecção de alta fragmentação cromatínica nos núcleos, através da incorporação de fluoresceína nas pontas 3' das cadeias de DNA fragmentado e posterior detecção por adição de um anticorpo antifluoresceína, os quais possuem uma Peroxidase conjugada. Fornecendo água oxigenada e diaminobenzidina como substratos, as Peroxidases promoverão a degradação da H_2O_2 , gerando a cor marrom nos núcleos com altos índices de fragmentação de DNA. Os núcleos não apoptóticos adquirem a cor esverdeada durante o processo.

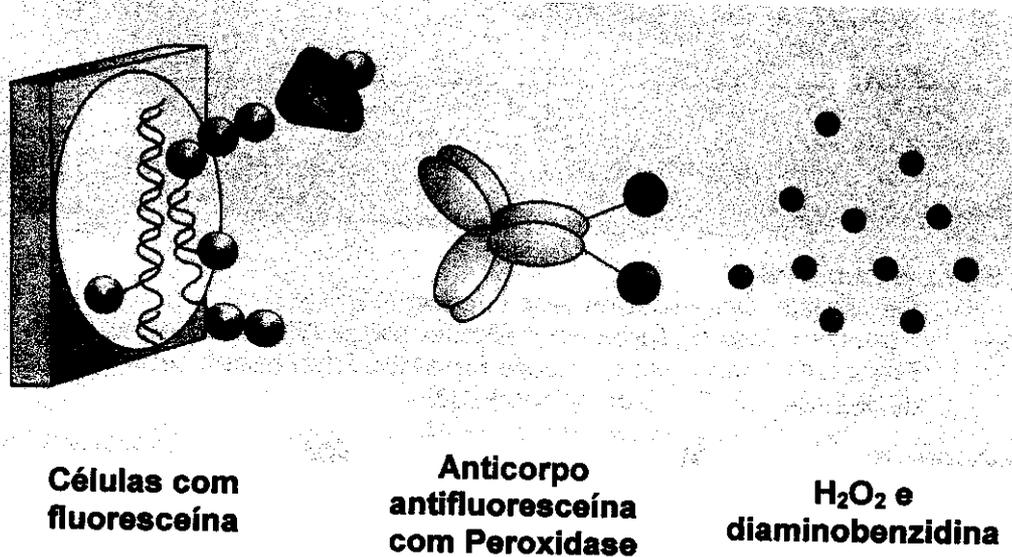


Figura 17: esquema do princípio de ação do método TUNEL de detecção de índices de fragmentação cromatínica.

4. Resultados

4.1 – Crescimento relativo da raiz

A determinação do Crescimento Relativo da Raiz (CRR) em função da concentração de alumínio (Al^{3+}) e do tempo de tratamento foi feito conforme procedimento descrito no item 3.3. Os gráficos a e b da figura 18 a seguir mostram o CRR da linhagem Cat 100-6 e da S1587-17, respectivamente, tratadas em soluções nutrientes contendo 6, 36 e 60 μM de Al^{3+} em função do tempo. O CRR foi calculado aplicando-se a equação 1.

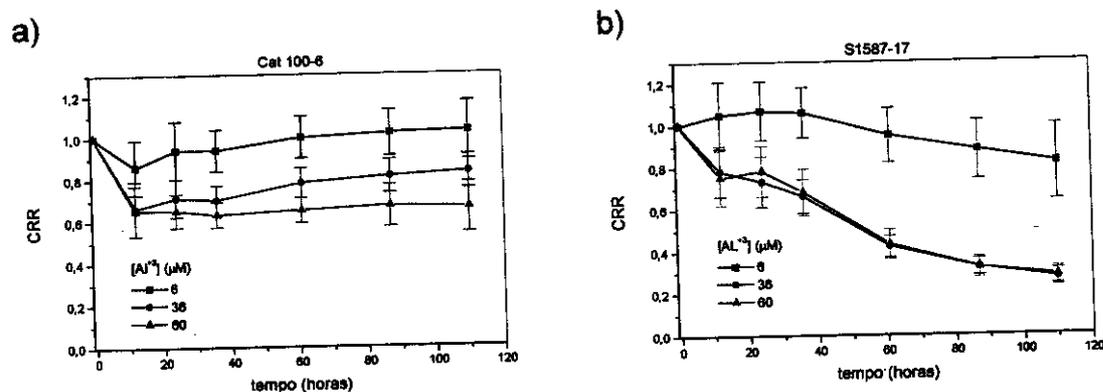


Figura 18: CRR das linhagens a) Cat 100-6 e b) S1587-17 em função do tempo. As plantas foram tratadas com solução nutriente contendo 6, 36 e 60 μM de alumínio, pH 4,1. Os pontos representam a média \pm SD (n = 8 a 10).

A partir da figura 18 observa-se que o CRR das duas linhagens depende da concentração de alumínio na solução e do tempo de tratamento. Em 12 horas, a linhagem tolerante apresenta uma pequena queda no seu crescimento na concentração de 6 μM de Al^{3+} e uma queda maior nos tratamentos com 36 e 60 μM . Entretanto, após 24 horas, as plantas em 6 e 36 μM retomam seu crescimento, atingindo em 60 horas o CRR de 1 e 0,78, respectivamente, o que significa que as plantas estão crescendo 100 e 78 % em relação ao controle. As plantas submetidas a 36 μM aumentam sua taxa de crescimento, atingindo 0,83 após 110 horas. Já as plantas tratadas com 60 μM de Al^{3+} , apesar de não

apresentarem danificações visuais das raízes, não retomam o crescimento, porém conseguem mantê-lo por volta de 0,65, isto é, em torno de 65% do crescimento das plantas tratadas somente com solução nutriente.

A linhagem S1587-17 apresenta comportamentos distintos entre os tratamentos de 6 μM e os de 36 e 60 μM de Al^{3+} . Na menor concentração, nas primeiras 60 horas, o CRR é mantido por volta de 1,0, passando a diminuir e chegando a ter o mesmo CRR que o Cat 100-6 tratado com 36 μM após 110 de tratamento, em torno de 0,82. As plantas submetidas a 36 e 60 μM apresentam entre si o mesmo perfil de crescimento. Nas primeiras 12 horas de tratamento observa-se uma queda brusca no crescimento e após esse tempo, diferentemente do Cat 100-6, não recuperam seu crescimento, chegando a ter um mesmo CRR de 0,28 após 110 horas de tratamento. Durante as medidas foi possível observar que as plantas tratadas com 36 e 60 μM de alumínio pararam de crescer após 60 horas de tratamento.

A figura 19 compara o comportamento das duas linhagens nas diferentes concentrações de alumínio. Através da figura 19.a observa-se que o CRR do Cat 100-6 e do S1587-17 estão bastante próximos. Entretanto, após 50 horas o Cat 100-6 mostra uma tendência a estabilizar seu CRR em torno de 1,0, enquanto que a curva do S1587-17 mostra uma tendência de queda, estando com um CRR no valor de 0,82 em 110 horas de tratamento.

O gráfico da figura 19.b mostra uma grande diferenciação no crescimento das duas linhagens após 40 horas de tratamento. O Cat 100-6 aumentou seu CRR de 0,70 para 0,83 no intervalo de 36 a 110 horas de tratamento, enquanto o CRR do S1587-17 diminuiu de 0,66 para 0,28. As plantas tratadas com 60 μM de Al^{3+} (figura 19.c) apresentam o mesmo perfil de crescimento das plantas tratadas com 36 μM . O Cat 100-6 mantém seu crescimento em 0,65 enquanto uma intensa diminuição no CRR do S1587-17 é observada.

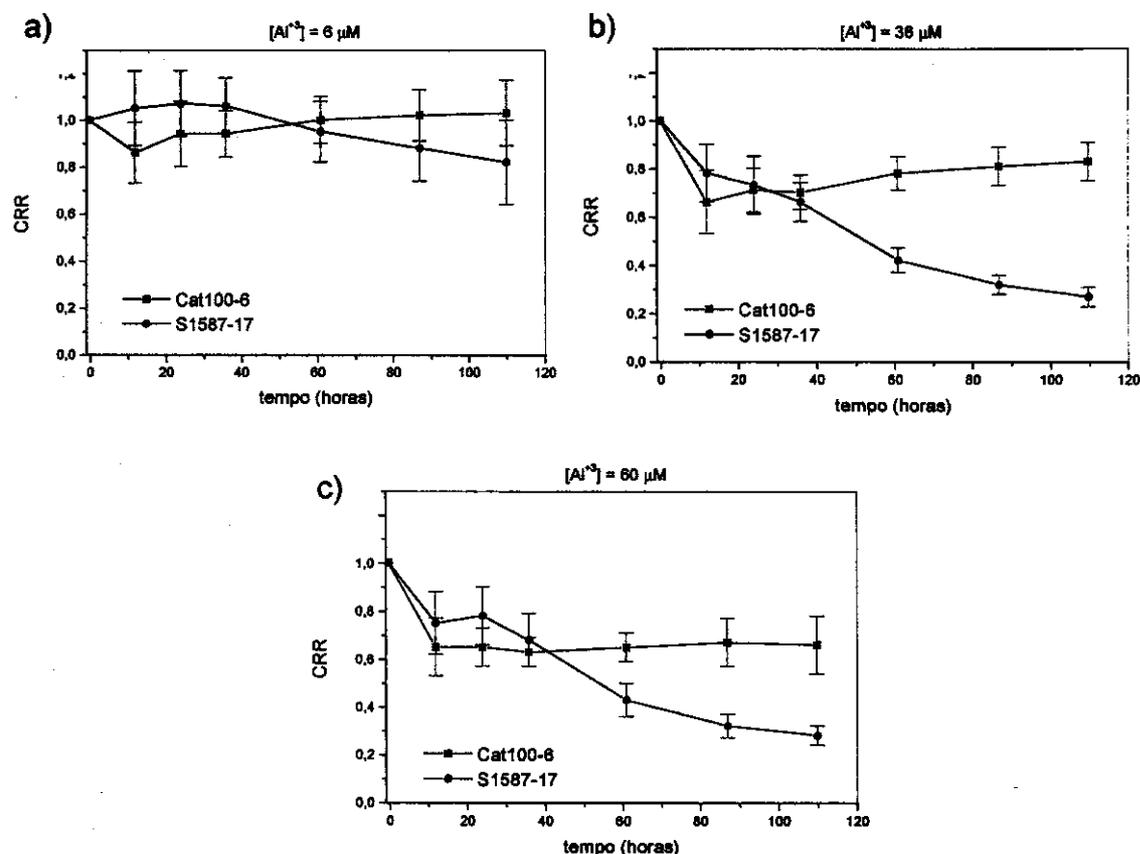


Figura 19: Gráficos do CRR das linhagens Cat 100-6 e S1587-17 em função do tempo. Plantas das duas linhagens foram tratadas em soluções nutritivas contendo a) 6, b) 36 e c) 60 μM de alumínio. Os pontos representam a média \pm SD ($n = 8$ a 10).

4.2 – Atividade de alumínio nas soluções nutritivas

Utilizando-se o programa Geochem-PC (Parker *et al*, 1995), determinou-se a porcentagem do alumínio adicionado que estava na solução como alumínio livre Al^{3+} , além das porcentagens complexadas com as diferentes espécies presentes e a atividade de alumínio na solução.

Pela tabela 2 observa-se que a quantidade de alumínio na forma de íon livre, isto é, Al^{3+} , permanece praticamente constante, em porcentagem, para cada concentração utilizada, entre 76 e 78%. Já a atividade de alumínio encontrada é um pouco menos da metade da adicionada à solução, conforme pode ser visto na tabela 3.

Tabela 2: Concentração total em μM e porcentagem de alumínio livre (Al^{3+}), espécie tóxica às plantas, e porcentagem dos complexos presentes nas soluções nutrientes utilizadas em cada tratamento.

[Al^{3+}] (μM) adicionado	% Al^{3+} livre	% Al^{3+} complexado				
		Fosfato (PO_4^{-3})	Sulfato (SO_4^{-2})	Borato (BO_3^-)	EDTA	Hidroxila (OH^-)
6	76.11	1.96	13.92	0.20	0.03	7.79
12	76.27	1.85	13.85	0.20	0.02	7.8
36	77.06	1.53	13.35	0.19	0.02	7.86
60	77.87	1.30	12.86	0.20	0.01	7.76

Tabela 3: Concentração de alumínio (em colchetes) adicionada às soluções nutrientes de tratamento, pH 4,1, e a atividade (em chaves) de alumínio nessas soluções. Para a determinação da atividade química do Al^{3+} (valor adimensional) foi utilizado o programa Geochem 2.0 (Parker *et al*, 1995).

[Al^{3+}] (μM) adicionada	{ Al^{3+} } ($\times 10^6$)
6	2,7
12	5,4
36	16,2
60	27,0

4.3 – Visualização de alumínio na rizosfera com hematoxilina

As fotos obtidas para as duas linhagens de milho coradas com hematoxilina indicam que o alumínio presente na rizosfera de raízes de ambas as linhagens após 6 horas de tratamento é dependente da quantidade de alumínio na solução nutriente. O milho tolerante começa um processo de exclusão dos íons alumínio e após 24 horas, as raízes tratadas com até $36 \mu\text{M}$ estão praticamente isentas de Al^{3+} devido ao descoloramento das raízes. Já no milho sensível, as raízes tratadas com 36 e $60 \mu\text{M}$ começam a apresentar danificações, que caracterizam a perda de

massa, após 12 horas de tratamento. Além disso, a exposição ao alumínio provoca um intumescimento (com um conseqüente aumento do diâmetro das raízes) do milho sensível em comparação com as raízes do milho tolerante. As fotos obtidas podem ser visualizadas nas figuras 20 a 24 a seguir.

Cat100-6

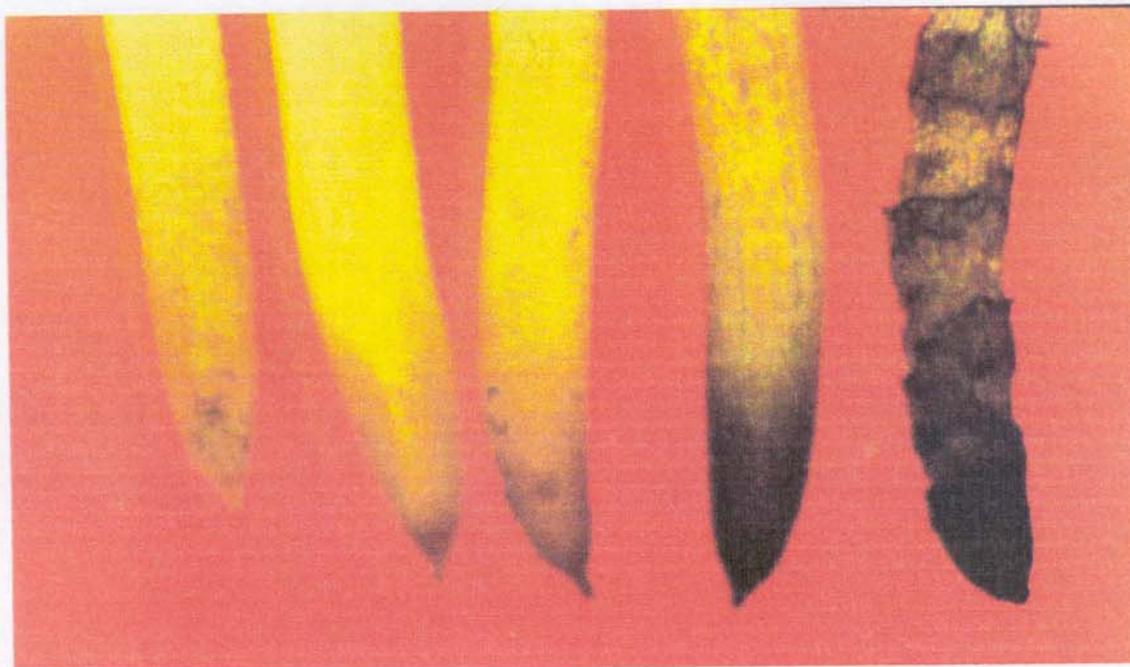


S1587-17



Figura 20: a) Cat 100-6 e b) S1587-17 após 6 horas de tratamento expostos, da esquerda para a direita, a 0, 6, 12, 36 e 60 μM de alumínio na solução nutriente.

Cat100-6



S1587-17



Figura 21: a) Cat 100-6 e b) S1587-17 após 12 horas de tratamento expostos, da esquerda para a direita, a 0, 6, 12, 36 e 60 μ M de alumínio na solução nutriente.

Cat100-6



S1587-17

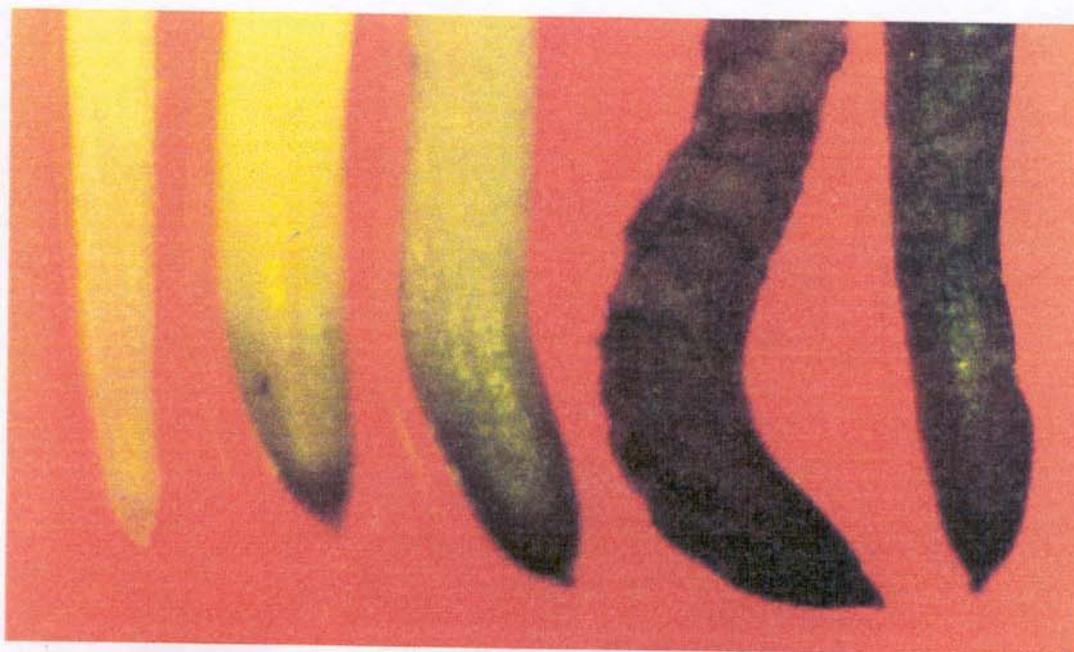
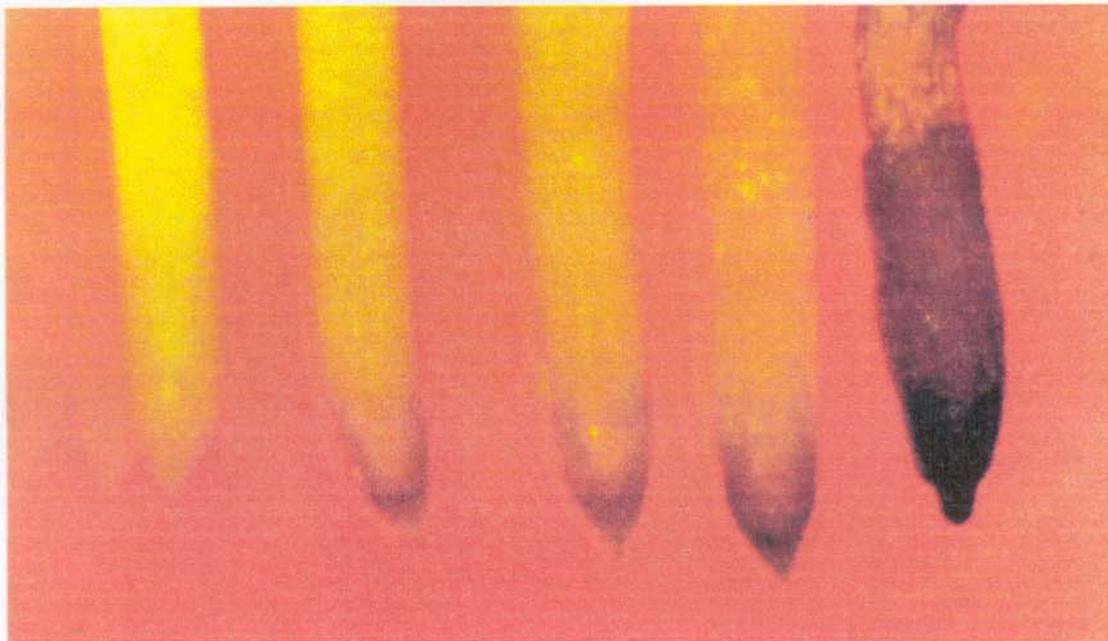


Figura 22: a) Cat 100-6 e b) S1587-17 após 24 horas de tratamento expostos, da esquerda para a direita, a 0, 6, 12, 36 e 60 μM de alumínio na solução nutriente.

Cat100-6

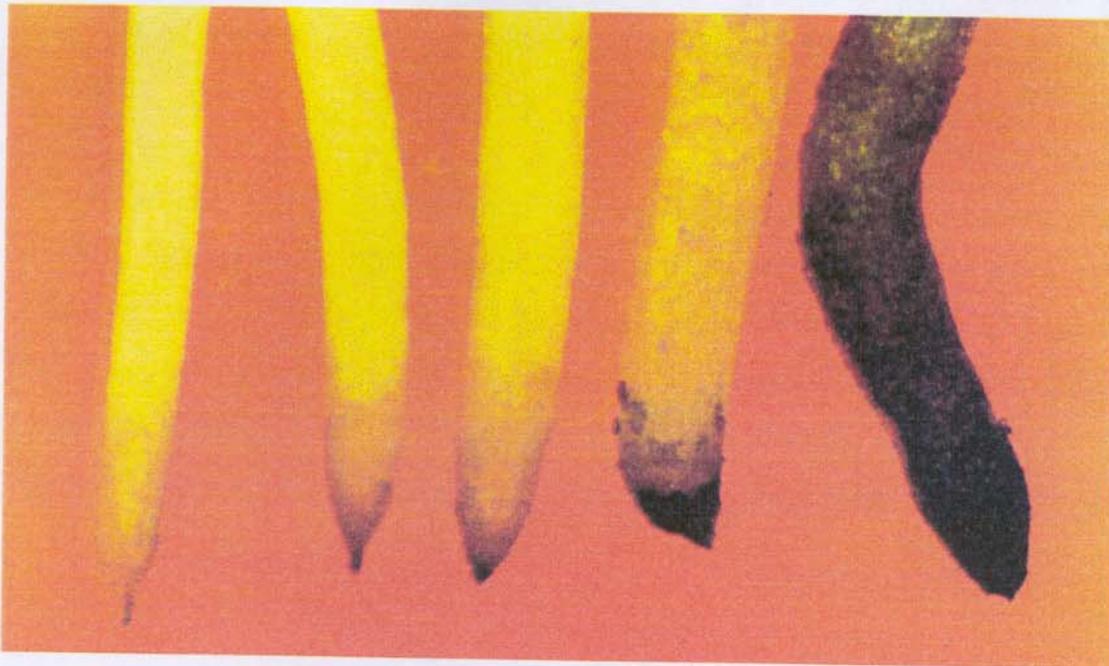


S1587-17



Figura 23: a) Cat 100-6 e b) S1587-17 após 48 horas de tratamento expostos, da esquerda para a direita, a 0, 6, 12, 36 e 60 μM de alumínio na solução nutriente.

Cat100-6



S1587-17

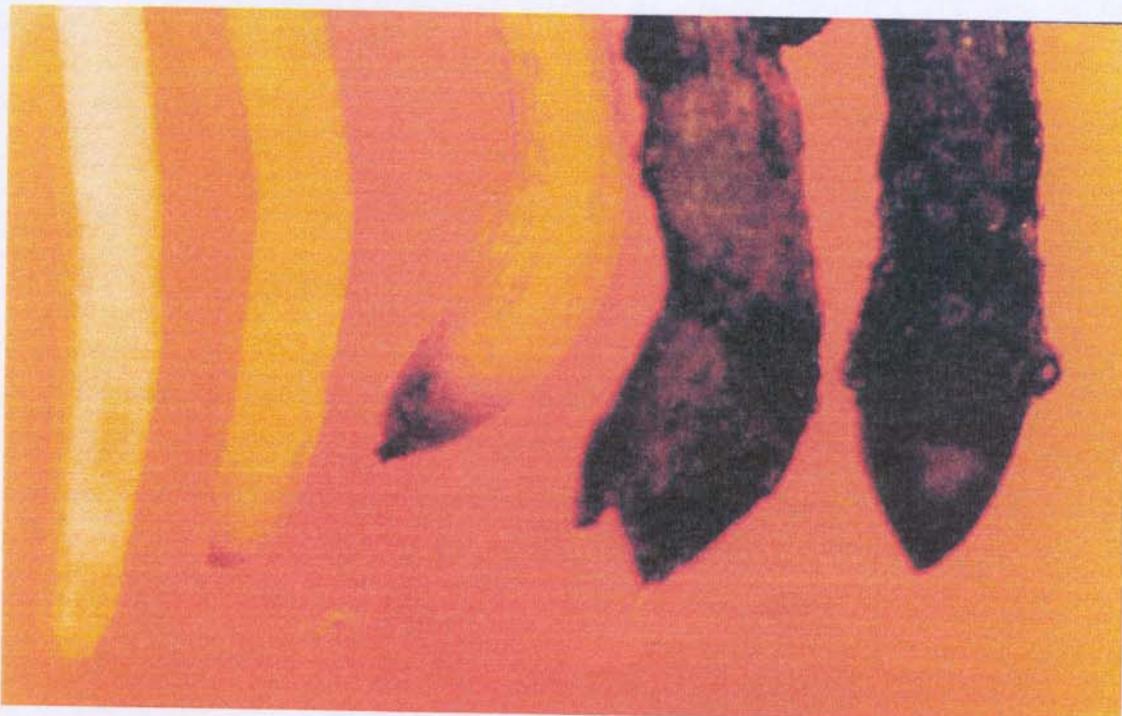


Figura 24: a) Cat 100-6 e b) S1587-17 após 72 horas de tratamento expostos, da esquerda para a direita, a 0, 6, 12, 36 e 60 μM de alumínio na solução nutriente.

4.4 – Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima Superóxido Dismutase foi quantificada em função da concentração e do tempo de exposição ao íon alumínio. Os valores apresentados a seguir são a média de quadruplicatas de um experimento e a atividade enzimática foi determinada conforme item 3.7.

Observando-se as curvas da figura 25, correspondente aos dados obtidos nos tratamentos dose dependentes, percebe-se um grande aumento da atividade da Superóxido Dismutase quando as plantas do S1587-17 são tratadas com 36 e 60 μM , enquanto que a atividade dessa enzima vai sofrer um leve aumento no Cat 100-6 somente quando este é tratado com 60 μM de Al^{3+} . Além disso, a atividade não é significativamente diferente do controle nos tratamentos com 6 e 12 μM de alumínio.

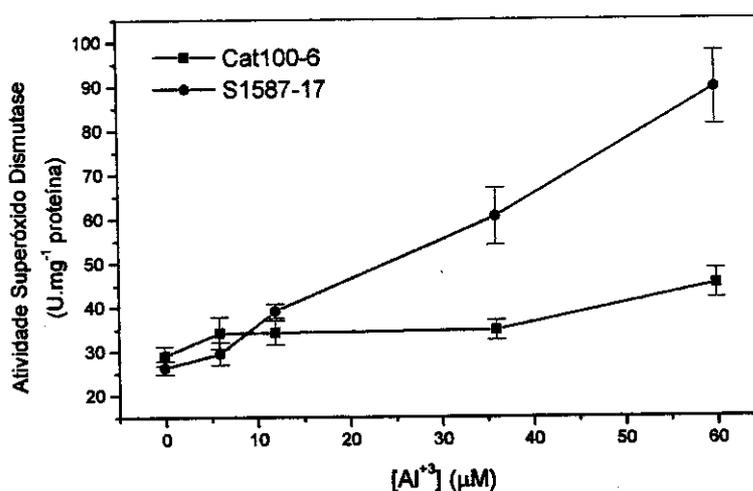


Figura 25: Atividade da enzima Superóxido Dismutase em função da concentração de alumínio a que as plantas do milho Cat 100-6 e S1587-17 foram submetidas. As plantas foram tratadas em soluções nutrientes por 48 horas na ausência (controle) e na presença de 6, 12, 36 e 60 μM de Al^{3+} . Os pontos representam a média \pm SD ($n = 4$).

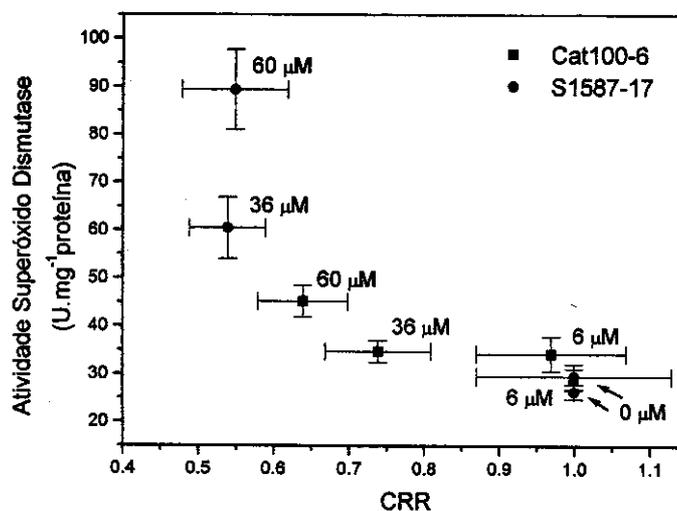


Figura 26: Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em função do Crescimento Relativo da Raiz (CRR) dos milhos Cat 100-6 e S1587-17 após tratamento com solução nutriente na ausência e na presença de várias concentrações de alumínio. Os pontos representam a média \pm SD ($n = 8$ a 10 para CRR e $n = 4$ para SOD).

A atividade da enzima SOD foi relacionada com o crescimento relativo da Raiz (CRR) em 48 horas de tratamento. A figura 26 mostra que o crescimento relativo da raiz possui a tendência de ser inversamente proporcional à atividade da enzima Superóxido Dismutase.

Os resultados obtidos para os tratamentos tempo dependentes, apresentados no gráfico da figura 27, mostram um grande aumento da atividade da enzima SOD no milho sensível em 48 h de exposição a $36 \mu\text{M}$ de Al^{3+} , seguido de uma pequena queda na atividade após 48 horas, o que pode ser devido à degradação da raiz do S1587-17. Além disso, observa-se que ocorre um aumento da atividade da SOD no Cat100-6 com o passar do tempo, mas esse aumento é significativamente menor do que o observado para o S1587-17, sensível ao Al^{3+} .

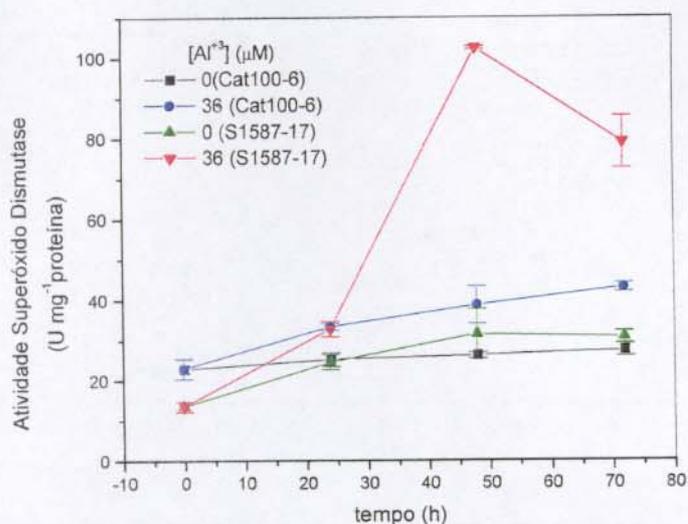


Figura 27: gráfico da atividade de SOD em função do tempo de tratamento com 0 e 36 μM de alumínio. As plantas foram tratadas por 0, 24, 48 e 72 horas. Os pontos representam a média \pm SD ($n = 4$).

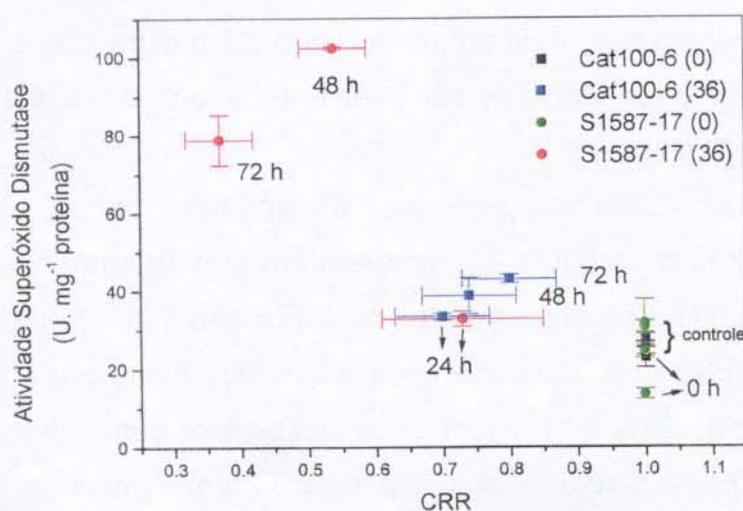


Figura 28: Atividade da enzima Superóxido Dismutase em função do Crescimento Relativo da Raiz (CRR) para o Cat 100-6 e S1587-17 em diferentes tempos de tratamento com 36 μM de Al^{3+} . Os pontos representam a média \pm SD ($n = 8$ a 10 para CRR e $n = 4$ para SOD). O CRR para tempo zero é igual a 1 por definição, assim não apresenta desvio padrão.

Construindo-se um gráfico da atividade da SOD, determinada para cada tempo de tratamento, em função do CRR (figura 28), observa-se que as linhagens apresentam um comportamento parecido após 24 horas de tratamento: o CRR diminui e a atividade da enzima aumenta um pouco. Após esse tempo, a atividade da SOD continua a aumentar conforme aumenta o tempo de exposição ao íon, sendo esse aumento mais significativo no milho sensível; entretanto, enquanto o Cat100-6 retoma seu crescimento, o milho S1587-17 pára de crescer, o que pode ser visualizado pelo aumento e diminuição do CRR, respectivamente. A pequena queda da atividade para o milho sensível em 72 horas de exposição a $36 \mu\text{M}$ de Al^{3+} pode ser devido à grande degradação da raiz, como dito anteriormente.

Além disso, as plantas controle apresentam sempre CRR igual a 1 e as atividades da SOD obtidas para essas plantas estão muito próximas.

4.5 – Atividade da Peroxidase (PX)

A atividade da Peroxidase foi determinada conforme item 3.8 de Materiais e Métodos. As determinações foram feitas emquadruplicata, isto é, cerca de 10 a 15 plantas foram tratadas em soluções nutrientes independentes com a mesma concentração de alumínio. Além disso, as determinações cinéticas foram feitas em duplicata.

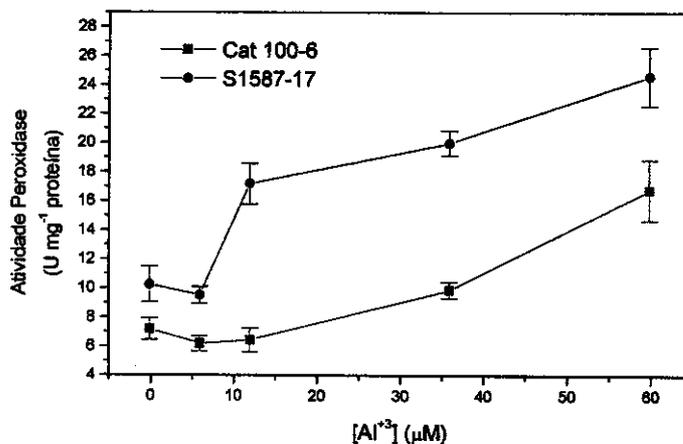


Figura 29: Atividade da Peroxidase (48 horas de tratamento) em função da concentração de alumínio para as linhagens Cat 100-6, tolerante ao Al^{3+} , e S 1587-17, sensível ao Al^{3+} . As plantas foram tratadas 48 horas em soluções nutrientes na ausência e presença de diferentes concentrações de alumínio e a atividade da PX foi determinada nas pontas das raízes. Os pontos representam a média \pm SD ($n = 4$).

Observando-se a figura 29, percebe-se que após 48 horas de tratamento em solução nutriente completa, na ausência de alumínio e com $6 \mu\text{M}$ de Al^{3+} , a linhagem sensível S1587-17 apresenta uma maior atividade da enzima Peroxidase do que o Cat 100-6. Essa diferença na atividade da enzima se torna significativamente maior quando as duas linhagens são tratadas a partir $12 \mu\text{M}$ de Al^{3+} . Nessa concentração observa-se que a atividade da PX para o Cat 100-6 permanece a mesma, enquanto que a atividade no S1587-17 tem um grande aumento. Para as concentrações seguintes, a atividade da enzima aumenta conforme aumenta a concentração de alumínio, entretanto, mesmo submetidas a $60 \mu\text{M}$ de Al^{3+} , o Cat 100-6 possui uma atividade da enzima próxima ao S1587-17 tratadas a $12 \mu\text{M}$.

Para relacionar a atividade da enzima com o crescimento relativo das plantas, construiu-se um gráfico da atividade da PX em função do CRR obtido após 48 horas de tratamento (figura 30).

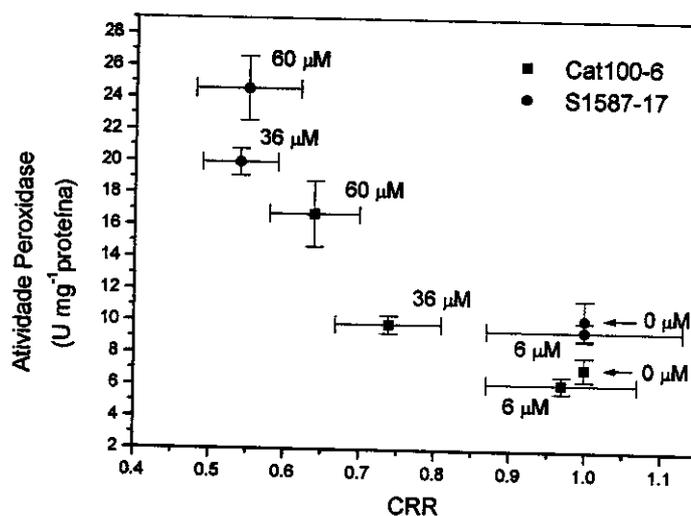


Figura 30: Atividade da enzima Peroxidase em função do crescimento relativo da raiz (CRR) para as linhagens Cat 100-6 e S1587-17. A concentração de alumínio a que as plantas foram submetidas está representada ao lado de cada ponto. Os pontos representam a média \pm SD ($n = 8$ a 10 para CRR e $n = 4$ para peroxidase) e os pontos correspondentes ao controle possuem CRR igual a 1 por definição, assim, não possuem barras de desvio padrão.

Observa-se pela figura 30 que a atividade da enzima Peroxidase está relacionada com o crescimento relativo da raiz. Para as duas linhagens, quanto menor o CRR, maior a tendência da atividade da GPX aumentar. As plantas controle e tratadas com $6 \mu\text{M}$ de Al^{3+} do S1587-17 apresentam maior atividade da GPX que as plantas do Cat 100-6, apesar de possuírem CRR próximo a 1. Já para os tratamentos de 36 e $60 \mu\text{M}$, a diferença de comportamento entre as linhagens pode ser melhor visualizada, pois o S1587-17 apresenta menor crescimento relativo e maior atividade da enzima Peroxidase do que o Cat 100-6.

A atividade da PX também foi determinada em função do tempo de tratamento. A atividade no tempo zero foi determinada em plantas após a germinação, sem tratamento nas soluções nutrientes. Assim, a atividade no tempo zero é a mesma para os tratamentos na ausência e na presença de $36 \mu\text{M}$ de alumínio.

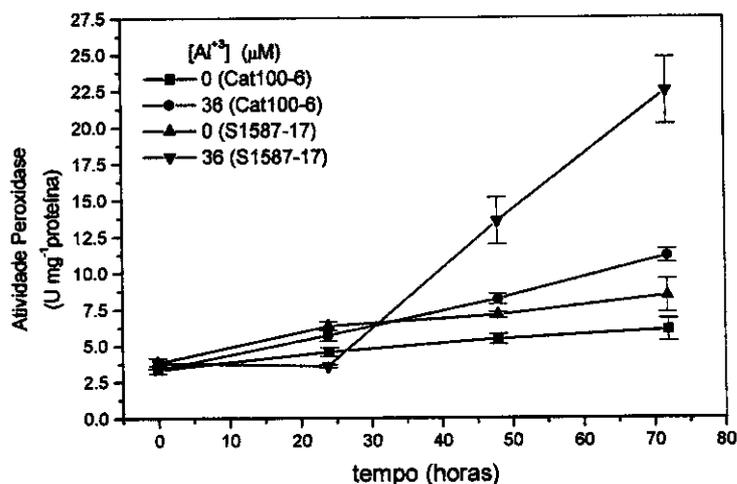


Figura 31: Atividade da Peroxidase em função do tempo de tratamento para as linhagens de milho Cat 100-6 e S1587-17 tratadas em soluções nutrientes completas na ausência e na presença de 36 μM de Al^{3+} . Os valores de atividade para o tempo zero foram obtidos para plantas sem tratamento com AlCl_3 . Os pontos representam a média \pm SD ($n = 4$).

A atividade da Peroxidase (PX) depende do tempo de tratamento. Pelo gráfico da figura 31 observa-se que quando maior o tempo de exposição ao íon, maior a atividade da enzima. Esse aumento da atividade é maior para a linhagem sensível ao alumínio, S1587-17, do que para a linhagem tolerante, Cat 100-6. Comparando as curvas das duas linhagens no tratamento controle, sem Al^{3+} , observa-se novamente que o S1587-17 possui uma maior atividade da enzima. Entretanto, essa diferença da atividade da PX nos tratamentos controle das duas linhagens é praticamente constante durante o tratamento após 24 horas. O mesmo não acontece com as plantas submetidas ao alumínio. A diferença entre as atividades das plantas tratadas e não tratadas aumenta significativamente no S1587-17 após 48 horas de tratamento quando comparadas com as diferenças encontradas para o Cat 100-6.

As atividades da enzima PX encontradas em função do tempo de tratamento para as plantas tratadas com 36 μM de alumínio, foram analisadas em

função do crescimento relativo dessas plantas. Na figura 32 observa-se que ambas as linhagens diminuem seu crescimento relativo nas primeiras 24 horas de tratamento, mas somente o Cat 100-6 tem um pequeno aumento da atividade da enzima nesse período. Em 48 e 72 horas de tratamento, as linhagens possuem comportamentos bem distintos: a atividade da enzima aumenta para ambos, sendo esse aumento mais intenso no S1587-17. Entretanto, enquanto o Cat 100-6 recupera seu crescimento, o S1587-17 tem seu CRR diminuído apesar do aumento na atividade enzimática. Semelhante perfil foi observado para a enzima SOD.

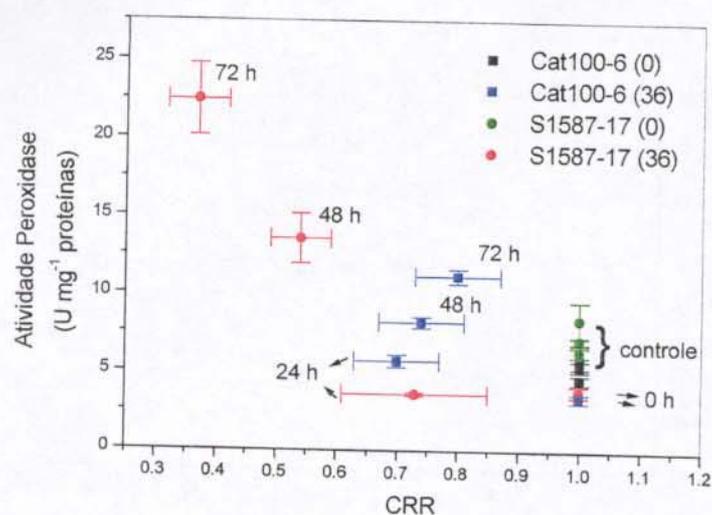


Figura 32: Atividade da enzima Peroxidase em função do Crescimento Relativo da Raiz (CRR) para o Cat 100-6 e S1587-17 em diferentes tempos de tratamento com $36 \mu\text{M}$ de Al^{3+} . Os pontos representam a média \pm SD ($n = 8$ a 10 para CRR e $n = 4$ para peroxidase). O CRR para tempo zero é igual a 1 por definição, assim não apresentam desvio padrão.

4.6 – Atividade da Catalase (CAT)

A degradação da água oxigenada foi observada a 240 nm utilizando-se para cada medida $300 \mu\text{L}$ de extrato de proteínas. O decaimento observado nesse comprimento de onda foi da ordem de $0,01$ unidades de absorbância, valor este que está dentro da faixa de flutuação do espectrofotômetro. Assim, como não houve variação significativa da concentração H_2O_2 , estima-se que a atividade da

enzima Catalase seja muito pequena nas linhagens de milho Cat 100-6 e S1587-17, tolerante e sensível ao alumínio, respectivamente.

Na figura 33 observa-se a variação da absorbância em função do tempo para extrato proteico obtido de plantas da linhagem Cat 100-6 tratadas com solução nutriente na ausência de alumínio (controle). Todas as curvas de absorbância obtidas apresentam o mesmo perfil. Pelo gráfico é possível verificar que não houve diminuição da absorbância a 240 nm correspondente à água oxigenada, indicando a ausência de quantidades significativas da enzima Catalase nas duas linhagens de milho, tratadas e não tratadas.

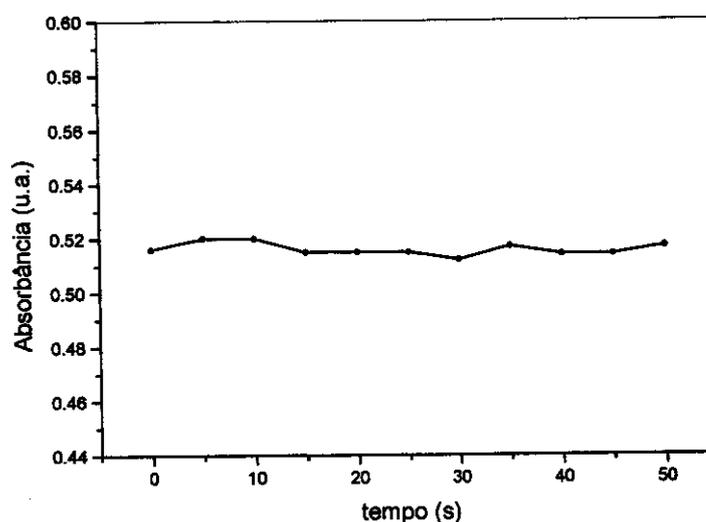


Figura 33: Absorbância em função do tempo observada no comprimento de onda de 240 nm, correspondente à absorção de água oxigenada, para o extrato de proteínas obtido de raízes de milho Cat 100-6 tratadas em solução nutriente na ausência de alumínio. A mistura de reação continha tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 6,8, 300 μL de extrato de proteínas e 8 mM de água oxigenada. Os pontos correspondem à absorbância medida a cada 5 segundos a 240 nm.

4.7 – Atividade da Glutathione Redutase (GR)

A atividade da Glutathione Redutase (GR) foi determinada em função da concentração de alumínio e em função do tempo de tratamento utilizando-se o método de monitoramento da formação de TNB a 412 nm. Os resultados dose e

tempo dependentes obtidos podem ser vistos nas figuras 34 e 35, respectivamente.

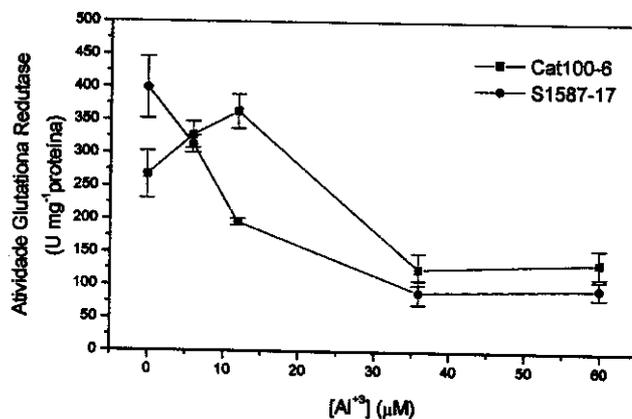


Figura 34: Atividade da GR em função da concentração de Al³⁺. O Cat 100-6 e o S1587-17 foram submetidos por 48 horas a 0, 6, 12, 36 e 60 μM de Al³⁺. Os pontos representam a média ± SD (n = 4).

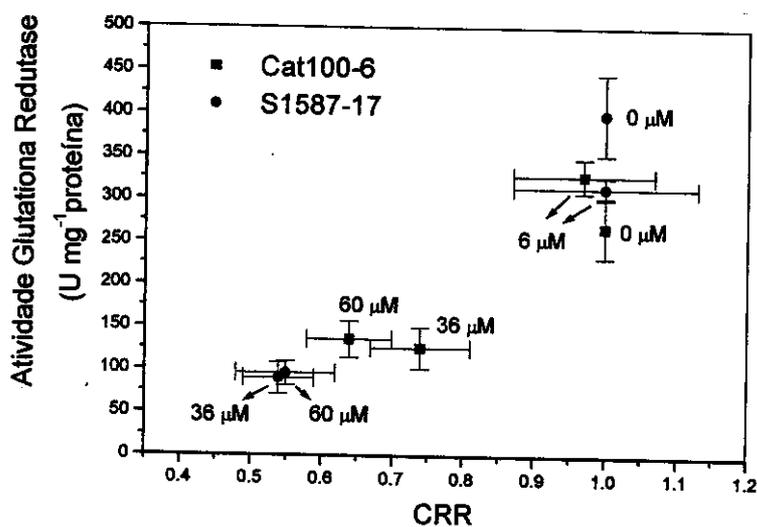


Figura 35: Atividade da enzima Glutaciona Redutase em função do crescimento relativo da raiz (CRR) para as linhagens Cat 100-6 e S1587-17. A concentração de alumínio a que as plantas foram submetidas está representada ao lado de cada ponto. Os pontos correspondentes ao controle possuem CRR igual a 1 por definição, assim, não possuem barras de desvio padrão. Os pontos representam a média ± SD (n = 8 a 10 para CRR e n = 4 para glutaciona).

Através do gráfico da figura 35, observa-se que a atividade da enzima GR possui uma relação direta com o crescimento relativo das plantas, isto é, conforme a atividade diminui, o CRR também diminui, resultado este diferente dos encontrados para as enzimas SOD e PX, as quais tinham sua atividade aumentada enquanto o CRR diminuía.

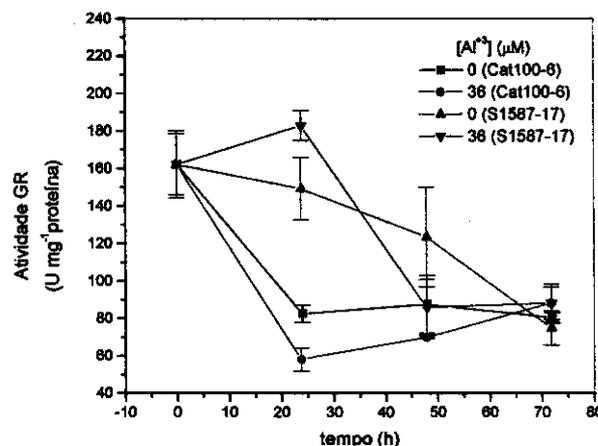


Figura 36: Atividade GR em função do tempo de tratamento. As plantas foram tratadas com solução nutriente com 36 µM de Al³⁺. Os valores de atividade para o tempo zero foram obtidos para plantas sem tratamento com alumínio. Os pontos representam a média ± SD (n = 4).

O Cat 100-6 apresentou um aumento da atividade da Glutathione Redutase em 48 horas de exposição a 6 e 12 µM de Al³⁺, seguida de um abaixamento da atividade para concentrações mais altas, de 36 e 60 µM, enquanto que o milho sensível S1587-17 apresentou uma diminuição da atividade de GR em todas as concentrações de alumínio estudadas (Figura 36).

O estudo tempo dependente mostrou um comportamento distinto para as duas linhagens. Nas primeiras 24 horas de tratamento com soluções de 0 e 36 µM de Al³⁺, as plantas do Cat 100-6 apresentaram uma queda na atividade da GR. Após esse tempo, o controle permaneceu constante, enquanto que as plantas tratadas aumentaram sua atividade e em 72 horas apresentavam uma atividade

igual à do controle. O sensível controle apresentou uma queda mais suave da atividade da GR, chegando em 72 horas aos valores encontrados no Cat 100-6, enquanto que as plantas tratadas com Al^{3+} sofrem uma queda brusca entre 24 e 48 horas de tratamento.

A figura 37 relaciona atividade da GR em função do CRR. Diferentemente das enzimas SOD e PX, a atividade da GR encontrada nas plantas controle apresentou uma grande variação em função do tempo de tratamento. Os dois genótipos apresentaram uma tendência de possuir uma relação direta entre atividade e CRR após 24 horas de exposição ao íon alumínio, apesar dessa tendência ficar mais claramente visível no milho tolerante Cat100-6.

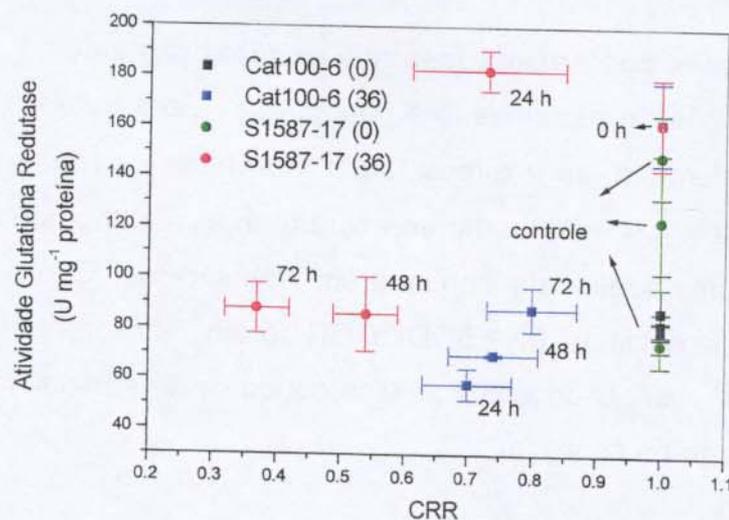


Figura 37: Atividade da enzima Glutamina Redutase em função do Crescimento Relativo da Raiz (CRR) para o Cat 100-6 e S1587-17. O CRR para tempo zero é igual a 1 por definição, assim não apresentam desvio padrão. As plantas controle também apresentam CRR igual a 1. Os pontos representam a média \pm SD ($n = 8$ a 10 para CRR e $n = 4$ para glutamina redutase).

As atividades para as enzimas nos dois experimentos, dose e tempo dependentes, apresentaram valores absolutos bastante diferentes. Os experimentos foram realizados em semanas distintas e essas diferenças são

observadas quando se trabalha com material vivo. Entretanto, o perfil obtido nos dois tratamentos pode ser comparado, já que possui os pontos de 48 horas, 0 e 36 μM de Al^{3+} em comum. Observa-se na figura 34 que, para o Cat 100-6, a atividade encontrada no milho tratado é levemente inferior à encontrada no controle, perfil este também observado na figura 36, nos dados obtidos para o experimento tempo dependente. O mesmo ocorre com o S1587-17, o qual apresenta uma atividade da enzima GR menor no milho tratado do que no controle. Essa variação de valores absolutos entre os experimentos realizados em semanas diferentes também foi observada para as enzimas SOD e PX, mas, da mesma forma que para a GR, os resultados obtidos mostraram concordância de perfil entre os pontos com 48 horas de tratamento e 0 e 36 μM de Al^{3+} .

4.8 – Reações não enzimáticas nos extratos protéicos

Após extração de proteínas das pontas das raízes tratadas e não tratadas com 36 μM de alumínio, as enzimas foram inativadas através de autoclavagem durante 20 minutos. Os extratos apresentaram uma mudança de cor de amarelo claro para marrom, apesar de continuarem translúcidos. O procedimento para determinação das enzimas PX, SOD e GR foram feitos; entretanto, nenhuma atividade foi observada. O espectro cinético obtido na determinação da Peroxidase pode ser observado na figura 38.

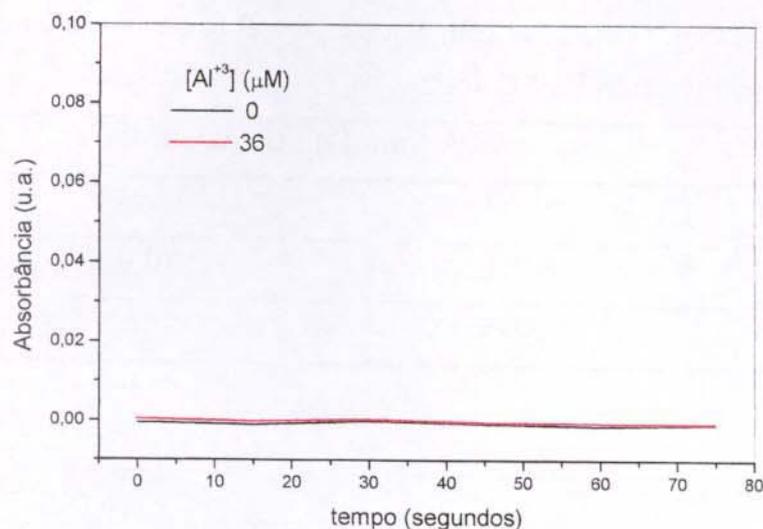


Figura 38: gráfico de Absorbância (u.a.) em função do tempo obtido a 470 nm, comprimento de onda de absorção do tetraguaiacol. As curvas apresentadas são do milho sensível S1587-17, controle e exposto a 36 μM de alumínio.

4.9 – Peroxidação de lipídeos

Os três métodos utilizados para detecção de peroxidação de lipídeos, ácido tiobarbitúrico, alaranjado de xilenol e cromatografia líquida e alta eficiência, indicaram que, no tempo de exposição de 48 horas a 36 μM , o alumínio não induz variação na peroxidação lipídica dos milhos Cat100-6 e S1587-17.

4.9.1 – Ácido tiobarbitúrico

As quantidades de malonaldeído encontradas nas duas linhagens de milho (tabela 4) são estatisticamente iguais, tanto entre as linhagens, quanto entre os tratamentos controle e com alumínio. Além disso, os espectros de absorção obtidos não possuem um perfil característico de pico na região de 500 a 600 nm (figura 39), como pôde ser observado na figura 10 de Materiais e Métodos.

Tabela 4: quantidade de malonaldeído em nmol g^{-1} de raiz fresca encontrada para plantas dos milhos Cat100-6 e S1587-17 tratadas com solução nutriente contendo 0 e $36 \mu\text{M}$ de Al^{3+} . Os valores representam a média \pm SD ($n=2$).

[Al^{3+}] (μM)	MDA (nmol g^{-1} de raiz fresca)	
	0	36
Cat100-6	$9,0 \pm 1,2$	$10,4 \pm 1,0$
S1587-17	$10,0 \pm 1,0$	$9,9 \pm 1,4$

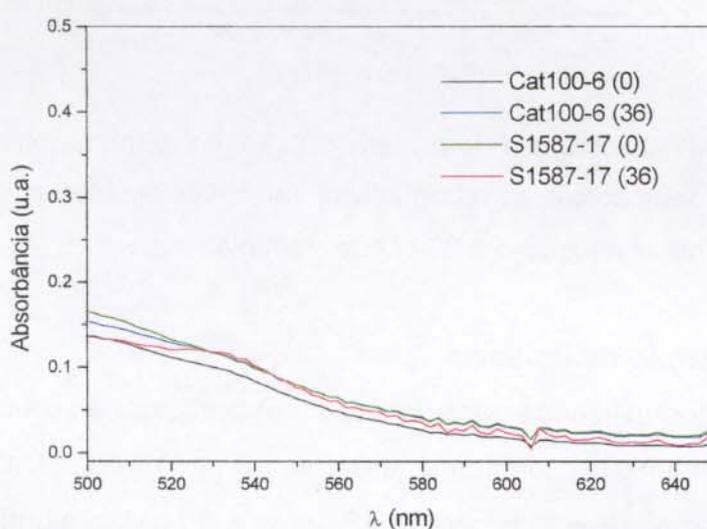


Figura 39: gráficos de absorvância (u.a.) em função do comprimento de onda (nm) para extratos de pontas de raízes dos milhos Cat100-6 e S1587-17 após reação com ácido tiobarbitúrico.

4.9.2 – Alaranjado de xilenol

A quantificação de hidroperóxidos, um dos produtos da peroxidação de lipídeos, pelo método do alaranjado de xilenol, indicou que as quantidades dessas espécies nas pontas das raízes são as mesmas para os dois milhos analisados, expostos ou não ao íon alumínio (tabela 5).

Tabela 5: grau de peroxidação para as pontas das raízes dos milhos Cat100-6 e S1587-17, tratados com solução nutriente na ausência e na presença de 36 μM de alumínio. Os valores representam a média \pm SD ($n=2$).

[Al ³⁺] (μM)	Peroxidação (nmol g^{-1})	
	0	36
Cat100-6	148 \pm 11	140 \pm 10
S1587-17	155 \pm 4	151 \pm 4

Conforme figura 40, as curvas de absorção obtidas para as soluções após 12 horas de reação não apresentaram qualquer sinal do perfil de absorção (figura 12) encontrado quando água oxigenada é adicionada à solução.

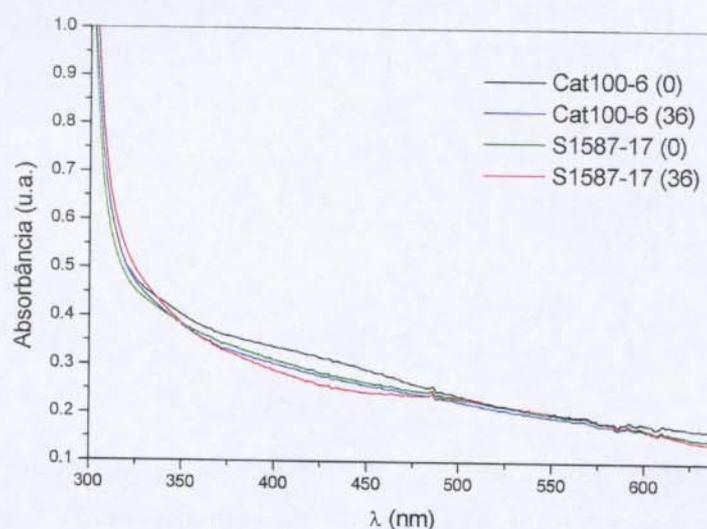


Figura 40: espectros de absorbância (u.a.) em função do comprimento de onda (nm) obtidos para os milhos tolerante e sensível ao alumínio, após 12 horas de reação com solução reagente ácida de Fe^{+2} – alaranjado de xilenol.

4.9.3 – Cromatográfica líquida de alta eficiência

Amostras obtidas a partir de plantas das duas linhagens tratadas por 48 horas em solução nutriente contendo 0 (controle) e 36 μM de alumínio foram analisadas. Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados na figura 41.

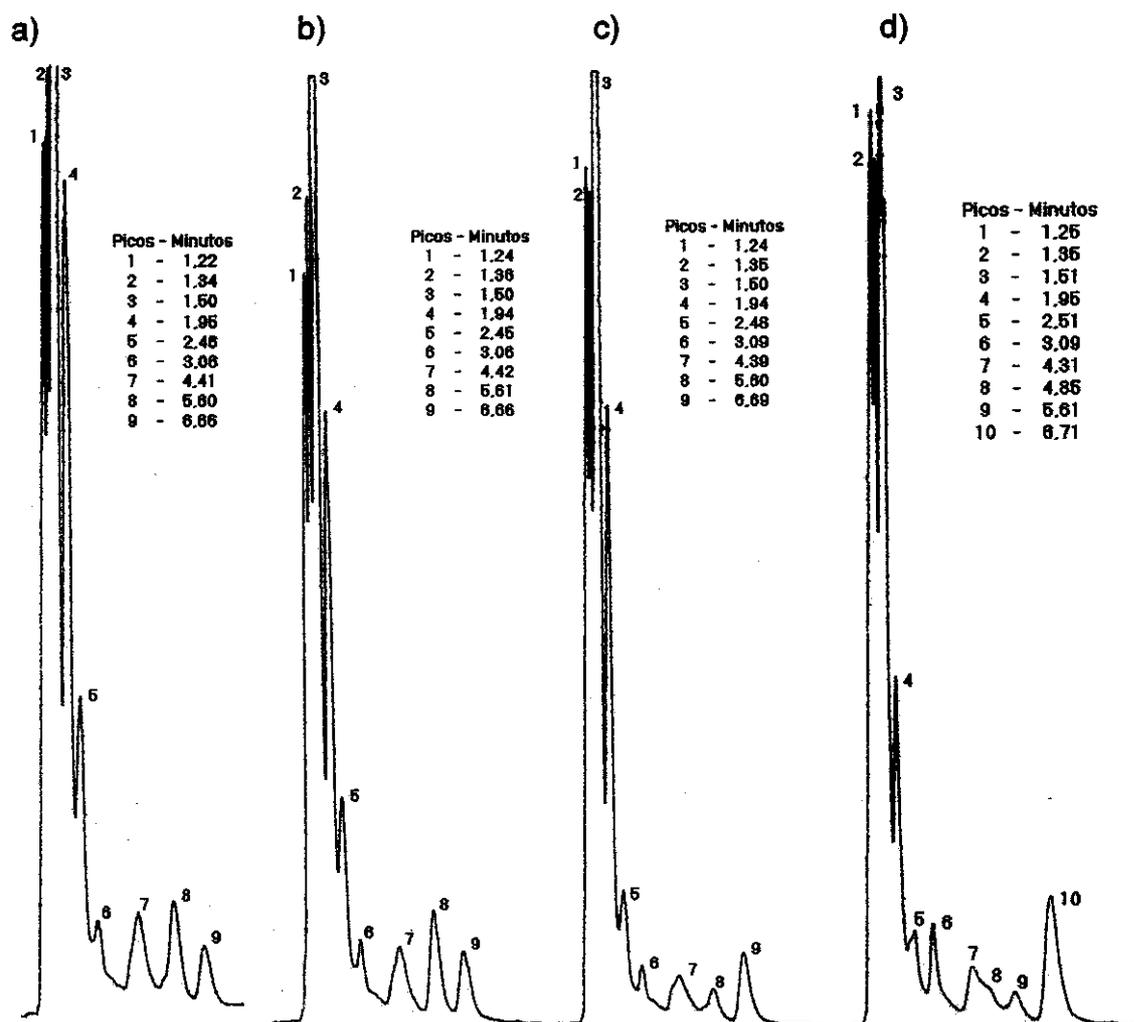


Figura 41: Cromatogramas de extratos dos milhos Cat100-6 e S1587-17 tratados em solução nutriente na presença e ausência de Al^{3+} na seguinte seqüência: Cat100-6 a) 0 μM e b) 36 μM ; S1587-17 c) 0 μM e d) 36 μM .

Através das figuras 41.a e 41.b, observa-se que os cromatogramas correspondentes ao Cat100-6 controle e exposto a 36 μM de Al^{3+} , respectivamente, possuem o mesmo perfil de picos. Além disso, as áreas relativas dos picos são praticamente as mesmas para os dois cromatogramas. O mesmo não acontece com os cromatogramas obtidos para os extratos do milho sensível (figuras 41.c e 41.d), os quais apresentam entre si pequenas diferenças de área com relação aos sinais observados a partir de 2,50 minutos. Essas diferenças

podem ser consequência da degradação da raiz do milho sensível exposto ao íon alumínio.

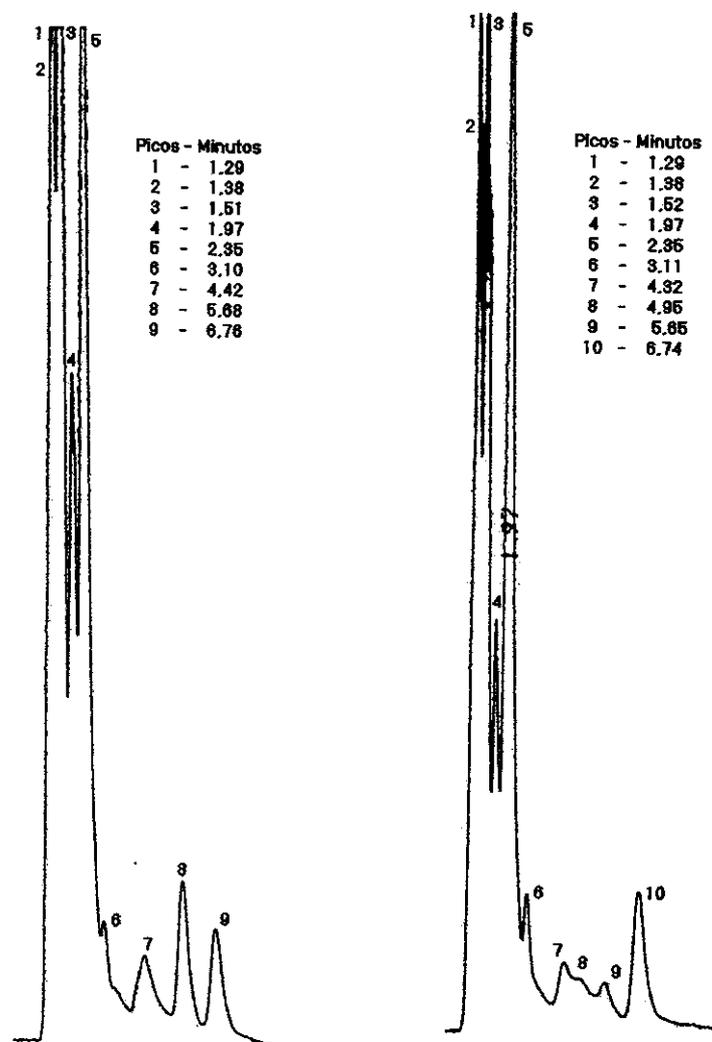


Figura 42: cromatogramas das amostras dos milhos a) Cat100-6 e b) S1587-17 tratadas com 36 μM de alumínio e injetadas no cromatógrafo juntamente com padrão de malonaldeído. As condições de análises estão descritas em Materiais e Métodos.

Construindo-se a curva padrão, determinou-se que o MDA possui um tempo de retenção de 2,36 minutos nas condições de análise. O sinal mais próximo desse tempo observado nos cromatogramas é o de 2,46 minutos para o Cat100-6 e 2,48 minutos para o S1587-17. Para verificar se esses sinais com 0,10 minutos de diferença eram ou não devido ao MDA, 3 μL de padrão foram injetados junto

com as amostras de Cat100-6 e S1587-17 tratadas com Al^{3+} . Os cromatogramas obtidos (figura 42) mostram que os sinais observados em 2,46 e 2,48 minutos não correspondem ao malonaldeído, já que o tempo de retenção do MDA continua 2,35 minutos quando este está presente na amostra.

4.10 – Oxidação de proteínas

Um dos métodos de quantificação da oxidação de proteínas é a determinação da quantidade de carbonilas associadas a estas proteínas em $nmol\ mg^{-1}$ proteínas. Pela figura 43 observa-se o grande aumento da quantidade de carbonilas na linhagem S1587-17, sensível ao alumínio, com relação ao seu controle. Além disso, observa-se que a quantidade de carbonilas no Cat 100-6 permanece constante, mesmo após 48 horas de tratamento em diferentes concentrações de alumínio.

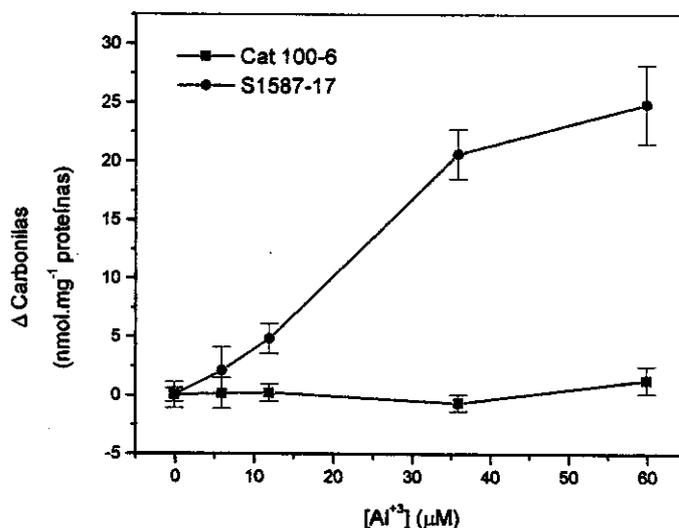


Figura 43: Aumento na quantidade de carbonilas associadas a proteínas em função da concentração de alumínio a que as plantas das linhagens Cat 100-6 e S1587-17 foram submetidas. As variações na oxidação de proteínas foram determinadas subtraindo-se a quantidade de carbonilas encontradas nas plantas controle (0 μM de Al^{3+}) da quantidade encontrada nas plantas tratadas com diferentes concentrações de alumínio. Os pontos representam a média \pm SD ($n = 4$).

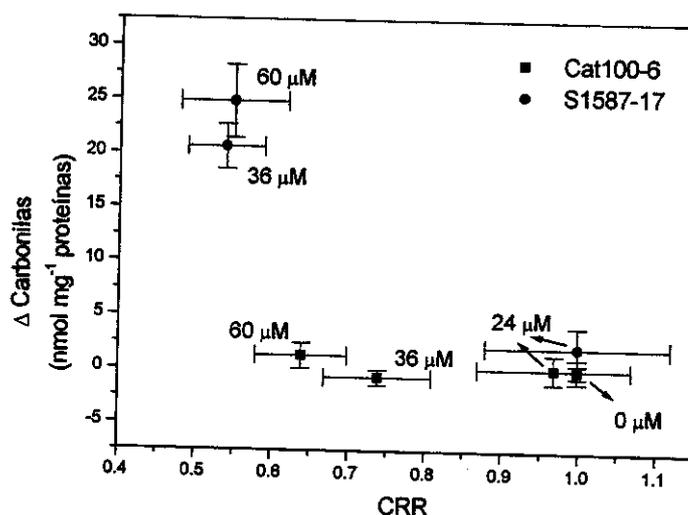


Figura 44: Quantidade de carbonilas em função do crescimento relativo da raiz (CRR) para as linhagens Cat 100-6 e S1587-17. A concentração de alumínio a que as plantas foram submetidas por 48 horas está representada ao lado de cada ponto. Os pontos correspondentes ao controle possuem CRR igual a 1 por definição, assim, não possuem barras de desvio padrão para o crescimento. Os pontos representam a média \pm SD ($n = 8$ a 10 para CRR e $n = 4$ para carbonilas).

Pela figura 44 observa-se que existe uma relação inversa entre a variação na quantidade de carbonilas e o crescimento relativo da raiz para o milho sensível. Entretanto, para o milho tolerante, os resultados mostram que a diminuição do CRR devido exposição ao alumínio em 48 horas de tratamento não está relacionada com qualquer aumento na oxidação de proteínas, já que esta praticamente não se altera.

Para as análises tempo dependentes, as plantas foram tratadas com 0 e 36 μM de Al^{3+} por 0, 24, 48 e 72 horas. Os resultados da figura 45 mostram um grande aumento na quantidade de carbonilas no milho sensível exposto ao Al^{3+} no período entre 24 e 48 horas de tratamento, mantendo-se constante após 72 horas. O mesmo não acontece com o milho tolerante, no qual se verifica que não

ocorrem variações significativas na quantidade de carbonilas, mesmo após 72 horas de tratamento.

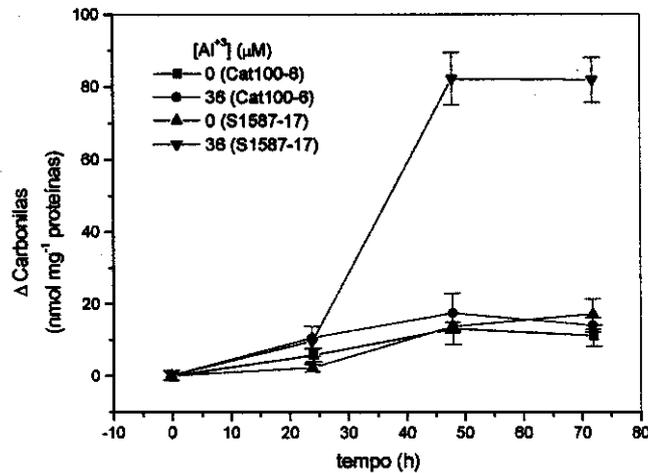


Figura 45: diferença de carbonilas associadas a proteínas encontradas para os milhos Cat100-6 e S1587-17 em função do tempo de tratamento com solução nutriente na ausência e na presença de 36 μM de Al^{3+} . Os pontos representam a média \pm SD ($n = 4$).

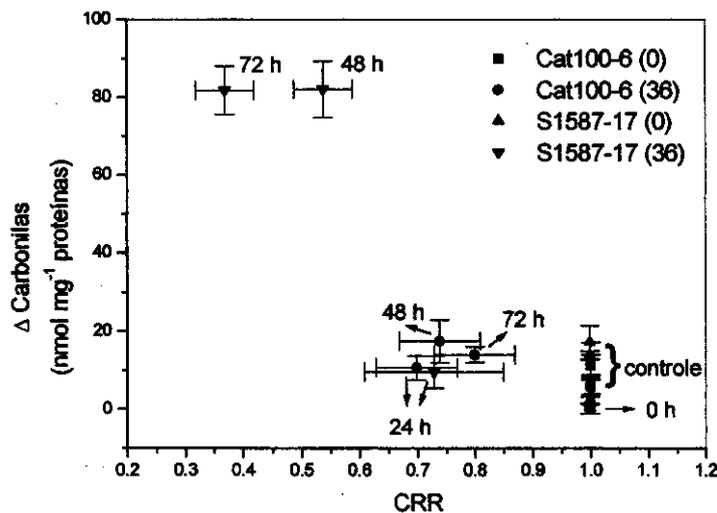


Figura 46: Quantidade de proteínas em função do Crescimento Relativo da Raiz (CRR) para o Cat 100-6 e S1587-17 em diferentes tempos de tratamento com 36 μM de Al^{3+} . O CRR para tempo zero é igual a 1 por definição, assim não apresenta desvio padrão. Os pontos representam a média \pm SD ($n = 8$ a 10 para CRR e $n = 4$ para carbonilas).

Pela relação entre oxidação e CRR nos tratamentos tempo dependentes, observa-se que após 24 horas de tratamento ocorre uma diminuição do CRR tanto para o tolerante quanto para o sensível, apesar de não ocorrer variação na quantidade de carbonilas. Após esse tempo, o sensível tem seu crescimento muito diminuído e sofre um grande aumento na oxidação de proteínas. Já o milho tolerante apresenta a tendência de recuperar seu crescimento e ainda não se observam variações na quantidade de proteínas.

4.11 – Apoptose

As fotos obtidas para o milho sensível e tolerante podem ser vistas na figura 47. Os núcleos com alto índice de fragmentação cromatínica adquirem coloração marrom após as reações de detecção, enquanto que os núcleos com baixa fragmentação adquirem coloração esverdeada durante o processo.

Pelas fotos obtidas é possível observar uma grande diferença na quantidade de núcleos marrons. O milho sensível (figura 47.b) apresentou vários núcleos com alta fragmentação cromatínica, mas também é possível encontrar núcleos esverdeados, os quais servem de controle negativo da reação. Para o milho tolerante (figura 47.a), somente alguns poucos núcleos apresentaram a cor marrom, enquanto que a grande maioria possui a cor verde, indicando poucos núcleos com altos índices de fragmentação cromatínica. A presença desses poucos núcleos marrons na região da coifa é utilizada como controle positivo da reação. Para as raízes controle tratadas somente com solução nutriente, o perfil de núcleos encontrado foi o mesmo do observado no milho tolerante exposto ao alumínio, isto é, uma grande quantidade de núcleos esverdeados e somente alguns núcleos marrons na região da coifa.

a)



b)

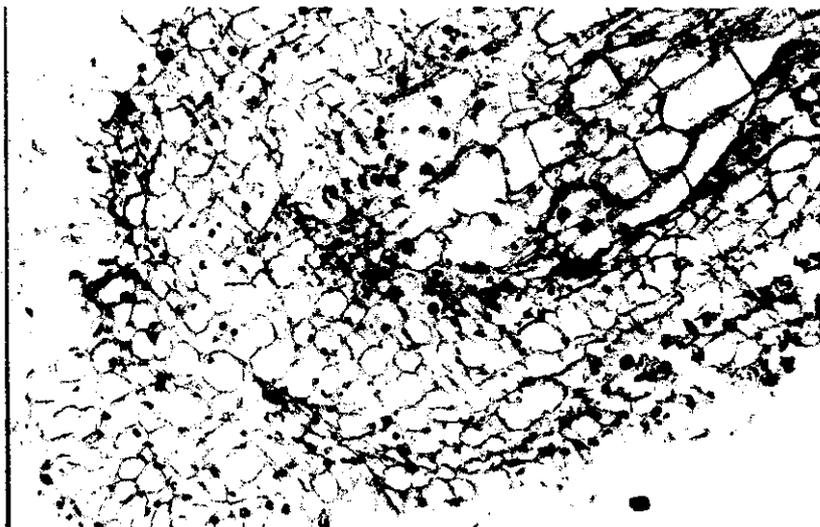


Figura 47: Fotos de cortes histológicos de ponta de raiz do milho a) Cat 100-6 e b) S1587-17 tratados por 48 horas em solução nutriente contendo $36 \mu\text{M}$ de Al^{3+} . O aumento total é de 400 vezes. Nestas microscopias pode-se observar o grande intumescimento da raiz do milho sensível.

5. Discussão

5.1 – Aspectos gerais

Foram encontrados muitos trabalhos da década passada envolvendo o estresse oxidativo. Entretanto, poucos relacionam toxicidade de metais e ativação de sistemas anti-estresse oxidativo em plantas (Briat e Lebrun, 1999). O objetivo deste trabalho foi investigar o estresse oxidativo como um dos mecanismos de toxidez ao alumínio em plantas. Para este estudo foram utilizadas duas linhagens de milho, Cat 100-6 e S1587-17, classificadas como tolerante e sensível ao íon alumínio (Al^{3+}), respectivamente, após determinação dos crescimentos relativos da raiz (CRR). Essas sementes foram obtidas do Banco de Sementes do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp e a tolerância ao alumínio na linhagem Cat 100-6 é controlada por um único gene semidominante, chamado *Alm1* (Moon *et al*, 1997).

5.2 – Crescimento relativo da raiz

O principal sintoma da toxidez causada pelo Al^{3+} é a inibição do crescimento da raiz nas primeiras horas de exposição ao íon (Delhaize *et al*, 1993). A liberação de ânions de ácidos orgânicos tem sido descrita como um importante mecanismo pelo qual a plantas tolerantes excluem o alumínio das células da ponta da raiz (Miyasaka *et al*, 1991; Pellet *et al*, 1995; Delhaize e Ryan, 1995; Zheng *et al*, 1998). Estudos mostraram que a linhagem Cat100-6, após 24 horas de exposição a 36 μM de alumínio, mantinha seu CRR em torno de 80%, enquanto o S1587-17 apresentava diminuição constante de seu crescimento. A linhagem tolerante libera ânions de ácidos orgânicos, principalmente citrato, como um mecanismo de defesa que poderia ser utilizado para exclusão do íon Al^{3+} das células da ponta da raiz (Jorge *et al*, 2001), já a linhagem sensível libera citrato em menor quantidade. A quantidade de citrato liberado pelo tolerante é 3,5 vezes maior do que o liberado pelo sensível. Os valores de CRR obtidos para o Cat 100-6 em diferentes concentrações de alumínio (figura 18) mostram uma diminuição no crescimento após 12 horas de tratamento, provavelmente devido a uma adaptação

à solução nutriente (Parker, 1995). Entretanto, o crescimento é restabelecido ou mantido, dependendo da concentração de exposição. O S1587-17, por liberar citrato em uma velocidade muito menor do que o Cat100-6 e provavelmente por não possuir outro mecanismo de defesa, sofre danos irreversíveis à raiz. Além disso, através das fotos obtidas após exposição das raízes à hematoxilina, é possível observar a ativação do mecanismo de exclusão do alumínio da ponta da raiz pelo tolerante. Após 24 horas de tratamento com 36 μM de Al^{3+} , a extremidade da raiz do tolerante possui uma cor amarela normal, enquanto que o sensível apresenta a cor violeta característica do complexo metal-hematoxilina. Esse comportamento já foi observado em outras variedades de milho (Jorge e Arruda, 1997).

5.3 – Superóxido Dismutase

A atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) aumentou significativamente na linhagem sensível ao alumínio nos tratamentos com 36 e 60 μM de Al^{3+} por 48 horas (figura 25). A SOD é responsável pela degradação dos radicais superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$, gerando oxigênio molecular (O_2) e água oxigenada (H_2O_2). As reações desse processo estão representadas na figura 48. O desproporcionamento não catalisado do $\text{O}_2^{\cdot-}$ depende fortemente do pH do meio e, em pH fisiológico de 7,4, possui uma constante de velocidade efetiva de $2 \cdot 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fridovich, 1989). A degradação desse radical pela SOD é independente do pH e é bem mais eficiente, possuindo uma constante de velocidade de $2 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Eltner, 1991 *in* Gille e Sigler, 1995).

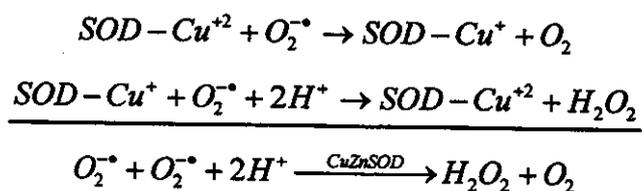


Figura 48: Esquema das reações de degradação dos radicais superóxidos pela enzima Superóxido Dismutase (Gille e Sigler, 1995).

O aumento na atividade da enzima Superóxido Dismutase na linhagem sensível S1587-17 nos tratamentos acima de 12 μM de alumínio indica que a exposição ao íon Al^{3+} está gerando uma quantidade de radicais superóxido nessas concentrações que a quantidade de enzima SOD existente não consegue degradar, obrigando a célula a ativar a síntese da SOD. Nas concentrações de 6 e 12 μM de Al^{3+} , a atividade da enzima deve ser suficiente para degradar os radicais gerados. Além disso, existe uma relação inversa entre a atividade da enzima e o CRR das plantas, o que pode ser observado pelo gráfico da figura 26.

Resultados dose-dependentes semelhantes foram encontrados em estudos feitos com um cultivar de soja (Cakmak e Horst, 1991), no qual observou-se uma maior atividade da SOD após tratamento com alumínio. Esses estudos foram realizados somente no cultivar de soja sensível ao alumínio, não havendo possibilidade de comparação desse aumento na atividade da enzima com o cultivar tolerante. Em nosso trabalho as determinações das atividades enzimáticas e oxidação de proteínas e lipídeos são feitas em duas linhagens, uma tolerante e uma sensível ao alumínio, permitindo fazer uma comparação dos resultados e avaliar se as alterações são um efeito geral inespecífico da toxidez do íon Al^{3+} ou se estão relacionadas à diferença de tolerância a este íon nas duas plantas. Além disso, as plantas utilizadas pertencem a linhagens com uma distância genética muito pequena, o que permite que comparações e avaliações de resultados sejam feitas sem interferências normalmente encontradas quando se utilizam variedades não relacionadas geneticamente (Delhaize *et al*, 1993b).

Os estudos tempo-dependentes mostraram que a atividade da SOD nas plantas tratadas com 36 μM de Al^{3+} tem um grande aumento entre 24 e 48 horas (figura 27). Esse tempo pode ser o tempo necessário para síntese de novas enzimas. Além disso, a queda da atividade da SOD observada no milho sensível exposto ao alumínio por 72 horas comparada à atividade em 48 horas deve ser devido à degradação da raiz, a qual se apresenta muito entumescida e com sinais de perda de massa, conforme pode ser visto na foto da figura 24.

A observação de que a exposição ao íon Al^{3+} induz a síntese da enzima Superóxido Dismutase indica que ocorre um aumento da quantidade de radicais superóxido gerados na célula, sugerindo que o alumínio interfere em algum dos processos de produção de O_2^- . Estudos realizados em *Arabidopsis thaliana* tratadas somente por 2 horas com Al^{3+} , mostraram que o alumínio induz mudanças na expressão de alguns genes (Richards *et al*, 1998), sendo que dos genes que tiveram sua expressão induzida, quatro estão relacionados ao estresse oxidativo, sendo um deles correspondente a SOD e os outros três correspondem a peroxidase, glutationa-S-transferase e uma proteína contendo cobre.

A produção de radicais superóxido ocorre principalmente nas cadeias transportadoras de elétrons. Nas raízes, sua produção ocorre na mitocôndria. Considerando que a Citocromo Oxidase não libera radicais de oxigênio detectáveis em solução, algum outro componente da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial deve transferir elétrons diretamente para a molécula de oxigênio (O_2), gerando radicais superóxido O_2^- . A velocidade de formação de radicais superóxido aumenta com o aumento da concentração de oxigênio na célula. Em uma atmosfera de 85% de oxigênio, cerca de 18% do O_2 consumido gera O_2^- (Halliwell e Gutteridge, 1999). A observação de que a exposição ao íon Al^{3+} induz a síntese da enzima Superóxido Dismutase indica que ocorre um aumento da quantidade de radicais superóxido gerados na célula, sugerindo que o íon Al^{3+} pode estar interferindo diretamente no processo de respiração celular, como já foi observado em raízes de trigo (Lima e Copeland, 1994).

5.4 – Catalase e Peroxidase

A degradação do radical superóxido pela SOD produz H_2O_2 na célula (figura 48). O balanço entre as atividades das enzimas SOD e Catalase/Peroxidase é muito importante para o sistema de defesa antioxidante (Gille e Sigler, 1995), pois a Catalase e a Peroxidase (PX) possuem a mesma função de degradar a molécula de H_2O_2 . A enzima Catalase não foi detectada nas pontas das raízes das duas linhagens de milho, enquanto que a atividade da enzima PX foi ativada na linhagem sensível, pelos tratamentos com 12, 36 e 60 μM de Al^{3+} ,

respectivamente, e a linhagem Cat 100-6 apresentou um aumento menor nos tratamentos de 36 e 60 μM de Al^{3+} (figura 29). Os aumentos observados na atividade da PX podem ser relacionados com o aumento na quantidade de H_2O_2 gerada na célula como consequência da degradação dos radicais superóxido pela SOD. Esses dados sugerem que a via de degradação da água oxigenada no milho é através da ativação de Peroxidases e não da Catalase. Muitos sistemas expostos a estresse oxidativo apresentaram aumento da atividade da PX, indicando maior produção de H_2O_2 nas células (Gosset *et al.*, 1996; Cakmak e Horst, 1991; González *et al.*, 1998). Além disso, a não indução da Catalase e o aumento da atividade da PX foram observados em sementes de café expostas a estresse oxidativo causado por baixas temperaturas (Queiroz *et al.*, 1998).

A atividade da PX aumentou não somente com o aumento da concentração, mas também aumentou significativamente com o tempo de exposição ao íon Al^{3+} na linhagem sensível S1587-17 (figura 31). Existe uma relação inversa entre o CRR das plantas e a atividade enzimática da PX em função do tempo de tratamento (figura 32), o que indica que a quantidade de água oxigenada induzida no S1587-17 pelo alumínio deve ser maior do que a enzima consegue degradar, já que mesmo aumentando a atividade, as plantas continuam diminuindo seu crescimento. Já para o Cat 100-6, tolerante ao alumínio, quanto maior a atividade da enzima, maior seu crescimento relativo, o que indica que a atividade da enzima é suficiente para que a planta retome ou mantenha seu crescimento, como ocorre no tratamento de 60 μM de Al^{3+} em 48 horas.

As peroxidases possuem muitas funções dentro da célula, sendo uma delas a polimerização da lignina, polímero encontrado junto com a celulose e outros polissacarídeos em algumas paredes celulares e responsável pela impermeabilização do xilema (Salisbury e Ross, 1992). Na síntese da lignina, catalisada pelas peroxidases, a água oxigenada utilizada pode ser proveniente de outras regiões da célula. Entretanto, na sua falta, as peroxidases são capazes de produzi-la através de um complexo mecanismo de oxidação de NADH (Lamb e Dixon, 1997). Esta reação é estimulada pela presença de monofenóis e Mn^{+2} e pode ser um mecanismo de produção de H_2O_2 extracelular (Halliwell, 1978). A

geradas na célula através da oxidação de ascorbato (AsA) a monodehidroascorbato (MAsA), que é convertido a dehidroascorbato (DAsA) por reações não enzimáticas. O DAsA formado precisa ser convertido novamente a AsA para manutenção do ciclo e a enzima responsável por essa reação é a Dehidroascorbato Redutase (DR), que se utiliza de glutathiona reduzida (GSH), transformando-a em glutathiona oxidada (GSSG). Para que esse sistema de defesa antioxidante formado pelas enzimas APX e DR funcione eficientemente, a razão GSH/GSSG deve ser mantida alta, isto é, uma grande quantidade de glutathiona reduzida deve estar disponível na célula. A enzima responsável por reduzir a GSSG é a Glutathiona Redutase (GR).

A razão entre GSH/GSSG e a atividade de GR são parâmetros muito usados para detectar a indução de estresse oxidativo em plantas. Entretanto, comportamentos bem distintos com relação a esses parâmetros tem sido observados (Creissen *et al*, 1999). Rao e Sresty (2000) observaram um aumento da atividade de GR em raízes de dois cultivares de ervilha induzido por tratamentos com níquel e zinco. Resultados semelhantes foram encontrados em folhas de ervilha exposta a estresse salino (Hernandés *et al*, 1999) e em folhas de milho tratado com H₂O₂ (Pastori e Trippi, 1992). Além disso, o aumento da razão GSH/GSSG foi observado em raízes de soja tratadas com NaCl (Comba *et al*, 1998) e utilizada para classificação de sementes de vários cereais quanto à resistência ao estresse oxidativo (Zielinski *et al*, 2000). Entretanto, González *et al* (1998) observaram um aumento das atividades de SOD, GPX e APX em folhas de um genótipo de feijão sensível a manganês, indicando a indução de estresse oxidativo por esse íon, mas, curiosamente, não observaram qualquer mudança na atividade da GR. Além disso, a atividade de GR sofreu diminuição em folhas de girassóis tratados com cobre, cádmio e ferro (Gallego *et al*, 1996) e um aumento da capacidade de produção de GSH em tabaco transgênico resultou em um grande aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo (Creissen *et al*, 1999).

Os resultados dose dependentes para a Glutathiona Redutase (figura 34) indicam que o tratamento com alumínio diminui a atividade da enzima GR no milho S1587-17, sensível ao alumínio, em qualquer concentração e no Cat100-6 nos

tratamentos acima de 12 μM de Al^{3+} . Além disso, diferentemente das enzimas SOD e PX, a atividade da GR apresenta uma relação direta com o CRR, ou seja, quanto menor o CRR, menor a atividade da enzima (figura 35). Esses resultados indicam que o íon Al^{3+} pode estar inibindo a atividade da GR. Esse tipo de inibição já foi proposto como causa da diminuição da quantidade de glutathiona (GSH) em plantas, envolvendo enzimas participantes da síntese de GSH e metais tóxicos (Rauser, 1987). A diminuição da atividade da GR faz com que a razão GSH/GSSG diminua, diminuindo a produção de AsA pela DR, o que implica numa diminuição do consumo de H_2O_2 . Isso faz com que a capacidade antioxidante do ciclo ascorbato-glutathiona fique reduzida, mesmo que a produção de AsA pela MR continue inalterada. A diminuição da eficiência do ciclo pode ter consequências diferentes para as duas linhagens. A H_2O_2 produzida pelo efeito do Al^{3+} no milho tolerante é consumida pela PX, pois não se observa oxidação de proteínas. No milho sensível, o aumento na atividade da PX parece não ser suficiente para degradar a quantidade de água oxigenada gerada, permitindo que esta contribua para o aumento na oxidação de proteínas observado nessa linhagem. Se o ciclo funcionasse eficientemente, o perfil de estresse oxidativo observado no milho sensível poderia ser menor ou não existir, já que a H_2O_2 seria degradada em maior quantidade, diminuindo ou eliminando sua provável ação no aumento da oxidação de proteínas.

5.6 – Peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos foi analisada por três métodos diferentes: ácido tiobarbitúrico (TBA), alaranjado de xilenol e cromatografia líquida de alta eficiência. No projeto inicial, foi proposto que a peroxidação seria analisada somente pelo TBA. Entretanto, devido a semelhança entre os valores encontrados e os desvios elevados, apesar de já ter sido caracterizado um quadro de estresse oxidativo no milho sensível, considerou-se adequado a confirmação desses resultados utilizando-se outros dois métodos.

Os resultados encontrados indicam que não há indução de peroxidação de lipídeos pela exposição ao alumínio, já que os resultados mostram valores

estatisticamente iguais entre os milhos controles e os tratados e a cromatografia líquida indicou a ausência de malonaldeído. Além disso, essa semelhança de valores foi encontrada também entre as linhagens Cat100-6 e S1587-17. Assim, a peroxidação de lipídeos pode não ser uma rota de degradação celular das espécies reativas de oxigênio geradas nas células dos milhos ou o tratamento não foi eficiente para induzir esse tipo de degradação.

A concentração de 36 μM de alumínio não foi aumentada devido aos resultados anteriores de crescimento relativo da raiz, atividade das enzimas, oxidação de proteínas e apoptose, indicarem que essa concentração é suficiente para uma boa diferenciação entre as linhagens. Entretanto, a não indução da peroxidação pode ser consequência do tempo de tratamento, estabelecido como 48 horas. Cakmak e Horst (1991) observaram que um cultivar de soja sensível ao Al^{3+} apresentou aumento na peroxidação de lipídeos após 48 horas de tratamento, enquanto Comba *et al* (1998) observaram um pequeno aumento na quantidade de MDA em nódulos de soja após 10 dias, o que corresponde a 240 horas de exposição. Raízes de café apresentaram um grande aumento nos teores de MDA quando expostas a baixas temperaturas (10 °C), mas somente no sexto dia de tratamento (Queiroz *et al*, 1998). Já em folhas de sorgo exposto a estresse por falta de água, não foi observada nenhuma diferença estatística na peroxidação de lipídeos após 5 dias (120 horas), mas uma pequena diferença foi obtida em folhas de girassol (Zhang e Kirkham, 1996). Assim, o tempo de exposição das raízes dos milhos Cat100-6 e S1587-17 ao Al^{3+} pode ter sido pequeno para induzir a peroxidação de lipídeos ou pequeno para quantificação e diferenciação entre as plantas.

Independentemente se o tratamento com alumínio não induz peroxidação ou se o tempo de 48 horas de exposição ao Al^{3+} foi pequeno para a observação de diferenças entre as linhagens de milho e os tratamentos, a peroxidação de lipídeos não é a causa determinante da inibição do crescimento das raízes das plantas, como sugerido por alguns autores (Matsumoto, 2000), pois a inibição do crescimento da raiz é observada nas primeiras horas de exposição ao íon (Delhaize *et al*, 1993a) e a parada total do crescimento foi observada em nossos

experimentos a partir de 60 horas de exposição a 36 e 60 μM de Al^{3+} para a linhagem sensível S1587-17.

Esses resultados de peroxidação parecem estar em desacordo com a grande degradação da raiz do milho sensível, quando comparada ao milho tolerante (figura 21). Após 12 horas de tratamento com 36 μM de Al^{3+} , a raiz do milho sensível apresenta perda de sua integridade, possuindo rachaduras e grande intumescimento, enquanto a do milho tolerante possui um aspecto normal. Apesar de tão grande diferença, ambas as linhagens não apresentaram diferença na peroxidação de lipídeos. Entretanto, Yamamoto *et al* (2001), estudando raízes de ervilha, observaram que a exposição ao alumínio induzia peroxidação de lipídeos e inibição do crescimento da raiz após 4 horas de tratamento. Utilizando um antioxidante lipofílico (butilato de hidroxianisol), eles observaram que a peroxidação de lipídeos era completamente prevenida. Entretanto, o antioxidante não causou nenhuma modificação na inibição do crescimento, sugerindo que a peroxidação de lipídeos não contribui diretamente na inibição do crescimento da raiz. Além disso, estudos histoquímicos sobre a perda da integridade da membrana sugerem que os danos causados à membrana são devido ao rompimento mecânico das células na região de alongação após tratamento por 8 horas com alumínio. Os autores sugerem que, devido ao maior acúmulo de íons Al^{3+} na parte externa da raiz, as rachaduras são causadas por uma expansão celular diferenciada na zona de alongação: ocorre uma inibição da expansão celular superficial, enquanto a expansão interna das células ocorre normalmente. Pela hipótese dos autores, a perda da integridade da membrana observada na linhagem sensível ao Al^{3+} , não está relacionada com a peroxidação de lipídeos.

5.7 – Oxidação de proteínas

Provavelmente, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e PX na linhagem sensível, S1587-17, não é suficiente para degradação das espécies reativas de oxigênio geradas no tratamento com alumínio. Em 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de alumínio, os resultados obtidos (figura 43) mostram que quanto maior a concentração fitotóxica de Al^{3+} , maior é a

oxidação de proteínas observada nas células da raiz, o que indica que a quantidade de radicais induzida pelo íon é maior do que o sistema de defesa antioxidante consegue degradar. Além disso, observa-se que esse aumento na oxidação de proteínas na linhagem sensível ocorre no intervalo de 24 a 48 horas de exposição ao Al^{3+} (figura 45), resultados coincidentes com o aumento da atividade da Peroxidase, grande aumento na atividade da Superóxido Dismutase e diminuição brusca da atividade da Glutathiona Redutase.

As carbonilas detectadas são aquelas presentes nas funções orgânicas cetona e aldeído. As carbonilas presentes nas ligações peptídicas das proteínas não reagem para formar a base de Schiff (Streitweiser *et al*, 1992). Assim, as carbonilas quantificadas são principalmente devido à oxidação de resíduos de amino ácidos como histidina, prolina, arginina, lisina e triptofano. Os radicais superóxido, induzidos pelo alumínio, podem gerar oxigênio singlete $^1O_2^*$, o qual colabora com os processos de oxidação. Na figura 50 encontra-se o principal produto da reação de oxidação do triptofano (Halliwell e Gutteridge, 1999).

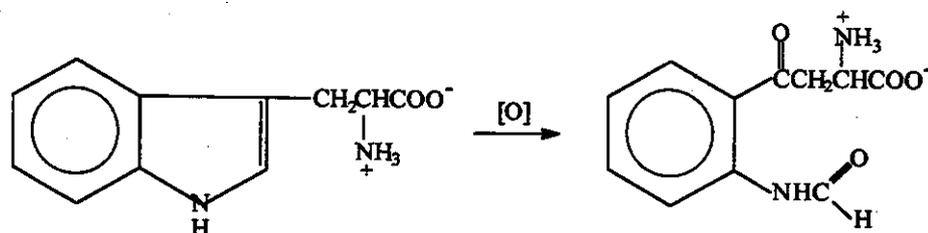


Figura 50: esquema da reação de oxidação do triptofano por oxigênio singlete.

Estudos mostraram que o tratamento de mielina e membranas sinápticas de rato com Al^{3+} por 90 minutos, além de aumentar a peroxidação de lipídeos, aumenta em 250% a quantidade de carbonilas associadas a proteínas (Verstraeten *et al*, 1997). Uma grande oxidação de proteínas foi observada na linhagem sensível S1587-17 entre 24 e 48 horas de tratamento (figura 45), oxidação essa resultado do estresse oxidativo induzido pelo alumínio e não controlado pelo sistema enzimático antioxidante. Essas oxidações podem atingir proteínas distribuídas por toda a célula, causando perda da atividade enzimática (Levine *et al*, 1981; Fucci *et al*, 1983), mudanças em superfícies hidrofóbicas

(Cervera e Levine, 1988) e modificações em espectros de absorção no ultravioleta (Rivett e Levine, 1990), que além de evidenciar mudanças químicas, podem indicar modificações estruturais nas proteínas e, conseqüentemente, perda da atividade funcional. Deste modo, a inibição do crescimento das raízes das plantas, observada somente algumas horas após o tratamento com alumínio, pode ser conseqüência da oxidação de proteínas nas células.

O fato da linhagem tolerante ao alumínio não apresentar variação na quantidade de carbonilas associadas às proteínas em nenhuma concentração (figura 43) após 48 horas e mesmo após 72 horas de tratamento com 36 μM de Al^{3+} (figura 45), indica que a oxidação de proteínas não é a via de degradação celular das espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas pelo tratamento. A não observação de oxidação das proteínas na linhagem tolerante pode significar também que as ERO são totalmente degradadas pelo sistema enzimático de proteção, que tem um pequeno aumento na sua atividade através das enzimas PX e SOD nos tratamentos com 36 e 60 μM de Al^{3+} . Além disso, o Cat 100-6 sofre uma diminuição do seu CRR após 12 horas de tratamento, mantendo seu crescimento em torno de 80 e 65 % nos tratamentos com 36 e 60 μM de alumínio (figura 18), indicando que a inibição do crescimento da raiz não está somente relacionado à oxidação de proteínas, mas possui outros mecanismos causadores.

5.8 – Apoptose

Diversos autores têm sugerido que o estresse oxidativo em plantas, principalmente através das espécies reativas de oxigênio H_2O_2 e O_2^- , pode desencadear morte celular programada (Buckner *et al*, 2000; Creissen *et al*, 1999). Uma grande quantidade de células em apoptose foi detectada no milho sensível em 48 horas de tratamento com 36 μM de Al^{3+} , enquanto pouquíssimas células apoptóticas foram encontradas no milho tolerante, que apresentou um perfil semelhante ao encontrado nas raízes dos tratamentos controle. Esse resultado indica, mais uma vez, que o íon Al^{3+} induz as células da raiz do milho sensível a um quadro de estresse oxidativo, não induzido no milho tolerante.

A foto da figura 47.a, correspondente ao milho tolerante, mostra somente alguns núcleos marrons na região da coifa, região mais externa da ponta da raiz. A presença desses núcleos é utilizada como controle positivo para a reação, já que normalmente se encontram núcleos apoptóticos nessa região.

A alta fragmentação cromatínica detectada no milho sensível através dos núcleos marrons poderia ser interpretada como resultado de um processo de necrose. Entretanto, o processo de necrose causa quebra do envelope nuclear e um quadro de destruição generalizado, o que não é observado na figura 47.b, resultado esse que reforça a hipótese de que a exposição ao alumínio induz um quadro de estresse oxidativo na linhagem de milho sensível, desencadeando o processo de morte celular programada. Além disso, a membrana nuclear também contém uma cadeia transportadora de elétrons, de função ainda não conhecida, que pode transferir elétrons e colaborar na formação de radicais superóxido. Esses radicais podem ter papel importante no estresse oxidativo e indução de apoptose devido sua proximidade ao núcleo (Halliwell e Gutteridge, 1999).

5.9 – O estresse oxidativo é causa ou consequência da toxidez do Al^{3+} ?

De forma geral, observou-se que o alumínio (Al^{3+}) induz de forma dose-dependente e tempo-dependente um quadro de estresse oxidativo no milho sensível S1587-17, mesmo em concentrações baixas de alumínio, como 6 e 12 μM , observado através da oxidação de proteínas que ocorreu apesar do aumento na atividade das enzimas antioxidantes. O aumento na atividade enzimática mostra que espécies reativas de oxigênio estão sendo geradas em quantidades maiores do que as normais no interior da célula. Apesar da tentativa de evitar um estresse aumentando a atividade das enzimas antioxidantes, esse aumento não foi o suficiente, já que se observou um aumento na quantidade de carbonilas como resultado da oxidação de proteínas e um grande aumento na quantidade de células apoptóticas.

O milho tolerante Cat100-6 não apresentou aumento na atividade enzimática até concentrações de 36 μM de Al^{3+} , aumento na oxidação de

proteínas ou aumento da frequência de células em apoptose, o que indica que ele possui um mecanismo de tolerância que começa atuar antes que o íon induza a produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio (ERO), evitando o estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo. Se o estresse oxidativo fosse a causa da toxidez, o mecanismo de defesa do tolerante seria o de ativar seu sistema antioxidativo após exposição ao íon, mas não é esse o perfil observado pelos experimentos realizados. Além disso, em concentrações fitotóxicas altas de alumínio, como 60 μM , na qual o CRR do Cat100-6 permanece em 0,65, não ocorre a indução de estresse oxidativo, pois apesar de ERO serem geradas, o que foi observado pelo pequeno aumento na atividade enzimática de SOD e PX, não ocorre oxidação de proteínas. Como o estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre formação de espécies oxidantes e sistema antioxidativo, causando um excesso de ERO e, conseqüentemente, danos à célula, o alumínio não induz um quadro de estresse oxidativo, já que o Cat100-6 consegue manter seu sistema equilibrado aumentando de forma eficiente a atividade do sistema antioxidativo.

Comparando-se as imagens obtidas após tratamento com 36 μM de alumínio com os resultados de oxidação de proteínas em função do tempo, observa-se que após 12 horas de exposição, intumescimento e rachaduras já são visíveis nas pontas das raízes do milho sensível, enquanto que a oxidação de proteínas só vai acontecer entre 24 e 48 horas. Se o estresse oxidativo fosse a causa da toxidez do alumínio, a oxidação de proteínas seria observada nas primeiras horas de tratamento, como são observados outros danos, como o intumescimento, rachadura e diminuição do crescimento da raiz.

Outra análise importante na discussão sobre causa e efeito da toxidez está relacionada com o tempo necessário para ativação de sistemas de defesa, quando comparados com sistemas já conhecidos, como a liberação de ânions de ácidos orgânicos. Delhaize *et al* (1993b) observaram que o tratamento de raízes de trigo com soluções contendo alumínio induzia a liberação de malato nos primeiros minutos de exposição. Esse resultado indica que o reconhecimento por parte das células do ápice da raiz de que o íon Al^{3+} está presente e a ativação de sistemas

de defesa é bastante rápida. Se o estresse oxidativo fosse causa da toxidez, a ativação do sistema de defesa antioxidante deveria ser rápida, para evitar danos às células. Entretanto, os resultados de atividade da SOD e PX indicam que a ativação desse sistema ocorre no período entre 24 e 48 horas.

A justificativa para essa ativação tardia poderia ser a de que o aumento da atividade das enzimas pode envolver ativação genética e síntese de proteínas, processos esses que levam tempo. Entretanto, como citado anteriormente, algumas publicações mostram que a liberação de ânions de ácidos orgânicos por algumas plantas, principalmente malato e citrato, torna-se detectável após 15 e 30 minutos de exposição (Delhaize *et al*, 1993b, Zheng *et al*, 1998, Ma *et al*, 2001). Entretanto, também é possível encontrar liberações mais lentas, que apresentam máximos após 4 horas de exposição (Ma *et al*, 1997) ou a liberação permanece constante por mais de 10 horas de exposição (Li *et al*, 2000). Ma *et al* (2001) sugere que existam dois tipos de liberação de ânions de ácidos orgânicos: 1) o Al^{3+} ativa, direta ou indiretamente, canais de ânions e os ânions de ácidos orgânicos presentes no citosol são liberados e 2) o Al^{3+} induz a transcrição de genes relacionados com proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos ou em seu transporte pela membrana plasmática. O primeiro modelo corresponde às liberações rápidas, após minutos de exposição, e o segundo modelo corresponde às liberações mais lentas, que no mínimo exigem algumas horas. Ou seja, mesmo um sistema de defesa que necessite de ativação genética e síntese de proteínas é ativado em questão de horas. A ativação do sistema de defesa antioxidante também pode envolver ativação genética e síntese de proteínas, mas ele ocorre somente após 24 horas de tratamento, um tempo bastante longo quando comparado com a liberação de ácidos orgânicos, o que indica, mais uma vez, que o estresse oxidativo gerado pelo alumínio não é causa da toxidez, mas somente uma consequência.

6. Conclusões

- ✓ O alumínio (Al^{3+}) induz estresse oxidativo somente na linhagem de milho sensível S1587-17 e esse estresse gerado não é causa, mas sim uma consequência da toxidez.
- ✓ Os estudos dose dependentes mostraram que o estresse oxidativo no milho sensível é maior conforme aumenta a concentração de alumínio a que as plantas foram expostas.
- ✓ Os estudos tempo dependentes, de forma geral, indicaram que o estresse oxidativo se estabelece entre 24 e 48 horas, já que tanto as enzimas quanto a oxidação de proteínas aumenta significativamente neste período na linhagem de milho sensível.
- ✓ O aumento na atividade das enzimas antioxidativas SOD e PX no milho sensível não foi suficiente para degradar as espécies reativas de oxigênio induzidas pelo tratamento com alumínio, já que foi possível um grande aumento na oxidação de proteínas.
- ✓ A degradação de água oxigenada nessas linhagens provavelmente é feita por peroxidases e não por catalases, já que somente a PX foi induzida nos tratamentos.
- ✓ A via de degradação celular das espécies reativas de oxigênio formadas em excesso no milho sensível é a oxidação de proteínas.
- ✓ A oxidação de proteínas não está relacionada com o início da diminuição do crescimento relativo da raiz, já que este ocorre nas primeiras horas de tratamento e a oxidação ocorre após 24 horas de tratamento.
- ✓ A diminuição do crescimento relativo da raiz e a perda da integridade da membrana, identificada pelas fotografias, não estão relacionados à peroxidação de lipídeos, já que esta não foi observada nas linhagens de milho.
- ✓ O estresse oxidativo gerado no milho sensível provoca morte celular programada (apoptose) nas células da ponta da raiz após 48 horas de tratamento.

7. Bibliografia

- Asada, K; Takahashi, M; Nagate, M (1974) *Assay and Inhibitors of Spinach Superoxide Dismutase*, *Agricultural Biological Chemistry* **38**: 471-473.
- Baccouch, S; Chaoui, A; El Ferjani, E (1998) *Nickel-Induced Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Zea mays Shoots*, *Plant Physiology* **36**: 689-694.
- Barros Neto, B; Scarminio, IS; Bruns, RE (1995) *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2ª Edição, Editora da Unicamp, Campinas: 32-34.
- Basu, U; Basu, A; Taylor, GJ (1994) *Differential Exudation of Polypeptides by Roots of Aluminum-Resistant and Aluminum-Sensitive Cultivars of Triticum aestivum L. in Response to Aluminum Stress*, *Plant Physiology* **106**: 151-158.
- Beauchamp, CO; Fridovich, I (1971) *Superoxide Dismutase: improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels*, *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287.
- Berger, NA (1991) *Oxidant-Induced Cytotoxicity: a Challenge for Metabolic Modulation*, *American Journal of Respiration Cell Molecular Biology* **4**: 1-3.
- Beyer, WF; Fridovich, I (1987) *Assaying for Superoxide Dismutase Activity: Some Large Consequences of Changes in Conditions*, *Analytical Biochemistry* **161**: 559-566.
- Bradford, MM (1976) *A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Briat, JF; Lebrun, M (1999) *Plant Responses to Metal Toxicity*, *Académie de Sciences de Paris* **322**: 43-54.
- Buckner, B; Johal, GS; Janick-Buckner, D (2000) *Cell Death in Maize*, *Physiologia Plantarum* **108**: 231-239.
- Bull, AW; Marnett, LJ (1985) *Determination of Malondialdehyde by Ion-Pairing High-Performance Liquid Chromatography*, *Analytical Biochemistry* **149**: 284-290.
- Cadenas, E; Boveris, A; Ragan, CI; Stoppani, AO (1977) *Production of Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide by NADH-Ubiquinone Reductase and Ubiquinol-Cytochrome C Reductase From Beef-Heart Mitochondria*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **180**: 248-257.

- Cakmak, I; Horst, WJ (1991) *Effect of Aluminium on Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Catalase, and Peroxidase Activities in root tips of soybean (Glycine max)*, *Physiologia Plantarum* **83**: 463-468.
- Cakmak, I; Strbac, D; Marschner, H (1993) *Activities of Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzymes in Germinating Wheat Seeds*, *Journal of Experimental Botany* **44**: 127-132.
- Caruso, R (1997) *Cerrado Brasileiro, Desenvolvimento, Preservação e Sustentabilidade*, 1ª Edição, CCD Editora Ltda, São Paulo: 20.
- Cervera, J; Levine, RL (1988) *Modulation of The Hydrophobicity of Glutamine Synthetase by Mixed-Function Oxidation*, *Faseb Journal* **2**:2591-2595.
- Chance, B; Maehly, AC (1955) *Assay of Catalases and Peroxidases*, *Methods in Enzymology* **2**: 764-775.
- Comba, ME; Benavides, MP; Tomaro, ML (1998) *Effect of Salt Stress on Antioxidant Defense System in Soybean Root Nodules*, *Australian Journal Plant Physiology* **25**: 665-671.
- Creissen, G; Firmin, J; Fryer, M; Kular, B; Leyland, N; Reynolds, H; Pastori, G; Wellburn, F; Baker, N; Wellburn, A; Mullineaux, P (1999) *Elevated Glutathione Biosynthetic Capacity in The Chloroplasts of Transgenic Tobacco Plants Paradoxically Causes Increased Oxidative Stress*, *The Plant Cell* **11**: 1277-1291.
- Degenhardt, J; Larsen, PB; Howell, SH; Kochian, LV (1998) *Aluminum Resistance in the Arabidopsis Mutant alr-104 is Caused by an Aluminum-Induced Increase in Rhizosphere pH*, *Plant Physiology* **117**: 19-27.
- Delhaize, E; Craig, S; Beaton, CD; Bennet, RJ; Jagadish, VC; Randall, PJ (1993a) *Aluminum Tolerance in Wheat (Triticum aestivum L.) I. Uptake and Distribution of Aluminum in Root Apices*, *Plant Physiology* **103**: 685-693.
- Delhaize, E; Ryan, PR; Randall, PJ (1993b) *Aluminum Tolerance in Wheat (Triticum aestivum L.) II. Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid From Root Apices*, *Plant Physiology* **103**: 695-702.
- Dixon, M; Webb, EC (1964) *Enzymes*, 1st Edition, Longmans Green and CO Ltda, London: 13-15.

- Elstner, EF (1991) *Oxygen-Radicals – Biochemical Bases for Their Efficacy*, *Klinical Wochenschr* **69**: 949-956.
- Esterbauer, H; Schaur, RJ; Zollner, H (1991) *Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes*, *Free Radical Biology & Medicine* **11**: 81-128.
- Flaschka, HA; Barnard Jr, AJ; Sturrock, PE (1969) *Quantitative Analytical Chemistry*, 1th Edition, Harper & Row Publishers, New York: 144, 233.
- Foy, CD; Chaney, RL; White, MC (1978) *The Physiology of Metal Toxicity in Plants*, *Annual Reviews Plant Physiology* **29**: 511-556.
- Fridovich, I (1989) *Superoxide Dismutases*, *Journal of Biological Chemistry* **264**: 7761-7764.
- Fucci, L; Oliver, CN; Coon, MJ; Stadtman, ER (1983) *Inactivation of Key Metabolic Enzymes by Mixed-Function Oxidation Reactions: Possible Implication in Protein Turnover and Ageing*, *Proceedings National of Academic Science* **80**: 1521-1525.
- Gallego, SM; Benavides, MP; Tomaro, ML (1996) *Effect of Heavy Metal Ion Excess on Sunflower Leaves: Evidence for Involvement of Oxidative Stress*, *Plant Science* **121**: 151-159.
- Giannopolitis, CN; Ries, SK (1977) *Superoxide Dismutases*, *Plant Physiology* **59**: 309-314.
- Gille, G; Sigler, K (1995) *Oxidative Stress and Living Cells*, *Folia Microbiology* **40**:131-152.
- González, A; Steffen, KL; Lynch, JP (1998) *Light and Excess Manganese – Implications for Oxidative Stress in Common Bean*, *Plant Physiology* **118**: 493-504.
- Gosset, DR; Banks, SW; Milhollon, EP; Cran Lucas, M (1996) *Antioxidant Response to NaCl Stress in a Control and an NaCl-Tolerant Cooton Cell Line Grown in the Presence of Paraquat, Buthionine Sulfoximine, and Exogenous Gluthatione*, *Plant Physiology* **112**: 803-809.
- Halliwell, B (1978) *Lignin Synthesis: The Generation of Hydrogen Peroxide and Superoxide by Horseradish Peroxidase and Its Stimulation by Manganese (II) and Phenols*, *Planta* **140**: 81-88.

- Halliwell, B; Gutteridge, JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition, Oxford Science Publications, New York: 31-33, 92-94.
- Harris, WR; Berthon, G; Day, JP; Exley, C; Flaten, TP; Forbes, WF; Kiss, T; Orvig, C; Zatta, PF (1996) *Speciation of Aluminum in Biological Systems*, Journal of Toxicology and Environmental Health **48**: 543-568.
- Hermes-Lima, M; Willmore, WG; Storey, KB (1995) *Quantification of Lipid Peroxidation in Tissue Extracts Based on Fe(III)Xylenol Orange Complex Formation*, Free Radical Biology & Medicine, **19**: 271-280.
- Hernandez, JA; Campillo, A; Jimenez, A; Alarcon, JJ; Sevilla, F (1999) *Response of Antioxidant Systems and Leaf Water Relations to NaCl Stress in Pea Plants*, New Phytology **141**: 241-251.
- Janero, DR (1990) *Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury*, Free Radical Biology & Medicine **9**: 515-540.
- Jones, DL; Gilroy, S; Larsen, PB; Howell, SH; Kochian, LV (1998a) *Effect of aluminum on cytoplasmic Ca²⁺ homeostasis in root hairs of Arabidopsis thaliana (L.)*, Planta **206**: 378-387.
- Jones, DL; Kochian, LV; Gilroy, S (1998b) *Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures*, Plant Physiology **116**: 81-89.
- Jorge, RA; Arruda, P (1997) *Aluminum-Induced Organic Acids Exudation by Roots of an Aluminum-Tolerant Tropical Maize*, Phytochemistry **45**: 675-681.
- Jorge, RA; Menossi, M; Arruda, P (2001) *Probing the role of calmodulin in Al toxicity in maize*, Phytochem, in press.
- Kinnunen, J; Merikanto, B (1955) *EDTA Titrations Using Zincon as Indicator*, Chemist Analyst **44**: 50.
- Kristian, T; Siesjo, BK (1998) *Calcium in Ischemic Cell Death*, Stroke **29**: 705-718.
- Lamb, C; Dixon, RA (1997) *The Oxidative Burst in Plant Disease Resistancel*, Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**: 251-275.
- Larsen, PB; Degenhardt, J; Tai, CY; Stenzler, LM; Howell, SH; Kochian, LV (1998) *Aluminum-Resistant Arabidopsis Mutants That Exhibit Altered Patterns of*

- Aluminum Accumulation and Organic Acid Release From Roots*, Plant Physiology **117**: 9-18.
- Lazof, DB; Goldsmith, JG; Ruffy, TW; Linton, RW (1994) *Rapid Uptake of Aluminium Into Cells of Soybean Root Tips*, Plant Physiology **106**: 1107-1114.
- Levine, RL; Oliver, CN; Fulks, RM; Stadtman, ER (1981) *Turnover of Bacterial Glutamine Synthetase: Oxidative Inactivation Precedes Proteolysis*, Proceedings National of Academic Science **78**: 2120-2124.
- Levine, RL; Garland, D; Oliver, CN; Amici, A; Climent, I; Lenz, AG; Ahn, BW; Shaltiel, S; Stadtman, ER (1990) *Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins*, Methods in Enzymology **186**: 464-478.
- Li, XF; Ma, JF; Matsumoto, H (2000) *Pattern of Al-Induced Secretion of Organic Acids Differs Between Rye and Wheat*, Plant Cell **11**: 1141-1151.
- Lima, ML; Copeland, L (1994) *The Effect of Aluminium on Respiration of Wheat Roots*, Physiologia Plantarum **90**: 51-58.
- Ma, JF; Zheng, SJ; Matsumoto, H (1997) *Specific Secretion of Citric Acid Induced by Al Stress in *Cassia tora* L.*, Plant Cell Physiology **38**: 1019-1025.
- Ma, JF; Ryan, PR; Delhaize, E (2001) *Aluminium Tolerance in Plants and the Complexing Role of Organic Acids*, Trends in Plant Science **6**: 273-278.
- MacDiarmid, CW; Garder, RC (1998) *Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* Magnesium Transport System Confers Resistance to Aluminum Ion*, The Journal of Biological Chemistry **273**: 1727-1732.
- Matsumoto, H; Morimura, S; Takarashi, E (1977) *Binding of Aluminium to DNA of DNP in Pea Root Nuclei*, Plant Cell Physiology **18**: 987-993.
- Matsumoto, H (2000) *Cell Biology of Aluminum Toxicity and Tolerance in Higher Plants*, International Review of Cytology **200**: 1-46.
- Mensen, R; Hager, A; Salzer, P (1998) *Elicitor-Induced Changes of Wall-Bound and Secreted Peroxidase Activities in Suspension-Cultured Spruce (*Picea Abies*) Cells Are Attenuated by Auxins*, Physiologia Plantarum **102**: 539-546.
- Moon, DH; Ottoboni, LMM; Souza, AP; Sibov, ST; Gaspar, M; Arruda, P (1997) *Somaclonal-Variation-Induced Aluminum-Sensitive Mutant From an Aluminum-Inbred Maize Tolerant Line*, Plant Cell Reports **16**: 686-691.

- Morimura, S; Matsumoto, H (1978) *Effect of Aluminium on some Properties and Template Activity of Purified Pea DNA*, *Plant Cell Physiology* **19**: 429-436.
- Parker, DR (1995) *Root Growth Analysis: An Underutilised Approach to Understanding Aluminium Rhizotoxicity*, *Plant and Soil* **171**: 151-157.
- Parker, DR; Norvell, WA; Chaney, RL (1995) *Geochem-PC: a chemical speciations program for IBM and compatible personal computers. Chemical equilibrium and reaction models*, Soil Science Society American Specific Publishing, Madison: 253-269.
- Pastori, GM; Trippi, VS (1992) *Oxidative Stress Induces High Rate of Glutathione Reductase Synthesis in a Drought-Resistant Maize Strain*, *Plant Cell Physiology* **33**: 957-961.
- Pellet, DM; Grunes, DL; Kochian, LV (1995) *Organic Acid Exudation as an Aluminum Tolerance Mechanism in Maize (Zea mays L.)*, *Planta* **196**: 788-795.
- Queiroz, CGS; Alonso, A; Mares-Guia, M; Magalhães, AC (1998) *Chilling-Induced Changes in Membrane Fluidity and Antioxidant Enzyme Activities in Coffea Arabica L. Roots*, *Biologia Plantarum* **41**: 403-413.
- Rao, KVM; Sresty, TVS (2000) *Antioxidative Parameters in The Seedlings of Pigeonpea (Cajanus cajan (L.) Millspaugh) in Response to Zn and Ni Stresses*, *Plant Science* **157**: 113-128.
- Rausser, WE (1987) *Changes in Glutathione Content of Maize Seedlings Exposed to Cadmium*, *Plant Science* **51**: 171-175.
- Reinheckel, T; Nedelev, B; Prause, J; Augustin, W; Schulz, HU; Lippert, H; Halangk, W (1998) *Occurrence of Oxidatively Modified Proteins: an Early Event in Experimental Acute Pancreatitis*, *Free Radical Biology & Medicine* **24**: 393-400.
- Reznick, AZ; Packer, L (1994) *Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay*, *Methods in Enzymology* **233**: 357-363.
- Richards, KD; Schott, EJ; Sharma, YK; Davis, KR; Gardner, RC (1998) *Aluminum Induces Oxidative Stress Genes in Arabidopsis Thaliana*, *Plant Physiology* **116**: 409-416.

- Rivett, AJ; Levine, RL (1990) *Metal-Catalysed Oxidation of Escherichia Coli Glutamine Synthetase: Correlation of Structural and Functional Changes*, Archives of Biochemistry and Biophysics **278**: 26-34.
- Rout, GR; Samantaray, S; Das, P (2001) *Aluminium Toxicity in Plants: a review*, Agronomie **21**: 3-21.
- Ryan, PR; Delhaize, E (2001) *Function and Mechanism of Organic Anion Exudation From Plant Roots*, Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology **52**:527-560.
- Ryter, SW; Tyrrell, RM (1998) *Singlet Molecular Oxygen ((1)O2): a Possible Effector of Eukariotic Gene Statement*, Free Radical Biology & Medicine **24**: 1520-1534.
- Salisbury, FB; Ross, CW (1992) *Plant Physiology*, 4th Edition, Wadsworth Publishing Company, California: 322.
- Sato, Y; Sugiyama, M; Takagi, T; Fukuda, H (1995) *Purification of Cationic Peroxidases Bound Ionizally to The Cell Walss From The Roots of Zinnia Elegans*, Journal of Plant Research **108**: 463-468.
- Schaedle, M; Bassham, JA (1977) *Chloroplast Glutathione Reductase*, Plant Physiology **59**: 1011-1012.
- Smith, IK; Vierheller, TL; Thorne, CA (1988) *Assay of Glutathione Reductase in Crude Tissue Homogenates Using 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid)*, Analytical Biochemistry **175**: 408-413.
- Somers, DJ; Briggs, KG; Gustafson, JP (1996) *Aluminum Stress and Protein Synthesis in Near Isogenic Lines of Triticum aestivum Differing in Aluminum Tolerance*, Physiologia Plantarum **97**: 694-700.
- Spragg, RG; Hinshaw, DB; Hyslop, PA; Schraufstatter, IU; Cochrane, CG (1985) *Alterations in Adenosine triphosphate and Energy Charge in Cultures Endothelial and P388D1 Cells After Oxidant Injury*, Journal Clinical Investigation **76**: 1471-1476.
- Squires, GL (1968) *Practical Physics*, 1^a Edition, Macmillan Publishing Company, New York: 398-401.

- Srere, PA; Brazil, H; Gonen, L (1963) *The Citrate Condensing Enzyme of Pigeon Breast Muscle and Moth Flight Muscle*, Acta Chemica Scandinavica **17**: S129-S134.
- Streitwieser, A; Heathcock, CH; Kosower, EM (1992) *Introduction to Organic Chemistry*, 4th Edition, Macmillan Publishing Company, New York: 398-401.
- Suhayda, CG; Haugh, A (1986) *Organic Acids Reduce Aluminum Toxicity in Maize Root Membranes*, Physiologia Plantarum **68**: 189-195.
- Taylor, GJ; Basu, A; Basu, U; Slaski, JJ; Zhang, G; Good, A (1997) *Al-induced, 51-kilodalton, Membrane-Bound Proteins are Associated with Resistance to Al in a Segregating Population of Wheat*, Plant Physiology **114**: 363-372.
- Taylor, GJ (1991) *Current Views of The Aluminum Stress Responses: The Physiological Basis of Tolerance*, Current Plant Biochemical Physiology **10**: 57-93.
- Tietze, F (1969) *Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues*, Analytical Biochemistry **27**: 502-522.
- Vercellotti, GM; Severson, SP; Duane, P; Moldow, CF (1991) *Hydrogen Peroxide Alters Signal Transduction in Human Endothelial Cells*, Journal Laboratory Clinical Medicine **117**: 15-24.
- Vercesi, AE; Kowaltowski, AJ; Grijalba, MT; Meinicke, AR; Castilho, RF (1997) *The Role of Reactive Oxigen Species in Mitochondrial Permeability Transition*, Bioscience Reports **17**: 43-52.
- Verstraeten, SV; Golub, MS; Keen, CL; Oteiza, PI (1997) *Myelin is a Preferential Target of Aluminum-Mediated Oxidative Damage*, Archives of Biochemistry and Biophysics **344**: 289-294.
- Yamamoto, Y; Kobayashi, Y; Matsumoto, H (2001) *Lipid Peroxidation Is an Early Symptom Triggered by Aluminum, But Not the Primary Cause of Elongation Inhibition in Pea Roots*, Plant Physiology **125**: 199-208.
- Zhang, J; Kirkham, MB (1996) *Enzymatic Responses of The Ascorbate-Glutathione Cycle to Drought in Sorghum and Sunflower Plants*, Plant Science **113**: 139-147.

- Zheng, SJ; Ma, JF; Matsumoto, H (1998) *Continuous Secretion of Organic Acid is Related to Aluminium Resistance During Relatively Long-Term Exposure to Aluminium Stress*, *Physiologia Plantarum* **103**: 209-214.
- Zielinski, H; Honke, J; Troszynska, A; Kozłowska, H (2000) *Reduced-Oxidized Glutathione Status as a Potencial Index of Oxidative Stress in Mature Cereal Grain*, *Cereal Chemistry* **76**: 944-948.