



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL AMAZÔNIA**

**PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES
EM FOLÍOLOS DE *Carapa guianensis* SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO *IN*
*VIVO e IN VITRO***

MÁRCIA MARIA BRAGA DA ROCHA

**BELÉM-PARÁ-BRASIL
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL AMAZÔNIA**

MÁRCIA MARIA BRAGA DA ROCHA

**PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES
EM FOLÍOLOS DE *Carapa guianensis* SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO *IN*
*VIVO e IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

**BELÉM-PARÁ-BRASIL
2010**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL AMAZÔNIA**

**PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES
EM FOLÍOLOS DE *Carapa guianensis* SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO *IN*
*VIVO e IN VITRO***

MÁRCIA MARIA BRAGA DA ROCHA

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

**Eng. Agrônomo, MSc., DSc., Prof. Hugo Alves Pinheiro
Presidente/Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia**

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

Ao meu Deus, pela sua graça que me foi dada em Jesus Cristo. Porque em tudo fomos enriquecidos Nele, em toda a palavra e em todo o conhecimento

À minha mãe, Celina Rocha, pelas orações e amor com que se doa de corpo e alma às filhas, buscando sempre o melhor para nós.

As minhas irmãs Sandra, Mônica e Sônia pelo amor que nos une

Aos meus sobrinhos lindos e inteligentes Rafael e Gustavo

Dedico

Ofereço

Ao meu querido pai Manoel Trindade da Rocha, "in memoriam", exemplo de fé, dedicação a todas nós e honestidade, que não media esforços para ajudar a todos quantos precisassem de sua ajuda.

Te amo pai.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia, meu ajudador, meu amigo, meu Mestre.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e a Coordenação de Pós-Graduação em Agronomia pela nova perspectiva de vida e oportunidade de aprendizado e crescimento.

A CAPES/REUNI, pela concessão de bolsa de estudo a qual possibilitou a realização do Mestrado

Ao meu orientador Dr. Hugo Alves Pinheiro pelos valiosos ensinamentos, apoio científico, compreensão e muita paciência ao longo do curso.

A secretária Gracy Monteiro por sua ajuda e disponibilidade em resolver as dúvidas relacionadas ao programa de pós-graduação.

Aos colegas do Curso de Mestrado pelo convívio, amizade e companheirismo (Anna Roffé, Andréia Saldanha, Patrícia Maia, Daniel Pinheiro, Augusto Pedroso, Erika Freire, Josemar, Shirley e Kaliene.

Aos estagiários e amigos Bruna S. Fujiana e Gledson Castro por sua dedicação em todas as etapas deste trabalho, pelos momentos de descontração, nas noites de pizza do CTA. “Os mutantes do CTA”; Tripé (Gledson), Três olhos (Bruna), Mãozinha (Marcos- MP). Obrigada pela amizade. Vocês foram demais! Ao Maurício pelas caronas tarde da noite do laboratório.

Ao colega de Curso de Mestrado Flávio Cruz pela amizade, pelos conhecimentos repassados, pelos conselhos, pela Judá, apesar de tão jovem tem uma experiência científica incrível.

À Profa. Rosa Santa Rosa e à Laboratorista Luciana Pinheiro, pela atenção e ensinamentos; obrigada pelas palavras de incentivo principalmente após as viradas da madrugada no laboratório.

Aos professores Dr. Reginaldo Alves Festucci Buselli, Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa e Osmar Lameira pela participação na banca de qualificação;

Ao casal Dra. Mônica T. A. de Gusmão e Dr. Antônio Sergio L. de Gusmão que me deram a oportunidade de conhecer a pesquisa, vocês são exemplo, graças a vocês eu pude chegar até aqui. Muito obrigada!

Aos amigos NADDiane Munhoz de Araújo (amiga top e famosa NADpH), Marcus Paulo Albuquerque (meu amigão desde a Iniciação Científica, amigo pra todas as horas, obrigada pelas palavras carinhosas nos momentos em que pensava em desistir.), Ana Claudia Barata (Claudinha obrigado pelos abraços reconfortantes e pelas palavras de incentivo). A todos vocês obrigada pelo apoio nos momentos mais difíceis ao longo da jornada acadêmica,

Aos membros da banca examinadora por aceitarem fazer parte desse trabalho dando sua colaboração.

A todas as pessoas que não foram mencionadas e que de alguma forma auxiliaram a evoluir nos meus estudos e na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Para que fique registrada minha gratidão, meu reconhecimento e o meu apreço por todos.

MUITO OBRIGADO!

***Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire
conhecimento. Provérbios 3:13***

SUMÁRIO

	P.
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	8
LISTA DE TABELA E FIGURA	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. Material vegetal e condições de crescimento	
2.2. Imposição de déficit hídrico <i>in vivo</i> e amostragens	
2.3. Imposição de déficit hídrico <i>in vitro</i> e amostragens	
2.4. Conteúdo relativo de água (CRA)	
2.5. Peroxidação de lipídios (MDA)	
2.6. Ensaios enzimáticos	
2.7. Análises estatísticas	
3. RESULTADOS	
4. DISCUSSÃO	
5. CONCLUSÃO	
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

LISTA DE SÍMBOLOS

ABS = absorvância

APX = peroxidase do ascorbato

ATP = adenosina trifosfato

CAT = catalase

CaCO₃ = carbonato de cálcio

CRA= conteúdo relativo de água

EAO = espécies ativas de oxigênio

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

MDA = aldeído malônico

MS= matéria seca

NBT = azul de nitrotetrazólio

O₂⁻ = radical superóxido

PEG= polietileno glicol

PVP = polivinilpirrolidona

SOD = dismutase do superóxido

TBA= ácido 2-tiobarbitúrico

TFK = tampão fosfato de potássio

Ψ_w = potencial hídrico

Ψ_{am} = potencial hídrico de antemanhã

LISTA DE FIGURAS

p.

Figura 1. Conteúdo relativo de água (CRA) em folíolos de *C. guianensis* sob deficiência hídrica *in vivo* e *in vitro*. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias do mesmo regime hídrico (Controle ou Déficit hídrico) obtidas em diferentes sistemas de indução do déficit hídrico (efeito do método de indução). Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dos tratamentos controle e déficit hídrico, comparadas dentro de um mesmo sistema de indução do déficit hídrico (efeito da condição hídrica). As comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$) e os dados representam a média de seis repetições \pm desvio padrão da média.

Figura 2. Concentração de aldeído malônico (MDA) em folíolos de *C. guianensis* sob deficiência hídrica *in vivo* e *in vitro*. Estatística como na Figura 1.

Figura 3. Atividade de enzimas antioxidantes em folíolos de *C. guianensis* sob deficiência hídrica *in vivo* e *in vitro*. Estatística como na Figura 1. A sigla nd indica atividade enzimática não detectada.

RESUMO

Para validar a aplicação do método *in vitro* na indução déficit hídrico em plantas de *C. guianensis* para utilização em experimentos futuros relacionados às repostas oxidativas, foi examinado o conteúdo relativo de água (CRA), conteúdo de aldeído malônico (MDA), atividade das enzimas antioxidativas, Superóxido Dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), Catalase (CAT; EC 1.11.1.11) e Ascorbato Peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) em comparação ao método tradicional de indução de déficit hídrico, o método *in vivo*. No método *in vivo* as plantas foram permanentemente irrigadas (controle) e outras plantas foram submetidas à suspensão completa da irrigação, cujo déficit hídrico se desenvolveu naturalmente em função do esgotamento da água remanescente no solo. A indução de déficit hídrico no método *in vitro* foi aplicado em discos foliares que foram coletados de plantas plenamente irrigadas, estes foram imersos imediatamente em TRIS-HCl (pH 7,6), na ausência (Controle) e presença de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) para obtenção de um potencial osmótico equivalente a -1,5 MPa (Déficit hídrico). O experimento foi conduzido em casa de vegetação e em laboratório da Universidade Federal Rural da Amazônia, em Belém-PA. Para a imposição do déficit hídrico *in vivo* as plantas foram divididas em dois grupos (tratamentos): (i) plantas permanentemente irrigadas e (ii) plantas submetidas à suspensão completa da irrigação, cujo déficit hídrico se desenvolveu naturalmente em função do esgotamento da água remanescente no solo. Para o *in vitro*, discos foliares foram coletados de plantas plenamente irrigadas e estes foram imersos imediatamente em em solução de TRIS-HCl (pH 7,6), na ausência (Controle) e presença de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) para obtenção de um potencial osmótico equivalente a -1,5 MPa (Déficit hídrico). Uma bateria de discos foi utilizada para a determinação do CRA, MDA, SOD, CAT e APX. A redução do CRA foi maior no método *in vivo* que no método *in vitro* (Figura 1), embora o déficit hídrico induzido pelo PEG 6000 no método *in vitro* ocasionou a redução de 12,2% no CRA em comparação ao controle, sendo essa diferença significativa. O déficit hídrico promoveu incrementos significativos nos teores de MDA quando os tratamentos foram comparados no mesmo método. Os tratamentos do método *in vitro* apresentaram maior atividade significativa de SOD comparado com os tratamentos do método *in vivo* analisado. No método *in vivo* não foi observada diferença significativa na atividade de SOD entre seus tratamentos (controle *vs.* déficit hídrico), assim como, no método *in vitro* não houve também diferença entre seus tratamentos. Neste trabalho observa-se um aumento na atividade de SOD no método *in vitro* em comparação ao *in vivo* enquanto que a atividade de APX e CAT são detectadas no *in vivo* e não detectadas no *in*

vitro, portanto, a resposta observada *in vitro* não foi equivalente a resposta *in vivo* para conteúdo de aldeído malônico e enzimas antioxidantes.

Palavras-chave: Polietilenoglicol 6000, Superóxido Dismutase, Estresse oxidativo, conteúdo relativo de água, Catalase, Danos celulares

ABSTRACT

To validate the method *in vitro* to induce water deficit in plants of *C. guianensis* for use in future experiments related to oxidative responses looked at the relative water content (RWC), content of malondialdehyde (MDA), activity of antioxidant enzymes, Superoxide Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), Catalase (CAT; EC 1.11.1.11) and ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) in comparison to the traditional method of induction of water stress, *in vivo* method. In the *in vivo* method, the plants were continuously irrigated (control) and other plants were subjected to full suspension of irrigation, water deficit which developed naturally due to the depletion of water remaining in the soil. The induction of water deficit in the *in vitro* method was applied to leaf discs were collected from plants fully irrigated, they were immediately immersed in Tris-HCl (pH 7.6) in the absence (Control) and presence polyethylene glycol 6000 (PEG-6000) to obtain an osmotic potential equivalent to -1.5 MPa (water deficit). The experiment was conducted in greenhouse and laboratory of the Federal Rural University of Amazonia, Belém-PA. For the imposition of water deficit *in vivo* plants were divided into two groups (treatments): (i) permanently irrigated plants and (ii) plants submitted to full suspension of irrigation, water deficit which developed naturally due to the depletion of the remaining water in soil. For the *in vitro* leaf discs were collected from plants fully irrigated and they were immediately immersed in TRIS-HCl (pH 7.6) in the absence (Control) and presence of polyethylene glycol 6000 (PEG-6000) to obtain an osmotic potential equivalent to -1.5 MPa (water deficit). A battery of discs was used for determining the CRA, MDA, SOD, CAT and APX. The reduction in RWC was higher in the *in vivo* method for *in vitro* assays (Figure 1), although the water deficit induced by PEG 6000 on *in vitro* caused a reduction of 12.2% in the CRA compared to control, and this difference significant. The water stress caused significant increases in levels of MDA when the treatments were compared in the same method. The treatments of the *in vitro* method showed significant higher activity of SOD compared with treatments *in vivo* method of analysis. In the *in vivo* method was not significant difference in SOD activity between their treatments (control vs. déficit water), as well as for *in vitro* assays also no difference between their treatments. In this work there is an increase in SOD activity in *in vitro* compared to *in vivo* while the activity of APX and CAT are detected *in vivo* and *in vitro* were not detected, so the response observed *in vitro* was not equal the *in vivo* response to malondialdehyde content and antioxidant enzymes.

Keywords: Polyethylene glycol 6000, Superoxide dismutase, oxidative stress, relative water content, Catalase, cellular damage.

1. INTRODUÇÃO

As espécies florestais predominantes na Amazônia representam uma fonte importante de recursos naturais para as populações tradicionais e para o desenvolvimento da região. Assim, vários produtos não-madeireiros (alimentos, fibras, artesanatos, resinas, medicinais e plantas ornamentais) são explorados extrativamente (SCARCELLO et al., 1999).

No entanto, grande parte das florestas tropicais vem sofrendo uma exploração predatória provocada pelas atividades do homem, que transforma e fragmenta grandes áreas naturais em pequenas manchas de florestas. Essa exploração predatória, aliada a inexistência de informações sobre o comportamento ecológico e biológico de espécies vegetais e animais, tem ameaçado muitas espécies de extinção. Por outro lado, muitos esforços têm sido alocados em estudos sobre a dinâmica florestal na zona tropical visando fornecer dados e tecnologias que possibilitem um manejo equilibrado e sustentável dos recursos florestais, de forma a garantir que os mesmos estejam disponíveis para futuras gerações (OLIVEIRA, 1997).

A *Carapa guianensis* (Aubl.), espécie lenhosa pertencente à família Meliaceae, popularmente conhecida como andiroba, enquadra-se no contexto de espécie típica da flora amazônica explorada extrativamente. Sua importância econômica deve-se às excelentes propriedades medicinais e cosméticas do óleo extraído de suas sementes, aplicado comumente na manufatura de xampus, sabonetes e repelentes.

O óleo de andiroba atua na pele, regenerando e estimulando o tecido epitelial, e apresenta efeito positivo sobre os tecidos inflamados. Funciona como febrífugo, vermífugo, purgativo, vesicante, cicatrizante, emoliente, anti-séptico, hidratante e suavizante (LEITE, 1997; FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002). Como fitocosmético é usado na formulação de cremes e hidratantes, xampus, condicionadores, loções e géis, o que permite avaliar a importância econômico-social desta espécie (BOUFLEUER, 2004).

Segundo Leite (1997), *C. guianensis* apresenta uma alta plasticidade fenotípica no tamanho das suas folhas, frutos, sementes e na qualidade do óleo extraído das sementes. Essa plasticidade depende principalmente das condições ambientais onde a espécie se encontra. Talvez, por esse motivo, a sua frutificação varie entre as regiões de ocorrência, podendo variar até mesmo entre indivíduos dentro de uma mesma população (EMBRAPA, 2004)

Dada a escassez de plantios comerciais de andiroba, a exploração de sementes para produção de óleo tem sido realizada quase que exclusivamente de forma extrativista. Embora esta prática seja muito intensa, não há garantia de oferta em quantidade e qualidade do produto, limitando a geração de renda ao produtor e de matéria prima para o mercado. Percebe-se, dessa forma, a necessidade de se introduzir novas técnicas de cultivo que

permitam a domesticação da espécie e, com isso, gerar tecnologias para o desenvolvimento de plantios comerciais da mesma (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002).

Uma vez que a espécie não foi ainda domesticada, materiais genéticos que reúnam características silviculturais desejáveis não estão disponíveis no mercado. Para a obtenção de materiais promissores é importante levar em conta os aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfoanatômicos da planta como um todo durante seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Estes permitirão entender como a planta responde aos diferentes habitats, condições climáticas (períodos chuvoso e seco), técnicas de manejo, etc. (MORAES, 2010).

Na região Amazônica, o clima predominante é do tipo Afi, segundo a classificação de Köppen. Este é caracterizado pela abundância de chuvas durante todo o ano (acima de 2.500 mm anuais) e, no mês de menor precipitação, as chuvas alcançam em torno de 60 mm (BASTOS et al., 1986). Devido à irregular distribuição de chuvas dentre épocas chuvosa e seca, tem-se constatado que nesta última a evapotranspiração geralmente excede as médias das precipitações, caracterizando uma condição de deficiência hídrica limitante ao crescimento e desenvolvimento das plantas (KRAMER; BOYER, 1995).

A deficiência hídrica, no solo e na atmosfera, juntamente com alta temperatura e radiação tem sido citada como uma das principais restrições à sobrevivência e produtividade das espécies agrônômicas e florestais (FLEXAS et al., 2002). Então, o entendimento dos efeitos da deficiência hídrica nas plantas é vital para a melhoria de práticas de manejo e melhoramento agrícola e florestal (CHAVES et al., 2003).

Sob condições de seca, a principal mudança adaptativa temporária que previne maior perda de água pelas plantas é o fechamento dos estômatos das folhas. Porém, com o fechamento estomático pode ocorrer uma diminuição na entrada de CO₂ na folha, resultando na redução da taxa fotossintética (LAWLOR; UPRETY, 1993). Em virtude da diminuição na atividade do ciclo de Calvin, um excesso de energia fotoquímica não é dissipado. Sob condições de alta luminosidade, o desequilíbrio entre o transporte de elétrons e as taxas de fixação de CO₂ pode resultar na produção de espécies ativas de oxigênio (EAO), os quais podem causar danos irreversíveis nas células (STEFFEN, 1991; BAISAK et al., 1994).

As EAO podem ser referidas como radicais livres os quais são definidos como moléculas ou fragmentos moleculares que possuem um elétron não pareado. Desta forma, um radical livre tem a capacidade de subtrair um elétron de uma molécula próxima a ele, o que causa a formação de outro radical livre, provocando assim uma reação em cadeia (SLATER, 1984). Os radicais livres podem ser formados através da absorção de radiação ionizante, UV, visível ou térmica; ou por reações redox como reações de transferência de elétrons não

enzimáticas, reações catalisadas por metais ou processos catalisados por enzimas. Esses radicais, geralmente são do tipo oxirradicais e são altamente tóxicos e o estresse oxidativo resultante de sua ação é um fenômeno muito comum nos sistemas biológicos (MONK et al., 1989). O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}), os quais em conjunto com o oxigênio singlete (1O_2), constituem as formas biológicas mais importantes de EAO.

As EAO são extremamente citotóxicas para todos os organismos, pois inativam enzimas e provocam importantes danos às células. São também responsáveis pelo início da peroxidação de lipídios e produzem radicais peroxilipídios e hidroperoxilipídios, que por sua vez são também muito reativos. A peroxidação dos lipídios da plasmalema provoca perda de eletrólitos e outros componentes celulares, rápida dessecação e morte celular (BENSON, 1990). Radicais hidroxil podem causar danos a todas as classes de macromoléculas biologicamente importantes, especialmente aos ácidos nucleicos.

Estudos extensivos com sistemas modelos, e com materiais biológicos *in vitro*, têm mostrado claramente que as EAO são capazes de produzir modificações químicas e danos em proteínas, lipídeos, carboidratos e nucleotídeos. Por isso, se as EAO são produzidas *in vivo*, ou em células *in vitro*, em concentrações suficientes que superem os mecanismos protetores normalmente eficientes, pode-se esperar que ocorram distúrbios metabólicos e celulares de vários tipos (SLATER, 1984).

As plantas têm um sistema de defesa bem desenvolvido contra as EAO, tanto limitando sua formação quanto instituindo sua remoção (ALSCHER et al., 2002). Esse sistema consiste de uma complexa gama de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que atuam protegendo as células dos danos oxidativos (VRANOVÁ et al., 2002). Enzimas como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase (POX), a peroxidase do ascorbato (APX) e a redutase da glutathiona (GR) e os antioxidantes não-enzimáticos como o tocoferol, o ácido ascórbico e a glutathiona trabalham em conjunto para regular as concentrações celulares de EAO (HUNG et al., 2005).

A SOD (EC 1.15.1.1) dismuta o $O_2^{\bullet-}$ formando H_2O_2 (MIZUNO et al., 1998). Dentro de uma célula, essa enzima constitui a primeira linha de defesa contra as EAO sendo, portanto, crucial que esteja presente e ativa para a remoção do $O_2^{\bullet-}$ nos compartimentos onde ele é formado (ALSCHER et al., 2002). Segundo Mizuno et al. (1998), as plantas possuem diferentes isoformas de SOD, que estão localizadas em diversos compartimentos celulares. Dependendo do cofator utilizado pela enzima, as SOD são classificadas em três grupos: FeSOD (cloroplastos); MnSOD (mitocôndrias e peroxissomos); e Cu/ZnSOD (cloroplastos,

citossol e possivelmente no espaço extracelular) (BOWLER et al., 1992; ALSCHER et al., 2002). De acordo com Konieczny et al. (2008), as diferentes isoformas da SOD são as principais seqüestradoras de $O_2^{\bullet-}$, enquanto a remoção do excesso de H_2O_2 da célula é realizada pela APX e CAT. A SOD reage com radicais superóxido para produzir H_2O_2 . Como a ação da SOD resulta na formação de H_2O_2 , essa enzima está intimamente ligada ao ciclo ascorbato-glutationa. Assim, a SOD age paralelamente às outras enzimas e antioxidantes.

Em plantas, a CAT (EC 1.11.1.6) é encontrada predominantemente nos peroxissomos, onde atua na remoção do H_2O_2 formado durante a fotorespiração (BOWLER et al. 1992). Essa enzima apresenta baixa ou nenhuma atividade no citossol, na mitocôndria e nos cloroplastos (MIZUNO et al., 1998). Apesar da sua localização restrita, a CAT pode ter um papel significativo na defesa contra o estresse oxidativo, removendo o H_2O_2 de outros compartimentos subcelulares que não os peroxissomos, pois o H_2O_2 pode facilmente se difundir pelas membranas (BOWLER et al. 1992; WILLEKENS et al., 1997).

A CAT não utiliza poder redutor para sua atividade e possui menor afinidade pelo H_2O_2 do que a APX (INZÉ; VAN MONTAGU, 1995; WILLEKENS et al., 1997). A APX necessita de ascorbato como poder redutor e possui uma maior afinidade pelo H_2O_2 , permitindo o seqüestro de pequenas quantidades dessa EAO em locais mais específicos (WILLEKENS et al., 1997). Segundo Mittler (2002), a diferença de afinidade da APX e da CAT pelo H_2O_2 sugere que elas pertençam a duas classes distintas de enzimas seqüestradoras de EAO: a APX deve ser responsável pela modulação fina de EAO visando sinalização celular e a CAT deve ser responsável pela remoção do excesso de EAO durante o estresse.

Recentemente, Costa et al. (2010) demonstraram que plantas jovens de *C. guianensis* submetidas ao déficit hídrico apresentaram danos celulares (peroxidação de lipídeos) após 15 dias da suspensão da irrigação, quando o potencial hídrico de antemanhã (Ψ_{am}) foi aproximadamente -1,5 MPa. Nesse caso, a ocorrência de danos oxidativos nas plantas estressadas foi associada à manutenção das atividades da SOD, CAT e APX nos mesmos patamares das plantas controle. Entretanto, os mesmos autores demonstraram que quando o déficit hídrico se prolongou (27 dias após a suspensão da irrigação e $\Psi_{am} = -3,0$ MPa), os danos foram controlados devido a manutenção da atividade da SOD e aumento das atividades da CAT e APX. Aparentemente, existe uma ativação diferencial do sistema de defesa celular nessa espécie em função do progresso da seca.

Segundo Sgherri et al. (2000), as respostas das plantas à fatores ambientais de estresse, dentre eles à seca, dependem de vários fatores, tais como: a espécie em estudo, o

genótipo (variedade ou cultivar), o tecido vegetal em análise, a idade da planta ou tecido, a duração e intensidade do estresse.

Sabendo-se que as folhas de andiroba são compostas e seus folíolos apresentam consideráveis mudanças na coloração e taxa de assimilação líquida do carbono (A) até atingir a maturidade (MORAES, 2010), pode-se sugerir que a ocorrência de danos celulares seja diferentemente pronunciada em função da idade do tecido (folíolo).

Segundo Moraes (2010), a transição de coloração do limbo de *C. guianensis* durante a fase inicial de expansão é muito rápida, durando cerca de 30 dias, e esta transição é acompanhada por aumentos significantes na A . Isto impossibilitaria determinar, *in vivo*, a magnitude dos danos oxidativos em resposta ao déficit hídrico e à idade do folíolo simultaneamente, pois nesse tipo de experimento o déficit hídrico é simulado pelo esgotamento progressivo da água do solo, o que em plantas de *C. guianensis* cultivadas em vaso leva em torno de 30 dias para que o potencial hídrico de antemanhã reduza de $-0,5$ MPa à $-3,2$ MPa (COSTA et al., 2010).

Assim, estudar os efeitos do déficit hídrico de acordo com a idade do folíolo em um sistema *in vivo* fica limitado em função das transições na expansão foliar durante o desenvolvimento do estresse. Contudo, esta limitação pode ser contornada utilizando-se experimentos que simulem o déficit hídrico *in vitro*, por meio da imersão de discos foliares em polietilenoglicol (PEG 6000), como previamente demonstrado em *Solanum tuberosum* (MARTINEZ et al., 2001).

Sabe-se, no entanto, que a metodologia *in vitro* nem sempre induz respostas condizentes àquelas observadas em sistemas *in vivo* (plantas em casa de vegetação ou campo), em razão do déficit hídrico *in vitro* ser imposto de maneira rápida (geralmente 24 h de imersão em polietilenoglicol, PEG) em um fragmento de tecido, o que muitas vezes limita a capacidade de resposta que se espera. Portanto, antes de utilizar deliberadamente a metodologia de indução do déficit hídrico *in vitro* para estudos de fisiologia e bioquímica de plantas, é preciso validá-la para que os resultados obtidos não sejam mal interpretados e que conclusões erradas não sejam obtidas.

Do exposto, o objetivo deste trabalho foi comparar a magnitude da peroxidação de lipídeos e atividade de enzimas antioxidantes em plantas de *C. guianensis* submetidas ao déficit hídrico *in vivo* e *in vitro* (com uso do PEG), visando validar a aplicação deste último para utilização em experimentos futuros relacionados às repostas oxidativas nesta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) foram coletadas de matrizes no campus da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), no mês de janeiro de 2010. As sementes foram embebidas em água por 24 h e semeadas em vasos de polietileno de 30 L, preenchidos com 16 kg de um latossolo amarelo, textura média, previamente seco ao ar e peneirado (malha de 4") para a retirada de impurezas, sendo três sementes por vaso. Posteriormente, foi realizado um desbaste das plântulas menos vigorosas, deixando apenas uma plântula por vaso. As plântulas para o experimento foram selecionadas com base na sua uniformidade com relação à altura e diâmetro do caule e quanto ao número de folhas e folíolos. Foi realizada a análise de solo e não houve necessidade de adubação complementar.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal Rural da Amazônia, em Belém-PA (01°28'03"S, 48°29'18"W, onde durante todo o período experimental as plantas foram irrigadas diariamente com a finalidade de manter o solo próximo a capacidade de campo. O controle das ervas daninhas foi realizado manualmente.

2.2. Imposição do déficit hídrico *in vivo*, avaliação do status hídrico e amostragens

Quando as plantas apresentaram quatro meses de idade, as mesmas foram divididas em dois grupos (tratamentos): (i) plantas permanentemente irrigadas e (ii) plantas submetidas à suspensão completa da irrigação, cujo déficit hídrico se desenvolveu naturalmente em função do esgotamento da água remanescente no solo.

As avaliações foram realizadas após 20 dias da diferenciação dos tratamentos, visto que este tempo seria suficiente para promover a redução potencial hídrico de antemanhã (Ψ_{am}) para valores em torno de -2,0 MPa (COSTA et al., 2010).

O Ψ_{am} foi determinado como indicativo do déficit hídrico do solo e da planta. Para isto, folíolos maduros foram coletados da terceira ou quarta folha a partir do ápice e imediatamente levados ao laboratório, em sacos de polietileno umedecidos e sob gelo. Esta avaliação foi realizada entre 04:30 e 05:30 h. Paralelamente, amostra de folíolos foram coletadas para a determinação do conteúdo relativo de água (CRA).

No mesmo dia, entre 11 e 13 h, foram coletadas amostras de folíolos para a avaliação de aldeído malônico (MDA) e das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX). Como

amostras, discos de folíolos maduros foram coletados da terceira ou quarta folha a partir do ápice e imediatamente congelados a -20°C.

2.3. Imposição do déficit hídrico *in vitro*, avaliação do status hídrico e amostragens

Foi realizada conforme descrito em Martinez et al. (2001) com algumas modificações. Os discos foliares foram coletados de plantas plenamente irrigadas e estes foram imersos imediatamente em 10 ml de 50 mM de TRIS-HCl (pH 7,6), na ausência (Controle) e presença de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) para obtenção de um potencial osmótico equivalente a -1,5 MPa (Déficit hídrico). Os tubos contendo as amostras foram mantidos em laboratório, sob luz fluorescente indireta, a 25° C. Após 24 horas de incubação, uma bateria de discos foi utilizada para a determinação do CRA, enquanto o restante dos discos foram congelados para as análises posteriores (MDA, SOD, CAT e APX).

2.4. Conteúdo relativo de água

Para o método *in vivo* foram retirados 10 discos foliares (1,5 cm de diâmetro) de cada tratamento (controle e déficit hídrico), determinando-se imediatamente a massa fresca dos mesmos (MF) em balança analítica. Os discos foram transferidos para microtubos (eppendorfs) contendo 2 mL de água destilada por um período de 24 h. Em seguida, os mesmos foram rapidamente secos em papel absorvente para retirada da água superficial seguindo-se da determinação de sua massa túrgida (MT). Os discos foram então colocados em sacos de papel e levados à estufa de ventilação forçada (75° C) para secagem até massa constante para a determinação de sua massa seca (MS). O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado segundo Slavick (1979).

Para o método *in vitro* foram utilizados 10 discos foliares (1,5 cm de diâmetro) de cada tratamento (controle e déficit hídrico) logo após o período de incubação. Os discos foram lavados brevemente com água destilada para a retirada de resíduos de PEG-6000 ou solução tampão. Em seguida, os discos foram rapidamente secos em papel filtro e imediatamente pesados para determinação de sua massa fresca (MF). As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa de ventilação forçada (75° C) para secagem até massa constante, seguindo-se da determinação de sua massa seca (MS). O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado segundo Slavick (1979). Para os discos imersos em PEG -6000, foi utilizado como massa túrgida a média obtida para os discos do tratamento controle.

2.5. Peroxidação de lipídios

Foi determinada estimando-se o teor de substâncias reativas ao ácido-2-tiobarbitúrico (TBA) em equivalentes de aldeído malônico (MDA), conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). A extração foi realizada pela homogeneização dos discos foliares (cinco discos de 1,5 cm de diâmetro cada) em 3 mL de ácido tricloroacético 0,1% (p/v) e o homogenato foi centrifugado a 15.000 g, por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a uma alíquota de 500 µL deste foi adicionado 1,5 mL de TBA 0,5% (preparado em ácido tricloroacético 20%). Os tubos foram fortemente agitados e incubados a 90°C, por 20 min. A reação foi paralisada em banho de gelo e a mistura clarificada por centrifugação a 13.000 x g, por 8 min a 4°C. Em seguida, a absorbância (*ABS*) da amostra foi registrada a 532 nm em um espectrofotômetro (Genesys™10series, Thermo Electron Co, Wisconsin, USA) e a *ABS* inespecífica (a 600 nm) foi subtraída. O coeficiente de extinção molar do MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi utilizado para os cálculos e os resultados foram expressos em nmol MDA g^{-1} de matéria seca (MS).

2.6. Ensaio enzimáticos

A extração da dismutase do superóxido (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi realizada a partir de quatro discos foliares (1,5 cm de diâmetro cada) homogeneizados em 3 mL de 100 mM de tampão fosfato de potássio (TFK; pH 7,8); 0,1 mM de EDTA; 0,1% (v/v) de 2-Mercaptoetanol; 0,1% (v/v) de Triton X-100; 30 mg de Polivinilpirrolidona (PVP) e 20 mM de ascorbato. Após centrifugação a 15.000 x g, por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado para as análises posteriores.

A atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada segundo Giannopolitis e Ries (1977), modificado como descrito por Costa et al. (2010). O meio de reação foi constituído de 52,5 mM de TFK (pH 7,8); 0,1 µM de EDTA; 13 mM de metionina (pH 7,8); 2 µM de riboflavina; 0,075 mM de azul de nitrotetrazólio (NBT) e uma alíquota de 15 µL do extrato enzimático. Os resultados foram expressos em unidades de SOD mg^{-1} proteína, considerando-se que 1 unidade de SOD é a quantidade de enzima requerida capaz de reduzir em 50% a produção de formazana azul.

A peroxidase do ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11) foi extraída a partir de quatro discos foliares (1,5 cm de diâmetro cada) para cada 3 mL de TFK 50 mM (pH 7,0); acrescido de 2 mM de EDTA; 0,1% (v/v) de Triton X-100; 0,1% (v/v) de 2-Mercaptoetanol; 20 mM de ascorbato e 30 mg de PVP. Após centrifugação a 15.000 x g, por 15 min a 4°C, o

sobrenadante foi coletado e uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático foi utilizada na reação. O meio de reação foi constituído de TFK 50 mM (pH 7,0); 0,1 mM de H_2O_2 ; 0,5 mM de ascorbato e a atividade da APX calculada com base na taxa de consumo do ascorbato avaliada em espectrofotômetro a uma *ABS* de 290 nm (NAKANO; ASADA, 1981). Foi considerado para os cálculos que 1 unidade de APX é a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de ascorbato min^{-1} .

A catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) foi extraída pela homogeneização das amostras em meio de extração contendo TFK 100 mM (pH 7,0), 2 mM de EDTA; 0,1% (v/v) de Triton X-100; 0,1% (V/V) de 2-Mercaptoetanol; 20 mM de ascorbato; 30 mg de PVP. O homogenato foi centrifugado a 15.000 x *g*, por 15 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da enzima. O meio de reação (3 mL) foi composto de TFK 50 mM (pH 7,0) e H_2O_2 12,5 mM; e a reação foi iniciada pela adição de 30 μL de extrato. A atividade da CAT foi determinada pelo monitoramento do decréscimo da *ABS* a 240 nm (HAVIR; McHALE, 1987) e para os cálculos foi considerado que uma unidade de APX é a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de H_2O_2 min^{-1} .

Após a determinação das atividades enzimáticas, os extratos foram congelados para a dosagem de proteínas, realizada segundo o método de Bradford (1976). O resultado desta quantificação foi utilizado nos cálculos das atividades enzimáticas.

2.7. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância, não havendo necessidade de transformação dos mesmos. As diferenças estatísticas entre médias foram averiguadas pelo teste de Newman Keuls ($P < 0,05$), levando-se em conta o esquema fatorial 2 x 2 (dois métodos de imposição do déficit hídrico x duas condições hídricas).

3. RESULTADOS

3.1. Conteúdo relativo de água e aldeído malônico

Os resultados obtidos para CRA e MDA nos dois métodos avaliados não se mostraram análogos. A redução do CRA foi maior no método *in vivo* que no método *in vitro* (Figura 1), embora o déficit hídrico induzido pelo PEG 6000 no método *in vitro* ocasionou a redução de 12,2% no CRA em comparação ao controle, sendo essa diferença significativa.

A peroxidação lipídica medida como conteúdo de MDA, é dado na Fig. 2. Em cada um dos métodos, no nível de MDA, dá-se alteração. As maiores alterações são observadas no método *in vivo* que sofreu também as maiores reduções de CRA, ainda que, tenha havido redução no CRA no método *in vivo* não ocorreu aumento nos teores de MDA, ou seja, não ocorreram danos intensos aos lipídios de membranas, embora fique evidente que o déficit hídrico promoveu incrementos significativos nos teores de MDA quando os tratamentos foram comparados no mesmo método. Nesse caso, a alteração no conteúdo de MDA do método *in vitro* não foi alcançada.

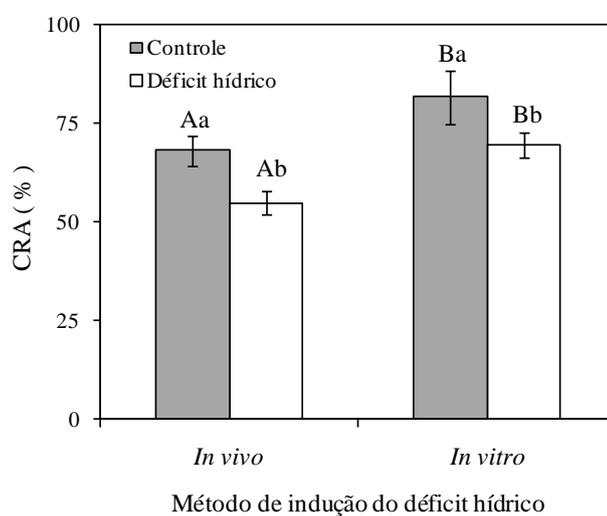


Figura 1. Conteúdo relativo de água (CRA) em folíolos de *C. guianensis* sob deficiência hídrica *in vivo* e *in vitro*. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias do mesmo regime hídrico (Controle ou Déficit hídrico) obtidas em diferentes sistemas de indução do déficit hídrico (efeito do método de indução). Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dos tratamentos controle e déficit hídrico, comparadas dentro de um mesmo sistema de indução do déficit hídrico (efeito da condição hídrica). As comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$) e os dados representam a média de seis repetições \pm desvio padrão da média.

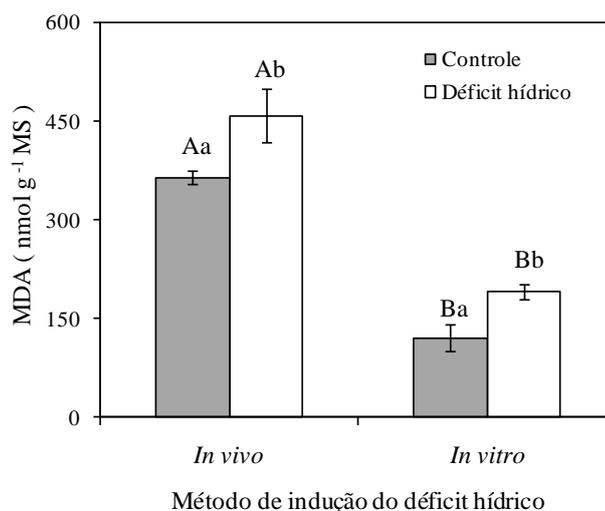


Figura 2. Concentração de aldeído malônico (MDA) em folíolos de *C. guianensis* sob deficiência hídrica *in vivo* e *in vitro*. Estatística como na Figura 1.

3.1. Enzimas antioxidantes

Como mostrado na Figura 3, os resultados obtidos para atividade enzimática nos métodos avaliados não se mostraram equivalentes.

Os tratamentos do método *in vitro* apresentaram maior atividade significativa de SOD comparado com os tratamentos do método *in vivo* analisado. No método *in vivo* não foi observada diferença significativa na atividade de SOD entre seus tratamentos (controle vs. déficit hídrico), assim como, no método *in vitro* não houve também diferença entre seus tratamentos. O maior valor de SOD foi encontrado no tratamento sob déficit hídrico do método *in vitro* (73,3 U mg⁻¹ prot) e o menor no tratamento sob déficit hídrico do método *in vivo* (29,0 U mg⁻¹ prot).

Os efeitos do déficit hídrico nas atividades da APX e CAT foram evidentes comparando-se os tratamentos no método *in vivo*. Para a atividade da APX o maior valor registrado foi de 2,11 U mg⁻¹ prot no tratamento déficit hídrico do método *in vivo* e para a atividade de CAT o maior valor foi registrado também no tratamento déficit hídrico do método *in vivo* (96,8 U mg⁻¹ prot).

O tratamentos com ausência de PEG (controle) e com adição de PEG (déficit hídrico) do método *in vitro* não induziu a atividade de APX e CAT.

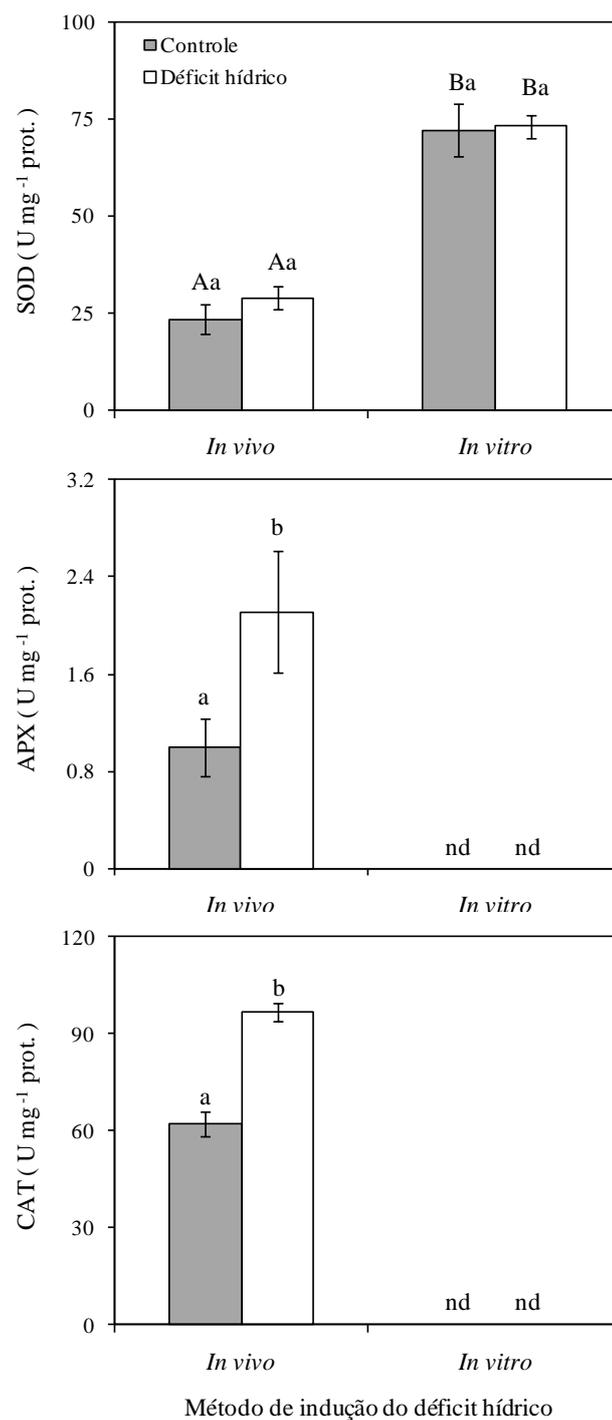


Figura 3. Atividade de enzimas antioxidantes em folíolos de *C. guianensis* sob deficiência hídrica *in vivo* e *in vitro*. Estatística como na Figura 1. A sigla nd indica atividade enzimática não detectada.

5. DISCUSSÃO

A seca, devido ao seu efeito osmótico natural em habitats agrícolas podem provocar um grande número de respostas que vão desde a inibição do crescimento e síntese de alguns compostos para aumentar o potencial osmótico na célula e assim permitir que os processos metabólicos continuem, com cooperação de atividades das enzimas antioxidantes.

Neste experimento a resposta observada *in vitro* não foi equivalente a resposta *in vivo* para conteúdo de aldeído malônico e enzimas antioxidantes. Alguns trabalhos têm demonstrado que uma resposta observada *in vitro* pode ter ou não relação com uma resposta da planta inteira (BAJJI et al., 1998; MARTINEZ et al., 2005). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de a resistência ao estresse hídrico ser um caráter quantitativo, que envolve a expressão de diversos genes (KNIGHT e KNIGHT, 2001) e a ação de complexos mecanismos bioquímicos e fisiológicos, coordenados nos níveis de célula, tecido, órgão, planta inteira (ZHU, 2001).

O PEG utilizado no método *in vitro* tem sido amplamente utilizado como um agente osmótico para indução de déficit hídrico em plantas (KRIZEK, 1985). O PEG é inerte, não-iônico, um polímero de cadeia longa, mas altamente solúvel em água e disponível em uma ampla gama de massa molecular (LAWLOR, , 1970). O PEG de alto peso molecular de mais de 4000 induz déficit hídrico em plantas, diminuindo o potencial hídrico de soluções nutritivas, sem ser absorvidos e com nenhuma evidência de toxicidade (LAWLOR, 1970).

O déficit hídrico induzido pelo PEG 6000 no método *in vitro* ocasionou a redução de 12,2% no CRA em comparação ao controle. Resultados diferentes foram demonstrados por Turkan et al. (2004) em folhas de *P. acutifolius* onde o CRA não se alterou com o tratamento com PEG enquanto que em folhas de *P. vulgaris* diminuiu 10% no 14 ° dia de tratamento, indicando um decréscimo acentuado sob potencial osmótico de -0.40 MPa,.

Considerando que *in vivo*, a água é continuamente extraído pelas plantas e é perdida para a atmosfera por evapotranspiração, as plantas em experimentos *in vivo* onde a irrigação é suspensa por algum tempo, a progressão do déficit hídrico ocorre de leve a grave. Esta consideração é importante na comparação dos resultados do presente experimento *in vitro* com os obtidos *in vivo* pois este último apresentou uma redução de 45,2 % no CRA.

A diminuição do CRA é um indicativo de perda de água, o que pode ocasionar aumento do MDA indicativo de dano oxidativo. A importância dos danos oxidativos difere entre espécies ou genótipos e em resposta à intensidade e duração do estresse (SGHERRI et al., 2000). No presente trabalho, as concentrações foliares de MDA foram maiores no método

in vivo indicando danos oxidativos aos lipídios de membrana tanto no controle como no sob déficit hídrico, enquanto que não ocorreu resultado semelhante no *in vitro*. Ou seja, as atividades das enzimas SOD, APX e CAT não atenuaram os danos oxidativos no método *in vivo*. Resultado semelhante foi registrado por Costa (2009) em plantas de andiroba em que as concentrações foliares de MDA evidenciaram claramente que as plantas de andiroba também sofreram danos oxidativos aos lipídios de membrana, independentemente do regime hídrico.

A peroxidação de lipídios gera o aldeído malônico (MDA), que é um produto da decomposição de ácidos graxos das biomembranas e é uma forma de atestar a presença de radicais livres. (LIN e KAO, 2000; MUNNÉ-BOSCH *et al*, 2002). A ocorrência de peroxidação de lipídios nas plantas irrigadas (no caso, o controle) poderia ser atribuída aos distúrbios normais que ocorrem nas rotas metabólicas que envolvem reações de transferência de elétrons, como na fase fotoquímica da fotossíntese, na fotorespiração (em plantas C3) e na respiração mitocondrial (MITTLER, 2002).

Segundo Foyer *et al*, (1994) sob condições normais, as plantas geralmente estão bem adaptadas para minimizar os danos devido à inevitável formação de ERO na fotossíntese, porém a seca intensifica a formação de radicais livres nas plantas por limitar o *pool* de NADP⁺ disponível para receber elétrons do fotossistema I. Dessa maneira, aumenta a probabilidade de transferência de energia de excitação para O₂, levando à produção de O₂•-. O balanço entre a formação e detoxificação de ERO é crítico para sobrevivência da célula durante períodos de estresse hídrico. Nos tecidos hidratados, a produção de radicais livres normalmente é regulada através do sistema antioxidante. Possivelmente o estresse hídrico altera o equilíbrio entre a produção de radicais livres e as reações de defesa favorecendo a produção dos radicais livres (Zhang e Kirkham 1994).

A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT) é geralmente incrementada para promover melhor eliminação das ERO e promover uma maior proteção celular contra danos oxidativos (MITTLER, 2002). Tal *et al*. (1998) e Bor *et al*. (2003), encontraram uma correlação entre maior atividade das enzimas antioxidantes e diminuição na peroxidação de lipídios em tomate tolerante (*Lycopersicon pennelli*) e beterraba selvagem (*Beta maritima*), respectivamente, sob estresse salino. Lima *et al*. 2002, observou que maiores atividades da SOD, CAT e APX em plantas de *Coffea canephora*, clone 120 (tolerante à seca), promoveram consideráveis decréscimos nos teores foliares de MDA e extravasamento de eletrólitos que no clone 109 A (sensível à seca) sob condições de deficiência hídrica.

Neste trabalho observa-se um aumento na atividade de SOD no método *in vitro* em comparação ao *in vivo* enquanto que a atividade de APX e CAT são detectadas no *in vivo* e não detectadas no *in vitro*. É bastante clara a diferença entre os dois métodos avaliados.

Aumentos e decréscimos na atividade da SOD sob condições de seca *in vivo* têm sido relatados em literatura (MARTINEZ et al., 2001; PINHEIRO et al., 2004 e COSTA et al., 2009). Como as atividades da APX e CAT foram maiores nas plantas de andiroba sob déficit hídrico *in vivo*, pode-se inferir que o estresse desencadeou uma maior produção de H₂O₂, portanto, a detoxificação de O₂⁻ nessas plantas pode ser parcialmente resultante da atividade da SOD nos cloroplastos, como também a partir da reação direta do O₂⁻ com o ascorbato e a glutatona reduzida (MITTLER, 2002).

Provavelmente a atividade das enzimas antioxidantes no método *in vitro* não atuaram na proteção aos lipídios de membrana em virtude da redução do CRA não ter sido suficiente para promover aumento no nível de aldeído malônico. Em experimento realizado por Turkan et al. (2004) *in vitro* com variedades de feijão mostraram que maiores atividades da SOD, CAT e APX na variedade *P. acutifolius* promoveram consideráveis decréscimos nos teores foliares de MDA que na variedade *P. vulgaris*. Assim como, foram encontradas diminuição da atividade da SOD em mudas de girassol (QUARTACCI et al., 1992), e *Aegilops squarrosa* L. (BADIANI et al., 1990) e aumento na atividade da SOD em trigo (BADIANI et al., 1990 e LUNA et al., 1985) sob estresse hídrico induzido por PEG.

A APX e a CAT pertencem a duas diferentes classes de enzimas de dissipação do H₂O₂ devido as suas diferentes afinidades, com a APX tendo o *K_m* na gama μ M e a CAT na gama mM. Portanto enquanto a APX seria responsável pela modulação refinada das ROS para sinalização, a CAT seria responsável pela remoção do excesso de ROS gerado durante o estresse (Mittler, 2002), entretanto, deve-se considerar o papel da APX no combate ao estresse oxidativo gerado em compartimentos que não possuem a CAT, como os cloroplastos. O H₂O₂ produzido pela SOD é degradado pela CAT principalmente nos peroxissomos (Scandalios, 1990, Azevedo *et al.*, 1998).

A Catalase elimina H₂O₂, quebrando-a diretamente para formar água e oxigênio. Neste experimento o tratamento com PEG não teve efeito sobre a atividade da CAT no método *in vitro*. Zhang e Kirkham (1996) e Fu e Huang (2001) também relataram que a atividade da CAT não foi afetada pela seca moderada. A enzima CAT é sensível a luz *in vitro* e sofre de fotoinativação com subsequente degradação assim como em folhas intactas (FEIERABEND e ENGEL, 1986). Fotoinativação do PSII e da catalase representam sintomas gerais de sensibilidade à luz e fotodano cedo nas folhas.

Também foi postulado que a inativação de CAT pode também ser mediada por eventos fotooxidativos iniciados através de absorção de luz pela clorofila nos cloroplastos (Feierabend e Kemmerich, 1983). A demonstração da inativação de CAT na presença de cloroplastos isolados irradiados com luz vermelha em um simplificado sistema de modelo *in vitro* supriu evidencia clara que CAT pode ser inativada por ROS liberadas dos cloroplastos. Uma comparação dos efeitos dos inibidores, doadores, ou aceptores para locais específicos do transporte de elétrons fotossintéticos indicou que uma superredução do PSII e plastoquinona representa a maior origem de formação de O₂ •- e algum radical não identificado que apareceu para mediar a inativação da CAT fora dos cloroplastos (Shang e Feierabend, 1999). A CAT não é uma enzima resistente. Ela é susceptível para fotoativação e degradação (FEIERABEND e ENGEL, 1986; FEIERABEND et al., 1992; STREB et al., 1993).

No presente experimento não foi observado também atividade de APX no método *in vitro*. A enzima APX dissipa H₂O₂ em cloroplastos (onde não contem catalase). Isoenzimas de APX são expressas por mecanismos regulatórios em resposta a vários estresses ambientais ou celulares, e tem um papel co-operativo para proteger cada organela e minimizar injúria tecidual (Lorkovi'c *et al.*, 2000). Segundo Pastori e Trippi (1992) a atividade de APX geralmente aumenta juntamente com a atividade de outras enzimas antioxidantes como a CAT e SOD em resposta a vários fatores de estresse ambientais, sugerindo que os componentes de sistemas dissipadores de ROS são co-regulados.

6. CONCLUSÃO

A metodologia empregada para avaliar a resposta ao estresse hídrico *in vitro* em folhas de andiroba, foi insuficiente para validar este método. É necessário ampliar as pesquisas na indução do déficit hídrico *in vitro* para andiroba, para que os resultados obtidos não sejam mal interpretados e que conclusões erradas não sejam obtidas. Danos aos lipídios de membrana foram abrandados por meio da modulação da APX e CAT no método *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSCHER, R.G., ERTURK, N., HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany** 53, 1331–1341, 2002.

BAISAK R., RANA D., ACHARYA P.B.B., KAR M. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. **Plant and Cell Physiology** 35, 489-495, 1994.

BASTOS, T.X.; CHAIB FILHO H.; MUNIS, T.D.A.S.; LOBATO, V.H.B. Flutuação das chuvas na região de Belém em distintos intervalos de tempo, período 1967-1983. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1986, **Anais...** Belém: EMBRAPA-CPATU, v. 1, 1986, p.37-43.

BENSON E.E. Free Radical Damage in Stored Plant Germplasm, International. **Board for Plant Genetic Resources**. pp. 128, 1990.

BOWLER C., VAN CAMP W., VAN MONTAGU M., INZÉ D. Superoxide dismutases in plants. **Critical Reviews in Plant Science** 13, 199-218, 1994.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248-254, 1976.

BOUFLEUER, N. T. **Aspectos ecológicos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., *Meliaceae*), como subsídios ao manejo e conservação**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo dos Recursos Naturais)- Universidade Federal do Acre. Rio Branco. 84f. 2004.

CAKMAK, I.; HORST, J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine Max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.

CHAVES M., PEREIRA J. Water stress, CO₂, and climate change. **Journal of Experimental Botany** 43, 1131-1139, 1992.

CHAVES, M. M. et al. **How plants cope with water stress in the field**. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, London, v.89, n.2-3, p.907-916, 2002.

COSTA, M. A.; PINHEIRO, H. A.; SHIMIZU, E. S. C.; FONSECA, F. T.; SANTOS FILHO, B. G. DOS; MORAES, F. K. C.; FIGUEIREDO, D. M. DE. Lipid peroxidation, chloroplastic pigments and antioxidant strategies in *Carapa guianensis* (Aubl.) subjected to water-deficit and short-term rewetting. **Trees** 24:275–283, 2010.

DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 57, p. 779-795, 2000.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. Espécies arbóreas da Amazônia. Ficha n. 2: andiroba, *Carapa guianensis*. **Embrapa – CPATU**. Belém, Brasil. 180p. 2004.

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*carapa guianensis* aubl. e *carapa procera* d. c.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica**, v. 32, p. 647-661, 2002.

FERRAZ, I. D. K.; MENDONÇA, A. P. Extração tradicional do óleo de andiroba. Isolde I.D.K. Ferraz e Andrea P. Mendonça (eds.). Manaus: **INPA**, 28p. 2006.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I: occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

HAVIR E.A., MCHALE N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology** 84, 450-455, 1987.

HUNG, S-H.; YU, C-W & LIN, C.H. **Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants**. Botanical Bulletin of Academia Sinica, v.46, p. 1-10, 2005.

INZÉ, D., VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1995.

KONIECZNY, R. et al. Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 71-79. 2008.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. Water Relations of Plants and Soils. San Diego: **Academic Press**, p.495, 1995.

LAWLOR D. W., UPRETY D. C. Effects of water stress on photosynthesis of crops and the biochemical mechanism. *In*: "Photosynthesis-Photoreactions to the Plant Productivity" (Abrol Y. P., Mohanty P. Govindjee, eds), **Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.** pp. 419-449, 1993.

LEITE, A. M. C. **Ecologia da Carapa guianensis Aublet (Meliaceae)**. Tese (Doutorado em Biologia Ambiental). C.C.B., UFPa, Belém, 1997.

LIN C. C., KAO C. H. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. **Plant Growth Regulation** 30:151-155, 2000.

MAY, P. Estado actual de La informacion sobre productos forestales no madereros. 114-211p. in **FAO. Estado de La informacion forestal em Brasil. Santiago, Chile.** 226 p. 2002.

MARTINEZ C. A., LOUREIRO M. E., OLIVA M. A., MAESTRI M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Science** 160, 505-515, 2001.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, n.9, p.405-410, 2002.

MIZUNO, M.; KAMEI, M. e TSUCHIDA, H. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. **IUBMB Life**, v. 44, p. 717-726, 1998.

MONK L.S., FAGERSTEDT K.V., CRAWFORD R.M.M. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. **Physiologia Plantarum** 76, 456-459, 1989.

MORAES, F K C. **Análise fisiológica e anatômica de folíolos em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas jovens de andiroba** (*Carapa guianensis* Aubl.) Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

Munné-Bosch S., Alegre L. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. **Planta** 214:608-615, 2002.

NAKANO Y., ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology** 22, 867-880, 1981.

PORTAL DO EXTRATIVISMO. **Essências florestais** – Andiroba. Disponível em: <http://www.florestavivaextrativismo.org.br>. Janeiro, 2010

RODRIGUES, R. M. A Flora da Amazônia. Belém: CEJUPE, **Utilidades industriais. Plantas Mediciniais**. 462 p., 1989.

SCARCELLO, M.; BORGES, K. H.; ROSA DOS SANTOS, M. L. Manejo de Recursos Não-Madeireiros: perspectivas para Amazônia. **Rio Branco: S.O.S. Amazônia, SEBRAE/AC, UFAC, CNPT/IBAMA, PPG7, EMBRAPA/AC**, Relatório Parcial, 48 p., 1999.

SILVA, E. S; NISHIOKA, T. D. **Extração e caracterização físico-química do óleo de andiroba** (*Carapa guianensis* Aublet) por prensa, solvente e método artesanal. 2007. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química). Universidade Federal do Pará, 2007.

SLATER T.F. Review Article. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochemical Journal** 222, 1-15, 1984.

SGHERRI, C. L. M.; MAFFEI, M.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal Plant Physiology**, v.157, p.273-279, 2000.

STEFFEN K. L. Avoidance of photooxidative stress: Balancing energy flux within the chloroplast. In: “**Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism**” (Pell E., Steffen K. L. eds), Rockville. pp 119-130, 1991.

TAIZ L. E ZEIGER E. Fisiologia do estresse. *In*: “**Fisiologia Vegetal**” (Taiz L. e Zeiger E. eds.) Artmed. pp.613-643, 2004.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, F.V. Signail transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1227-1236, 2002.

WILLEKENS, H. et al. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal*, v.16, p. 4806–4816, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)