Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Respostas enzimáticas da linhagem superior CadG1 de *Aspergillus* sp. à
exposição ao cádmio**

Luana Fernanda Erlo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento
de Plantas

Piracicaba
2006

Luana Fernanda Erlo
Engenheiro Agrônomo

Respostas enzimáticas da linhagem superior CadG1 de *Aspergillus* sp. à exposição ao cádmio

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. SILVIA MARIA GUERRA MOLINA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento
de Plantas

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Erlo, Luana Fernanda

Respostas enzimáticas da linhagem superior CadG1 de *Aspergillus* sp. à exposição ao cádmio / Luana Fernanda Erlo. - - Piracicaba, 2006.
59 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. *Aspergillus* 2. Cádmio 3. Enzima antioxidante 4. Metal pesado do solo 5. Poluição ambiental I. Título

CDD 589.24

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À minha família pelo apoio,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profª. Dra. Sílvia Maria Guerra Molina pela orientação e amizade durante toda a minha graduação e pós-graduação;

À todos os professores da ESALQ/USP que contribuíram para a minha formação;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecogenética de Resíduos Agroindustriais e Ecologia Humana, especialmente Ana Paula, Lígia, e Maurício;

Aos colegas do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas;

Aos amigos do curso de pós-graduação, especialmente Ana Paula, Bia, Uirá e Érika;

Aos professores do Departamento de Genética pela colaboração;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Revisão de literatura.....	13
2.1.1 Poluição ambiental.....	13
2.1.2 Biorremediação.....	14
2.1.3 O metal pesado cádmio.....	15
2.1.4 Riscos à saúde.....	16
2.1.5 Espécies reativas de oxigênio.....	17
2.1.5.1 Superóxido dismutase.....	18
2.1.5.2 Catalase.....	19
2.1.5.3 Glutathione redutase.....	20
2.1.5.4 Guaiacol peroxidase.....	21
2.1.6 <i>Aspergillus</i>	22
2.2 Materiais e métodos.....	23
2.2.1 Material biológico.....	23
2.2.2 Meios de cultura.....	23
2.2.2.1 Meio completo.....	23
2.2.2.2 Meio mínimo líquido.....	24
2.2.3 Soluções.....	25
2.2.3.1 Solução de vitaminas.....	25
2.2.3.2 Solução de Tween 80.....	25
2.2.3.3 Solução salina.....	25
2.2.3.4 Solução de cloreto de cádmio 100 mM.....	26
2.2.4 Condições de cultivo para manutenção da linhagem.....	26
2.2.5 Suspensão de esporos.....	26

2.2.6 Experimento básico.....	26
2.2.7 Extração das enzimas.....	27
2.2.8 Determinação de proteínas.....	27
2.2.8.1 Atividade da catalase.....	27
2.2.8.2 Atividade da superóxido dismutase.....	28
2.2.8.3 Atividade da glutathione redutase.....	28
2.2.8.4 Atividade da guaiacol peroxidase.....	28
2.2.9 Análise estatística.....	29
2.3 Resultados e discussão.....	30
2.3.1 Efeito da exposição ao cádmio sobre o peso seco do micélio da linhagem CadG1.....	30
2.3.2 Efeito da exposição ao cádmio sobre a quantidade de proteínas totais extraídas do micélio da linhagem CadG1.....	34
2.3.3 Efeito da exposição ao cádmio sobre a atividade da Superóxido dismutase.....	36
2.3.4 Efeito da exposição ao cádmio sobre a atividade da Catalase.....	39
2.3.5 Efeito da exposição ao cádmio sobre a atividade da Glutathione redutase.....	42
2.3.6 Efeito da exposição ao cádmio sobre a atividade da Guaiacol peroxidase.....	45
3. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

Respostas da linhagem superior CadG1 de *Aspergillus* sp. à exposição ao cádmio

Nas últimas décadas tem havido uma grande preocupação com os níveis de poluição ambiental, uma vez que esta tem causado problemas à saúde humana e perdas significativas na produção agrícola. A contaminação do ambiente por metais pesados vem se tornando um problema global, sendo uma ameaça cada vez mais presente em muitos ecossistemas, especialmente próximo a áreas industriais e urbanas. A poluição por metais pesados, particularmente pelo cádmio (Cd), considerado um dos mais tóxicos é gerada principalmente pelas atividades de mineração e industriais, (manufatura de baterias, produção de fertilizantes, estabilização de plásticos), além da utilização de lodo de esgoto e fertilizantes fosfatados. Quando há exposição aos metais pesados, danos oxidativos freqüentemente ocorrem, devido à intensificação na produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs), as quais estimulam a produção de enzimas responsáveis por sua desintoxicação, dentre elas as peroxidases, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), guaiacol peroxidase e outras. O estudo dessas variações pode fornecer dados importantes relativos aos níveis de tolerância, especificidade da resposta e níveis de poluição no ambiente. Esses dados também podem ser úteis para obtenção de microrganismos mais tolerantes, além de estudos relacionados a biorremediação, técnica que consiste na remoção de íons tóxicos do ambiente com o auxílio de organismos vivos. Há pouca informação na literatura com referência à resposta antioxidante de fungos ao efeito do metal pesado cádmio. O objetivo desse trabalho foi estudar variações nas enzimas antioxidantes em resposta à exposição a diferentes concentrações de Cd em uma linhagem do fungo *Aspergillus* sp., a CadG1, por possuir tolerância ao cádmio. Para conhecer o comportamento enzimático dessa linhagem em resposta ao Cd, foram realizados experimentos para determinação de massa seca e para estudar as respostas enzimáticas, nas concentrações de 0; 0,2; 0,6; 1,2 e 2,0 mM de cloreto de cádmio (CdCl_2), e tempos de exposição de 6, 9, 12, 24 e 48 horas, a partir de um crescimento de 12 horas em meio mínimo. A linhagem CadG1 apresentou variações nas atividades de SOD e CAT e GR nos tempos de exposição e concentrações estudados. Observou-se um efeito significativo de tempo, concentração e da interação entre esses fatores sobre o crescimento da linhagem e também sobre a quantidade de proteínas totais extraídas do micélio da linhagem CadG1. Os resultados obtidos sugerem o cádmio induziu a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez, induziu a atividade de CAT e GR.

Palavras chaves: cádmio, enzimas antioxidantes, *Aspergillus* sp.

ABSTRACT

Response to different concentrations of cadmium on the *Aspergillus* sp CadG1 strain

In the last decades there has been a great deal of concern towards environmental pollution levels, due to the problems it has caused to the human health and also contributing to agricultural yield decreasing. Contamination of the environment with heavy metals is becoming a serious global problem, threatening seriously different ecosystems, particularly those near urban and industrial areas. Heavy metal pollution, caused mainly by cadmium (Cd), is considered one of the more toxic, which is generated by mining and industrial activities (battery manufacturing) and the usage of sewage sludge and phosphate fertilizers. When things are exposed to heavy metals, oxidative damage often occurs, due to the generation of reactive oxygen species (ROS), which can stimulate enzymes responsible for their detoxification, such as peroxidases, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), guaiacol peroxidase and others. The study of these variations may allow obtaining the tolerance levels evaluation, specificity of response and levels of pollution in the environment. These data may be useful in breeding programs to select tolerant microorganisms, besides the studies related to the bioremediation, technique that involves the toxic ions removal, by living organisms, from the environment. There is little information in literature about the antioxidant response of fungus to the effects of the heavy metal cadmium. This work aims to study the variation of antioxidant enzymes in response to different concentrations of cadmium in one *Aspergillus* sp. strain, CadG1, which is cadmium tolerant. To know the enzymatic behaviour of this strain in response to cadmium, experiments were conducted to determine the dried mass and to study the enzymatic responses in concentrations of 0; 0,2; 0,6; 1,2 and 2,0 mM of CdCl₂, and in different times of exposure, 6, 9, 12, 24 e 48 hours, after initial growth for 12 hours in minimum medium. The CadG1 strain show variation in the activities of SOD, CAT and GR in the exposure and concentrations studied periods. It has observed a significant effect on the time, concentration and interaction among these factors on the strain growing and the total proteins amount extracted from the strain mycelium. The results suggest that cadmium induced the formation of hydrogen peroxide (H₂O₂), which induced the activities of CAT and GR as well.

Keywords: cadmium, antioxidant enzymes, *Aspergillus* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito do cádmio sobre o peso seco do micélio da linhagem CadG1.....	30
Figura 2 – Efeito dos tempos de (6, 9, 12, 24 e 48 horas) de exposição ao cloreto de cádmio nas proteínas totais do micélio da linhagem CadG1 em diferentes dosagens.....	34
Figura 3 – Gel de atividade da SOD.....	38
Figura 4 – Gel de atividade de CAT.....	41
Figura 5 – Efeito dos tempos de exposição e dosagens de cádmio sobre a atividade de GR na linhagem CadG1.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias de massa micelial seca da linhagem CadG1 em ensaio de exposição ao cádmio.....	30
Tabela 2 - Regressão polinomial para médias de massa micelial seca	32
Tabela 3 - Análise de variância dos resultados provenientes das proteínas totais extraídas do micélio da linhagem CadG1.....	34
Tabela 4 - Regressão polinomial para proteína total.....	35
Tabela 5 - Análise de variância dos resultados provenientes da atividade de GR no micélio da linhagem CadG1.....	42
Tabela 6 - Regressão polinomial para a atividade de GR.....	46

1 INTRODUÇÃO

A crescente industrialização das últimas décadas tem exposto animais e vegetais a muitos elementos químicos potencialmente tóxicos. Entre estes, os metais pesados representam o maior contaminante industrial de solos, corpos de água, plantas e animais no ecossistema (GHOSHROY et al., 1998) de tal forma que o estudo da toxicidade de metais pesados em plantas e microrganismos vem atraindo a atenção de muitos cientistas do ambiente (PRASAD, 1995). A presença de metais pesados no ambiente resulta em perdas na produção agrícola e efeitos danosos ao homem e animais.

No Brasil não existe um levantamento abrangente ou estimativas confiáveis do grau do problema de contaminação por metais pesados. No entanto, em função do modelo de crescimento industrial bem como do tipo de indústrias instaladas no país, principalmente no estado de São Paulo, não há motivos para se supor que o problema seja menor do que em países industrializados.

O cádmio é um dos metais pesados mais tóxicos para as plantas e animais, sendo o que tem apresentado as mais altas taxas de emissão para o ambiente nas últimas décadas. Em solos não contaminados, o cádmio encontra-se em concentrações que variam de 0,01 a 0,7 mg Kg⁻¹, podendo ser aumentadas pela utilização de insumos agrícolas que contenham o elemento ou rejeitos industriais contaminados, o que pode possibilitar a introdução do metal na cadeia alimentar mediante a absorção pelas plantas (NASCIMENTO; PEREIRA, 1997).

Em 2000 iniciamos no laboratório de Ecogenética de Resíduos Agroindustriais e Ecologia Humana, uma linha de pesquisa relacionada a metais pesados e microrganismos. Desde 1998, entretanto, nossa Equipe, já optara por pesquisar o efeito de metais pesados em plantas. Fizemos estas escolhas, em face dos problemas sérios de contaminação por metais pesados existentes no Brasil. O estudo da toxicidade de metais em plantas e microrganismos é importante porque estes se encontram entre os organismos mais afetados pela contaminação devida a metais pesados. Além disto, apresentam variação quanto à tolerância a metais e apresentam ainda bom potencial de uso para a remediação de áreas contaminadas por meio de técnicas de biorremediação. É bastante conhecido que metais pesados podem gerar estresse oxidativo. No entanto, o papel do sistema antioxidante no estresse por metais é controvertido, com resultados bastante variáveis (SCHUTZENDUBEL et al., 2001).

Embora os efeitos do cádmio sobre o crescimento de microrganismos e plantas venham sendo investigados, a resposta de enzimas antioxidantes do *Aspergillus nidulans* ao cádmio ainda não tinha sido bem documentada. Em nosso laboratório foi estudado o efeito do cádmio (fornecido como CdCl_2) sobre a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR) (GUELFİ et al., 2003). Nesse trabalho constatou-se que 0,005 mM de CdCl_2 teve um leve efeito estimulante sobre a taxa de crescimento do *A. nidulans*. Mas, em concentrações acima de 0,0025 mM, o crescimento foi totalmente inibido. A acumulação de cádmio no micélio esteve diretamente correlacionada ao aumento da concentração do CdCl_2 usado nos tratamentos. Observou-se uma elevação na atividade de SOD, estimulada pelo cádmio, mantendo-se as proporções entre as isoenzimas Mn-SOD. Maiores concentrações de CdCl_2 induziram um pequeno aumento na atividade total de CAT. Houve entretanto, um aumento em uma das formas isoenzimática, a qual pode ser separada em gel de eletroforese. A atividade de GR elevou-se significativamente com o tratamento com 0,05 mM de CdCl_2 . Esses resultados sugerem que o CdCl_2 induz a formação de ROS dentro do micélio do *A. nidulans* (GUELFİ et al., 2003). Paralelamente foram feitos estudos preliminares com a linhagem CadG1, isolada em nosso laboratório ao longo do trabalho de Guelfi et al. (2003). Os resultados já obtidos, sugeriram que a mesma tem uma grande resistência ao cádmio, sem que se conheça ainda, os mecanismos associados a isso. O presente trabalho deu continuidade aos estudos com essa linhagem, com o intuito de melhor caracterizar os sistemas metabólicos envolvidos na resposta antioxidante.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 Poluição ambiental

Defini-se poluição como sendo toda alteração das propriedades naturais do ambiente que seja prejudicial à saúde, à segurança ou ao bem estar da população sujeita aos seus efeitos, causada por agente de qualquer espécie (MANO; PACHECO; BONELLI; 2005). Até 1970, a palavra poluição era pouco comum em textos escritos. A partir daí, a contaminação do meio ambiente por quantidades crescentes de materiais de destruição espontânea muito lenta passou a causar preocupação.

A questão dos impactos dos resíduos perigosos no meio ambiente é de grande dimensão e é assunto de relevância em vários países. Atualmente existe uma grande preocupação com relação aos efeitos a curto e longo prazo que muitos poluentes químicos possam ter sobre a saúde pública e o meio ambiente, pois a crescente industrialização das últimas décadas tem exposto animais e vegetais a muitos elementos químicos potencialmente tóxicos.

Os metais pesados têm sido considerados os principais poluentes ambientais. A poluição ambiental por metais pesados vem crescendo desde o final do século XIX devido a atividades industriais e de mineração (DONMEZ; AKSU, 1999; PINTO et al., 2001). A importância de se estudar esses metais deve-se aos seus intensos efeitos tóxicos ao homem e outros seres vivos, associados a sua ampla liberação no ambiente. Para ilustrar a importância da poluição por metais no ambiente, pode-se citar que dentre as 20 substâncias com maior risco de causar danos aos seres humanos, em locais contaminados, conforme levantamento realizado em 2001 pela ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) e EPA (Environmental Protection Agency) do governo dos E.U.A, 5 são metais, incluindo os 3 primeiros colocados.

Teores fitotóxicos de metais não são encontrados em solos sob condições naturais, mas podem ser originados freqüentemente de zona industrial e atividades agrícolas; metais como Zn, Cu e Cd são amplamente difundidos e podem aparecer em altos níveis no solo (CASTILHO, 1992). Ocorrem vários casos de contaminação por metais pesados, associados a atividades agrícolas. Nestes, os fertilizantes e defensivos freqüentemente se constituem em fontes introdutoras de

metais pesados no ambiente. O Brasil é carente de informações sobre áreas contaminadas. Há casos relatados sobre rios (cádmio, chumbo e outros metais nos rios Piracicaba e Atibaia). Também outros sistemas aquáticos são ou foram afetados (bário e cádmio na Baía de Sepetiba) (AMADO FILHO et al, 1999, CARVALHO; LACERDA; GOMES, 1991; NETO; SMITH; MCALLISTER, 2000; PERIN et al., 1997). Geralmente, esses casos de poluição estão associados à intensa atividade industrial próxima aos corpos d'água.

Para tratamento de locais contaminados, a biotecnologia ambiental dispõe de várias ferramentas, podendo-se destacar a fitorremediação e a biorremediação.

2.1.2 Biorremediação

A biorremediação é uma das ferramentas da biotecnologia ambiental que utiliza microrganismos decompositores no tratamento dos resíduos, tornando-os menos perigosos e impactantes. É um avanço importante para o desenvolvimento de novas técnicas para a recuperação ambiental.

A remoção de metais pesados do meio ambiente é essencial devido a toxicidade desses para plantas, animais e seres humanos (KAPOOR; VIRARAGHAVAN; CULLIMORE, 1998). Microrganismos naturalmente presentes em solos são capazes de degradar e mineralizar agroquímicos. Desta forma, a descontaminação de locais poluídos pode ser obtida por meio de sistemas biológicos. Microrganismos tais como bactérias, algas, fungos filamentosos e leveduras removem metais do ambiente, via mecanismos ativos ou passivos (DÖNMEZ; AKSU, 1999). Atualmente nota-se o desenvolvimento de programas que empregam microrganismos no tratamento de locais contaminados (PINTO et al., 2001). O emprego de seres vivos para reduzir ou destruir resíduos perigosos é característico das tecnologias de biorremediação. Estas buscam intensificar e/ou direcionar processos que ocorrem naturalmente. Desta forma, apresentam-se como técnicas muito promissoras, porque têm menor potencial de impacto ambiental. Nelas, podem ser empregados microrganismos capazes de metabolizar resíduos poluentes, transformando-os em produtos menos tóxicos, mineralizando-os (WILSON; JONES, 1993) e/ou acumulando-os eficientemente (GADD, 1990). Essa nova tecnologia vem mostrando grande eficiência no tratamento de efluentes, fossas sépticas e esgotos sanitários e também em áreas poluídas por agroquímicos. Porém, ainda existem dificuldades para o uso mais generalizado

dessa técnica. Estas estão associadas à falta de conhecimentos sobre os processos biológicos envolvidos; à carência de resultados experimentais válidos em escala comercial; às limitações dos métodos de monitoramento do processo *in loco* e de controle dos riscos potenciais, assim como à escassez de regulamentação sobre o seu uso e aplicação (SIQUEIRA, 1994).

Estudos de populações microbianas tem mostrado que as bactérias são mais sensíveis ao Cd que os fungos (MEGHARAJ; SETHUNATHAN; NAIDU, 2003).

2.1.3 O metal pesado cádmio (Cd)

Os metais pesados ocorrem naturalmente e muitos deles são componentes essenciais do ecossistema global (PINTO et al. 2003). A expressão metal pesado se aplica a elementos que têm peso específico maior que 5g/cm^3 ou que possuem um número atômico maior que 20. A expressão engloba metais, semi-metais e mesmo não metais, como o selênio (Se). Essa expressão é a mais usada para designar metais classificados como poluentes do ar, água, solo, alimentos e forragem (MALAVOLTA, 1994).

Descoberto em 1817 por Stromeyer como uma impureza do carbonato de zinco, o cádmio pertence ao grupo IIB da tabela periódica, juntamente com o zinco (Zn) e o Mercúrio (Hg) (FERGUSSON, 1990). Mattiazo-Prezotto (1994) relata que nos dias atuais, a concentração de Cd na crosta terrestre varia entre 0,15 e 0,20 mgKg^{-1} sendo o 67º metal em ordem de abundância.

A poluição do ambiente com metais pesados tóxicos ocorre em todo o mundo, e deve-se ao atual modelo de avanço industrial (DÖNMEZ; AKSU, 1999). De todos os metais pesados poluentes, o Cd é um dos mais tóxicos para os seres humanos, animais e plantas (CHEN; KAO, 1995; KEFALA, 1999). Também, dentre esses elementos, é o que tem apresentado as mais altas taxas de emissão para o ambiente nas últimas décadas (NASCIMENTO; PEREIRA, 1997).

O cádmio é um poluente bastante difundido (ZHAO et al., 2005), bastante tóxico (LIJUN et al. 2005) e sem função biológica conhecida (MEGHARAJ; SETHUNATHAN; NAIDU, 2003). Page; Bingham (1973) descreveram o cádmio como sendo um poluente potencialmente prejudicial ao ambiente em função do aumento das emissões nas atividades de produção e deposição de resíduos; do seu longo prazo de persistência no meio; da sua rápida absorção e da acumulação de concentrações danosas em plantas e animais. Atualmente são emitidas 30.000 toneladas de Cd por fontes antropogênicas (DI- TOPPI et al., 1999). Está entre os 126 poluentes

prioritários listados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (WAISBERG et al., 2003).

2.1.4 Riscos à saúde

O cádmio tem uma meia vida de aproximadamente dez anos, o que essencialmente o torna uma toxina acumulativa. Por esse motivo, efeitos adversos à saúde podem aparecer mesmo após a redução ou a cessação à exposição ao Cd (GHOSHROY et al., 1998). As altas taxas de emissão desse metal no ambiente resulta em aumento dos níveis de Cd em solos utilizados na agricultura e conseqüentemente nos alimentos, o que o torna muito perigoso para a saúde humana (ZHO et al., 2005). É usado em numerosos materiais como revestimento à prova de corrosão, em ligas metálicas, pigmentos, estabilizadores, manufaturas de PVC, fertilizantes fosfatados, baterias de veículos, revestimentos eletrolíticos de metais, acabamentos de peças e fabricação de pedra-pome (ISTOMIM et al., 1999; KUMAR; PANT; SRIVASTAVA, 2000). É um potente carcinógeno humano e a exposição ocupacional a esse metal vem sendo associada a câncer de pulmão, próstata, pâncreas e rim (WAISBERG et al., 2003). Prolongadas exposições a esse metal podem causar disfunções renais e desmineralização dos ossos em humanos e animais (GHOSHROY et al., 1998).

A exposição ao cádmio pode ser ocupacional ou não. Trabalhadores de indústrias estão sujeitos a inalar o cádmio ou retê-lo em contato com a pele. Exposições não ocupacionais podem ocorrer por meio da ingestão de alimentos e de água. Também o tabagismo é uma importante fonte de contaminação para o homem (SHIMBO et al., 2000). Não há tratamentos efetivos comprovados contra a intoxicação crônica devida à exposição prolongada.

Em termos fisiológicos mais imediatos, a exposição de organismos ao cádmio gera entre outras respostas a formação de espécies reativas de oxigênio e estímulos diferenciados a sistemas de enzimas antioxidantes.

2.1.5 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

O acúmulo de oxigênio molecular (O_2) na atmosfera da Terra permitiu a evolução de organismos aeróbicos. A utilização do O_2 como aceptor final de elétrons na respiração, traz vantagens energéticas consideráveis. Entretanto, a presença do oxigênio no ambiente celular é uma ameaça às suas próprias estruturas e processos.

O O_2 é pouco reativo, mas tem a capacidade de assumir estados excitados reativos como radicais livres e derivados (SCANDALIOS, 1993). A reação que consome O_2 para produzir H_2O , ocorre pela utilização de 4 elétrons em um ciclo em que são originadas espécies intermediárias. Essas são as espécies reativas de oxigênio (ROS) como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$) e oxigênio "singlet" (1O_2). Organismos procarióticos e eucarióticos geram ROS como bioprodutos do seu metabolismo (AGUIRRE et al., 2005). Essas ROS provocam estresse oxidativo devido à sua ação tóxica e mutagênica sobre as células (ANGELOVA; PASHOVA; SLOKOSKA, 2000; MALLICK; MOHN, 2000). Muitos estudos têm mostrado que os metais pesados causam estresse oxidativo, resultando na produção de ROS (LIJUN et al., 2005), ativando o sistema antioxidante de defesa (CHAOUI et al., 1997). As ROS causam danos nos componentes celulares oxidando os lipídeos (DAMIEM, et al. 2004), proteínas e ácidos nucleicos (OSIEWACZ, 2002). Para combatê-las, as células dos fungos possuem tanto defesas antioxidantes enzimáticas, como catalases, peroxidases e superóxido dismutases (LIJUN et al., 2005; NOVENTA-JORDÃO et al., 1999), como não enzimáticas, envolvendo a glutathione, tiredoxina e poliaminas, entre outras (AGUIRRE et al., 2005). Em condições de estresse as ROS podem se acumular nos tecidos resultando na alteração da atividade de enzimas como CAT, SOD e peroxidases (CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994), as quais são responsáveis pela proteção antioxidante e preservação da integridade da membrana (LAGRIFFOUL et al., 1998). Os estudos das respostas celulares aos estresses metabólicos se constituem num assunto crucial para a área de tecnologia microbiana. Trazem obviamente relevantes informações sobre metabolismo celular básico. Mas, também sobre como manter a viabilidade metabólica e vitalidade das linhagens utilizadas nas indústrias. Isto porque estresses sofridos pelos microrganismos podem afetá-los, resultando em perdas econômicas significativas (PENNINCKX, 2000). A exposição dos microrganismos aeróbicos aos mais variados fatores de estresse, tais como calor, agentes oxidantes (entre eles os metais pesados), tratamento com

drogas, raio X e radiação UV, vem sendo associada à indução na síntese de enzimas antioxidantes (ANGELOVA; PASHOVA; SLOKOSKA, 2000). O estudo da atividade enzimática serve como um critério de avaliação da toxicidade de metais pesados (SCANDALIOS, 1993).

2.1.5.1 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) consiste num grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), consumindo-os, e assim, livrando as células do risco de oxidação por esses radicais, como pode ser observado na seguinte reação (MATÉS, 2000):

As SODs são as únicas enzimas cujas atividades interferem nas concentrações de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Esses são os dois substratos da reação de Haber-Weiss que origina os radicais $\text{OH}^{\bullet}$. Provavelmente por isso, as SODs representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (BOWLER; VAN MONTAGU; INZÉ, 1992; ALSCHER; DONAHUE; CRAMER, 1998). A ocorrência de SOD em tecidos fúngicos é bem conhecida (GIL-AD et al., 2000). É a primeira enzima de defesa contra danos provocados por ROS nas células (OLMOS et al., 2003).

Estas enzimas têm sido classificadas em três grupos de acordo com o componente metálico de seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn), manganês (Mn) ou ferro (Fe) (MALLICK; MOHN, 2000).

Em células animais, as Cu/Zn SOD estão presentes no citosol e mitocôndria enquanto que a Mn SOD está presente somente na matriz mitocondrial (STEINMAN, 1982). A Mn SOD é um homotetrâmero (96 KDa) contendo um átomo de manganês por subunidade. Já a Cu/Zn SOD possui duas subunidades idênticas de aproximadamente 32 KDa (MATÉS, 2000).

A concentração intracelular de SOD varia de 10^{-6} a 10^{-5} M. Esse dado suporta o conceito que o radical superóxido é muito tóxico para a célula (CHAUDIÉRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

Guidot et al. (1993) demonstraram que na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a Mn-SOD é a primeira enzima de defesa contra o superóxido. Mutantes dessa mesma levedura e do fungo

Neurospora crassa que não possuem a Cu/Zn-SOD são mais sensíveis ao oxigênio e aos agentes que geram o radical superóxido (CHARY et al., 1994; JAMIESON, D.J.; RIVERS, S.L.; STEPHEN, D.W., 1994).

2.1.5.2 Catalase

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é uma enzima tetramérica (MATÉS, 2000), que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio, foi proposto por vários pesquisadores que a catalase desempenha um papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbicos (MALLICK; MOHN, 2000; VERDUYN et al., 1988). Sua reação pode ser observada na reação abaixo:

A catalase é a única entre as enzimas degradadoras de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores celulares. Possui um mecanismo muito eficiente para remover o peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000). Esta enzima se localiza no peroxissomo, organela onde ocorrem os processos que geram H_2O_2 como a β -oxidação dos ácidos graxos (ANGELOVA et al., 2005). Há três famílias de catalases: Mn-catalases, catalase-peroxidases bifuncional, e monofuncional ou catalases “verdadeiras”. Dentro desse último grupo, há duas classes distintas: a subunidade menor (50 à 65 KDa) e a subunidade maior (~80 KDa). A primeira classe inclui um grande número de catalases de bactérias, plantas, fungos e animais (ANGELOVA et al., 2005). Um aumento no número de catalases na segunda classe vem sendo identificado em bactérias e fungos filamentosos, mas não em eucariotos complexos (KAWASAKI; AGUIRRE, 2001).

Várias condições ambientais podem alterar a atividade da CAT, por exemplo, em um procarioto simbiote fotossintético, a atividade da CAT foi diretamente proporcional à irradiação com ultravioleta (LESSER; STOCHAJ, 1990). Por outro lado, a mudança na temperatura afetou da mesma forma a atividade da catalase em cianobactérias (RADY et al., 1994).

2.1.5.3 Glutathiona redutase

A glutathiona reduzida (GSH), é um importante metabólito no combate as ROS especificamente ($O_2^{\bullet}$ e H_2O_2) via ciclo Halliwell-Asada, onde a enzima chave é a Glutathiona Redutase (GR) (LEA et al., 1998).

A enzima GR (NADPH: glutathiona oxidada) (E.C. 1.6.4.2.) (VALLEJOS, 1983) é uma enzima amplamente distribuída em procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994). A GR contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da glutathiona oxidada (GSSG) para glutathiona reduzida (GSH) (CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994, VOET; VOET, 1995), conforme a seguinte reação:

A importância da GR consiste em manter o equilíbrio GSH/GSSG na célula, pois a GSH é uma molécula que apresenta uma função essencial de manter as células no seu estado reduzido. Portanto, ela atua como agente antioxidante, seja interagindo diretamente com as ROS, como indiretamente reduzindo peróxidos através da ação da glutathiona peroxidase (FUJII et al., 2000; STEPHEN; JAMIESON, 1996; MEISTER, 1983 e STAMLER, 1994).

Foram realizados poucos trabalhos estudando GR em microrganismos, sendo relatado um aumento na atividade desta enzima sob elevada irradiação de UV (LESSER; STOCHAJ, 1990), deficiência de água (SMIRNOFF, 1993) e estresses promovidos por extremos de temperatura (RADY et al., 1994). Em *Anabaena doliolum*, entretanto, a exposição ao Cu promoveu um efeito negativo na atividade da GR (MALLICK; RAI, 1999).

2.1.5.4 Guaiacol peroxidase

As peroxidases são hemoproteínas que catalisam a oxidação de substrato concomitantemente à redução do peróxido de hidrogênio. O termo peroxidase inclui um grupo de enzimas capazes de catalizar a oxidação de componentes celulares, tais como H_2O_2 ou peróxidos orgânicos (KVARATSKHELLA et al., 1997). As peroxidases participam de vários processos metabólicos essenciais incluindo regulação do crescimento celular (GOLDBERG et al., 1986), lignificação (GRISEBACH, 1981), oxidação fenólica, defesa contra patógenos e proteção contra estresses (TEKCHANDANI; GURUPRASAD, 1998).

Em experimentos *in vitro*, a guaiacol catalisa a oxidação dos doadores de hidrogênio devido à ausência de substrato específico, no entanto, *in vivo* esta enzima pode utilizar o ascorbato como substrato para suas reações. Neste caso, a desintoxicação pode se tornar a função principal de algumas isoformas (FIELDES; GERHARDT, 1998). Como exemplos, podemos citar em plantas o aumento na atividade da guaiacol peroxidase na presença da radiação UV-B, constatado em *Hibiscus rosa-sinensis* e *Beta vulgaris* (PANAGOPOULOS; BORNMAN; BJORN, 1989). O aumento na atividade desta enzima pode ser devido à síntese da mesma, bem como devido à supressão da atividade de um inibidor natural da guaiacol peroxidase (TEKCHANDANI; GURUPRASAD, 1998). Sob condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade da peroxidase e às vezes, é a primeira enzima a ter atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado (SIEGEL, 1993). Em plantas, o aumento na atividade da GPX na presença da radiação UV-B, constatado em *Hibiscus rosa-sinensis* e *Beta vulgaris* (PANAGOPOULOS et al., 1989,1990). Entretanto, na maioria dos organismos, as principais funções das peroxidases não foram bem esclarecidas. Supõe-se que o estudo das alterações provocadas pela indução de estresses fisiológicos poderia contribuir para a melhor compreensão da ação específica das isoformas da guaiacol peroxidase (CAMPA, 1991).

2.1.6 *Aspergillus*

Os *Aspergillus* são amplamente espalhados na natureza. Economicamente importantes, são utilizados em numerosas fermentações industriais, incluindo a produção de ácido cítrico e de ácido glucônico. Crescem mesmo na presença de altas concentrações de açúcar e de sal, indicando que podem extrair água de substâncias relativamente secas (PELCZAR; CHAN; KRUG, 1997). O *Aspergillus* é um fungo capaz de crescer numa ampla variedade de substratos, muitos dos quais induzem a geração, em níveis elevados, de espécies reativas de oxigênio. Dentre esses indutores podem-se ressaltar os ácidos graxos, etanol, glicerol e ácido úrico.

Neurospora crassa e *Aspergillus niger* são entre os fungos filamentosos, os mais estudados (CHARY et al., 1994, HOLDON; HAY; HAMILTON, 1996, GESSLER et al., 2002, BAI; HARVEY; McNEIL, 2003). Esses fungos são bastante usados para a produção de componentes biológicos ativos (enzimas, ácidos orgânicos, antiobióticos, etc) (ANGELOVA et al., 2005). Entretanto, enquanto os fungos filamentosos possuem importância na área média e agricultura, pouco se sabe das respostas fisiológicas desses microrganismos a vários fatores que estimulam o estresse oxidativo (ANGELOVA et al., 2005). Fungos filamentosos apresentam um grande potencial na remediação de solos contaminados por metais pesados, devido principalmente à sua característica miceliar, além do fato de suportarem a toxidez causada por esses compostos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). Os fungos filamentosos tem a capacidade de acumular metais pesados e de translocá-los por meio do micélio

2.2 Materiais e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ecogenética de Resíduos Agroindustriais e Ecologia Humana, do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) em conjunto com o Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas dessa mesma universidade, respectivamente coordenados pelos professores Sílvia Maria Guerra Molina e Ricardo Antunes de Azevedo, responsáveis pelo referido setor no departamento.

2.2.1 Material biológico

Linhagem CadG1 do fungo *Aspergillus* sp., mutante isolado em estudos anteriores relacionados à presente dissertação, que deram início aos ensaios de microrganismos e metais pesados.

2.2.2 Meios de Cultura

2.2.2.1 Meio Completo

Preparado de acordo com Pontecorvo et al. (1953) e modificado por Azevedo; Costa (1973).

NaNO ₃	6,0 g
KHPO ₄	0,5 g
KCl.....	0,5 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	0,5 g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Glicose.....	10,0 g
Peptona.....	2,0 g
Caseína hidrolisada.....	1,5 g

Extrato de levedura.....	2,0 g
Solução de vitaminas.....	1,0 mL
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10% e o meio foi esterilizado em autoclave sob 1 atm por 20 minutos.

2.2.2.2 Meio mínimo líquido

Preparado de acordo com Pontecorvo et al., 1953, sem adição de ágar.

NaNO ₃	6,0g
KCl.....	0,5g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,5g
KH ₂ PO ₄	1,5g
FeSO ₄	100mg
ZnSO ₄	100mg
Glicose/ Dextrose.....	10g
Ágar (Difco- puro).....	15g
Água Destilada.....	1000mL

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 10% e o meio foi esterilizado em autoclave sob 1 atm por 20 minutos.

2.2.3 Soluções

2.2.3.1 Solução de vitaminas

Ácido nicotínico.....	10,0 mg
Ácido p-aminobenzóico.....	1,0 mg
Biotina.....	0,02 mg
Piridoxina.....	5,0 mg
Riboflavina.....	10,0 mg
Tiamina.....	5,0 mg
Água destilada.....	10,0 mL

As vitaminas foram adicionadas a água destilada previamente esterelizada, ferveu-se o frasco com a solução por 15 minutos conservando-o em refrigerador.

2.2.3.2 Solução de Tween 80

Tween 80.....	0,1 mL
Água destilada.....	100 mL

O tween foi dissolvido em água destilada e a solução obtida foi transferida para tubos de ensaio (2,5 mL da solução para cada tubo). Os tubos foram esterelizados em autoclave sob 1 atm por 20 minutos.

2.2.3.3 Solução salina

NaCl.....	0,85 g
Água destilada.....	100 mL

Foi adicionado um volume de 9,0 mL por frasco. Os frascos foram esterilizados em autoclave sob 1 atm por 20 minutos.

2.2.3.4 Solução de cloreto de cádmio 100 mM

CdCl ₂	2,283g
Água miliq.....	100mL

A solução foi mantida em frasco escuro no refrigerador.

2.2.4 Condições de cultivo para manutenção da linhagem

Em uma proveta autoclavada colocou-se 20 mL de meio de cultura (meio completo- item 2.2.2.1) e a essa quantidade de meio adicionou-se a solução de cloreto de cádmio (CdCl₂) na concentração de 0,3 mM. O meio foi então vertido para uma placa de petri e após sua solidificação foi feito o inóculo (3 pontos por placa) da linhagem sobre o meio. Após 5 dias de incubação à temperatura de 37°C essas placas foram utilizadas para os experimentos.

2.2.5 Suspensão de esporos

A suspensão de esporos foi preparada por meio da raspagem da superfície da cultura com alça de platina e ressuspensa em solução estéril de Tween-80 a 0.1% (v/v). A suspensão foi homogeneizada em vórtex e a padronização da concentração dos esporos foi feita com a utilização de um hemacitômetro (Câmara de Neubauer), obtendo-se uma concentração final em solução salina de 10⁷ conídios/mL.

2.2.6 Experimento básico

Foi feito o inóculo da suspensão de esporos (ajustada para inocular 3x10⁷ conídios/mL) em 100 mL de meio mínimo líquido (item 2.2.2.2) em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Tais recipientes foram dispostos em agitador rotatório à 37°C e 110rpm por períodos de tempo definidos e posteriormente o micélio foi separado do meio de cultura através de filtração à vácuo.

Para avaliação da atividade enzimática foram testados os efeitos das concentrações 0,0; 0,2; 0,6; 1,2; 2,0 mM de CdCl₂ nos tempos de exposição 6, 9, 12 e 24 e 48 horas, a partir de 12

horas de crescimento. O micélio obtido foi filtrado e congelado em nitrogênio líquido, para a realização da extração das proteínas para as análises enzimáticas.

2.2.7 Extração das enzimas

A extração enzimática foi feita a partir do micélio da linhagem CadG1. As células foram colocadas em almofariz e mantidas em nitrogênio líquido. Foi feita a maceração e em seguida foi adicionado tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 acrescido de 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 4% (p/v) de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 min a 4°C, utilizando-se uma centrífuga Beckman modelo J2-MC. O sobrenadante foi coletado dividido em alíquotas e congelados, sendo utilizado para as análises enzimáticas.

2.2.8 Determinação de proteínas

A concentração de proteína foi determinada em espectrofotômetro (modelo FENTO 700S) a 595 nm como descrito por Bradford (1976), utilizando-se o Kit da Bio-Rad e BSA como padrão.

2.2.8.1 Atividade da Catalase

A atividade de CAT foi avaliada pelo método PAGE não-desnaturante segundo Woodbury; Spencer; Stahmann (1971). As amostras tiveram suas proteínas separadas em PAGE não desnaturante (8%). Os tampões e géis de eletroforese foram preparados como descrito por Laemmli (1970).

A eletroforese foi conduzida a 4°C em corrente constante de 15 mA/placa em um tempo médio de corrida de 8 horas. Foram aplicados aos géis amostras de padrão de CAT de fígado bovino (2 unidades) e 0,3 mg de proteína do micélio. A revelação foi feita após a lavagem do gel com água deionizada por 45 minutos (3 x de 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos de solução de água deionizada e H₂O₂ a 0,003% temperatura ambiente e com agitação suave e constante. O gel foi então rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de 1% (p/v) de FeCl₃ e 1% (p/v) de K₃Fe(CN)₆ 1% (p/v), sob agitação.

Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água. A fixação foi feita com a imersão em uma solução de água deionizada e ácido acético a 7% por 15 minutos.

2.2.8.2 Atividade da Superóxido dismutase

A atividade de SOD foi determinada em PAGE não desnaturante e foi conduzida nas mesmas condições como descrito para catalase (item 2.2.8.2).

Foram aplicados aos géis 0,3 mg de proteína de extrato de micélio de fungo e amostras de padrão de SOD de fígado bovino (2 unidades). Após um tempo médio de 4 horas para eletroforese, os géis foram lavados em água destilada e incubados no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente, em uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 1mM de EDTA, 0,05 mM de riboflavina, 0,1 mM de NBT e 0,3% (v/v) de TEMED.

2.2.8.3 Atividade da glutathione redutase

A atividade de GR foi determinada pelo método espectrofotométrico (modelo FENTO 700S) conforme descrito por Azevedo et al. (1998).

A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente a 30°C em uma solução consistindo de 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de DTNB, 1 mM de GSSG e 0,1 mM de NADPH. A reação foi iniciada com a adição de 50 µL de extrato vegetal. A taxa de redução da GSSG foi monitorada pelo aumento, a cada segundo, na absorbância a 412 nm por 1 minuto. Os valores de atividade foram expressos em µmol/min/mg proteína.

2.2.8.4 Atividade de guaiacol peroxidase

A atividade de guaiacol peroxidase foi determinada de acordo com Matsuno; Uritani, (1972) padronizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado.

A solução contendo 0,375 mL de tampão fosfato-citrato (solução fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M) (pH 5,0), 0,025 mL de extrato vegetal, 0,025 mL de guaiacol 0,5% e 0,025 mL de H₂O₂ 3%, foi misturada em vortex e incubada por 15 minutos à

30°C. Em seguida, esta solução foi colocada em banho de gelo e adicionou-se 0,025 mL da solução de metabissulfito de sódio 2%, sendo em seguida misturada em vortex e colocada em repouso por 10 minutos. A leitura de absorbância foi em 450 nm e a atividade enzimática expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

2.2.9 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em blocos casualizados com 3 repetições e os dados quantitativos foram estatisticamente analisados através de análise de variância e regressão polinomial no programa SANEST.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Efeito da exposição ao cádmio sobre o peso seco do micélio da linhagem CadG1

Quanto à influência do cádmio sobre o crescimento da linhagem CadG1, observou-se que houve um efeito altamente significativo do tempo, dose e da interação entre esses fatores, todos apresentando $\text{prob.} > F = 0,00001$ (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias de massa micelial seca da linhagem CadG1 de *Aspergillus* sp. em ensaio de exposição ao Cd

Causas de variação	GL	QM	Prob.F
Tempo	4	32721,3	0,00001
Dosagem	4	22341,3	0,00001
Tempo*Dosagem	16	7494,6	0,00001
Resíduo	50	169,3	
Total	74		

Média= 123,2 C.V= 10,56%

A Figura 1 ilustra o efeito do cádmio sobre crescimento da linhagem ao longo do experimento.

Figura 1 - Efeito do cádmio sobre o peso seco do micélio da linhagem CadG1

No controle, sem exposição ao Cd, constatou-se um padrão de crescimento com ajuste linear ($\text{prob.}>F= 0,00001$; $R^2=0,83$) e também ajuste a uma regressão quadrática ($\text{prob.}>F= 0,00001$; $R^2=0,97$) indicando uma tendência de estabilização do crescimento, provavelmente em função dos limites de nutrientes no meio disponível dado o aumento do tempo de cultura. Entretanto o ajuste significativo, verificado até a regressão de 4º grau (tabela 2A) indica que houve alterações na intensidade de ganho de massa (modificação significativa no sentido da curva resultante) entre todos os tempos estudados, indicando correspondentes alterações na intensidade do crescimento ao longo do tempo.

Padrões semelhantes de crescimento foram observados nas dosagens de 0,2; 1,2 e 2,0 mM de CdCl_2 (Figura 1). Na dosagem 0,6 mM de CdCl_2 , houve um ajuste significativo a uma regressão quadrática ($\text{prob.}>F= 0,00001$; $R^2=0,99$). O padrão observado para essa dosagem sugere que após 24 horas de exposição a essa concentração do metal, deflagrou-se uma resposta de defesa que permitiu a retomada do crescimento até atingir níveis equivalentes aos do controle com 48 horas de exposição. Provavelmente a dosagem de 0,6 mM de CdCl_2 submete o metabolismo celular da linhagem estudada a um estresse ainda superável. De acordo com essa interpretação, o padrão delineado com exposição à dosagem de 0,2 mM de CdCl_2 e às duas maiores dosagens sugere que a menor delas não atingiu nível suficiente para ativar os mecanismos de defesa do fungo, embora tenha afetado o desenvolvimento do fungo, bem como que as duas maiores dosagens superaram essa capacidade do organismo nas condições estudadas.

Tabela 2 - Regressão Polinomial para médias de massa micelial seca da linhagem CadG1 exposta ao Cd em diferentes tempos de exposição

A. Níveis de dosagem			
Dosagem de CdCl ₂ (mM)	Prob>F	Equação de Regressão	R ²
0	0,00001	$y=86,463 + 5,027x$	1,00
	0,00001	$y=-7,588+16,263x-0,204x^2$	1,00
	0,00344	$y=-96,073+33,3953x-1,039x^2+0,010x^3$	0,98
	0,00001	$y = -471,670 + 150,0988 x - 12,5469x^2 + 0,4265x^3 - 0,0047x^4$	1,00
0,2	0,0040	$y=-48,827+23,690x-0,9123x^2+0,0106x^3$	0,99
0,6	0,00001	$y= 80,762 - 1,426x + 0,1233x^2$	0,99
1,2	0,00421	$y=105,4511 - 8,5021 + 0,6706 x^2 - 0,0104 x^3$	0,97
2,0	0,00567	$y=111,3956 - 8,6145 + 0,6487 x^2 - 0,0100 x^3$	0,93
B. Níveis de tempo			
Tempo de Exposição (h)	Prob>F	Equação de Regressão	R ²
6	n.s.	-	-
9	0,0354	$Y=143,33-362,77x+760,64x^2-597,22x^3+150,46x^4$	0,99
12	0,0041	$Y= 164,24 - 255,55x + 220,71x^2 - 57,40 x^3$	1,00
24	0,0004	$Y=256,66 - 876,38x + 1696,064 x^2 - 1210,64 x^3 + 283,56x^4$	1,00
48	0,00001	$Y=303,33 - 1567,81x + 4996,59 x^2 - 4804,56 x^3 + 1335,15x^4$	1,00

Conforme a tabela 2B., no tempo de 6 horas de exposição, não houve efeito significativo de dosagem de CdCl₂ sobre a massa seca acumulada. Já nos tempos de 9, 24, e 48 horas constatou-se uma redução da massa micelial, em relação aquela apresentada no tratamento controle, com ajuste a uma regressão de 4º grau, indicando diferenças significativas na intensidade de redução do crescimento entre todas as dosagens testadas (tabela 2B.). No tempo de 12 horas constatou-se uma redução da massa micelial em relação ao controle, com dados de variação da massa micelial que se ajustaria a uma regressão de 3º grau (tabela 2B.).

Silva; Basso (2004) estudando o efeito do cádmio sobre o crescimento e viabilidade de leveduras concluíram que esse metal foi tóxico para o microrganismo em todas as concentrações testadas (0,05; 0,1 e 0,5 Mm de CdC₄H₆OH 2H₂O) quando comparadas com o controle (0,0 mM). Os autores observaram também que o aumento das concentrações de cádmio esteve associado a reduções concomitantes na produção de álcool.

Resultados semelhantes foram observados em plantas por Oliveira et al. (2001), que estudaram a absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de aguapé e salvinia (*Eichrornia crassipes* e *Salvinia auriculata*). Nesse estudo, as taxas de crescimento relativo decresceram intensamente com o aumento da concentração de cádmio, nas duas espécies estudadas, especialmente em salvinia, na qual, a partir de concentrações de 5 μM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ já se observou um decréscimo significativo na capacidade de sobrevivência das plantas.

Chaoui et al. (1997) em estudo sobre o efeito do cádmio e do zinco na indução da atividade de enzimas antioxidantes em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) observaram que ambos os metais, nas doses usadas, 5 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ e 100 μM ZnSO_4 , causaram um decréscimo significativo no crescimento das plantas, comparadas com o controle (sem exposição aos metais). Lagriffoul et al. (1998) também observaram um decréscimo no crescimento da raiz e no peso seco em plantas de milho (*Zea mays* L.) expostas ao Cd na concentração de 25 μM . Resultado semelhante também foi observado por Zhao et al. (2005) estudando a toxicidade do cádmio em plântulas de trigo.

2.3.2 Efeito da exposição ao cádmio sobre a quantidade de proteínas totais extraídas do micélio da linhagem CadG1

Analizando a quantidade de proteínas totais extraídas do micélio da linhagem CadG1 exposta ao cloreto de cádmio em diferentes tempos e diferentes concentrações, observou-se que houve um efeito altamente significativo de tempo, dose e da interação entre esses fatores, todos apresentando $\text{prob.} > F = 0,00001$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância dos resultados provenientes das proteínas totais extraídas do micélio da linhagem CadG1

Causas de variação	GL	QM	Prob.F
Tempo	4	0,4998	0,00001
Dosagem	4	7,0171	0,00001
Tempo*Dosagem	16	0,4997	0,00001
Resíduo	48	0,0002	
Total	74		

Média= 1,1221 C.V= 1,408%

A figura 2 ilustra a quantidade de proteínas totais nos períodos de tempo e dosagens estudadas.

Figura 2 - Efeito dos tempos de (6, 9, 12, 24, 48 horas) de exposição ao cloreto de cádmio nas proteínas totais do micélio da linhagem CadG1 em diferentes dosagens

Tabela 4 - Regressão polinomial para proteína total extraída da linhagem CadG1 exposta ao metal pesado cádmio

A. Níveis de dosagem			
Dosagem de CdCl ₂ (mM)	Prob>F	Equação de Regressão	R ²
0	0,00001	$Y = 3,2923 - 1,0788 x + 0,1466 x^2 - 0,0060 x^3 + 0,000072 x^4$	1,00
0,2	0,00001	$Y = - 1,0123 + 0,7944 x - 0,0752 x^2 + 0,0106 x^3 - 0,000029 x^4$	1,00
0,6	0,00001	$Y = - 2,1199 + 1,1117 x - 0,1270 x^2 + 0,0049 x^3 - 0,000057 x^4$	1,00
1,2	0,00001	$Y = 0,7288 - 0,0497 x + 0,0039 x^2 - 0,000061 x^3$	0,99
2,0	0,00001	$Y = 2,7626 - 0,7952 x + 0,0855 x^2 - 0,0032 x^3 + 0,000038 x^4$	1,00
B. Níveis de Tempo			
Tempo de exposição (h)	Prob>F	Equação de Regressão	R ²
6	0,00001	$Y = 0,8833 + 6,6905 x - 18,8339 x^2 + 15,6167 x^3 + 3,9657 x^4$	1,00
9	0,00001	$Y = 1,5166 + 4,1129 x - 16,2093 x^2 + 14,8468 x^3 - 3,9558 x^4$	1,00
12	0,00001	$Y = 2,4866 - 3,4190 x - 3,8716 x^2 + 7,4031 x^3 - 2,4214 x^4$	1,00
24	0,00001	$Y = 2,0233 + 0,7986 x - 8,9803 x^2 + 9,6643 x^3 - 2,8067 x^4$	1,00
48	0,00001	$Y = 2,3166 - 2,2962 x + 5,9743 x^2 - 7,0701 x^3 + 2,1924 x^4$	1,00

Em todas as concentrações estudadas, com exceção de 1,2 mM de CdCl₂, houve um ajuste a uma regressão de 4º grau (prob.>F= 0,00001; R²=1,00) (Tabela 4A). Para a dosagem de 1,2 mM de CdCl₂ verificou-se um ajuste a uma regressão de 3º grau (prob.>F= 0,00001; R²=0,99) (Tabela 4A) indicando alteração na intensidade de produção de proteínas entre praticamente todas as dosagens avaliadas. O mesmo ocorreu para os tempos de exposição estudados, verificando-se um efeito altamente significativo de dosagem de CdCl₂ sobre a quantidade de proteína total constatando-se um ajuste a uma regressão de 4º grau (prob.>F= 0,00001; R²=1,00). Esses dados indicam diferenças altamente significativas na quantidade de proteína total entre todos os tempos testados (tabela 4B). A figura 2 mostra que na menor dosagem (0,2 mM de CdCl₂) e no menor tempo de exposição há uma maior quantidade de proteínas totais extraídas do micélio da linhagem CadG1 em relação ao tratamento controle, embora isto não tenha se refletido na manutenção da capacidade de crescimento da linhagem (Figura 1). A maior quantidade de proteínas totais em 0,2 mM de CdCl₂ torna-se menos evidente no próximo tempo de exposição ao metal (9 horas). No tempo de 12 horas ocorre um aumento na quantidade de proteínas totais no tratamento controle, que o faz superar a quantidade de proteínas na dosagem menor (0,2 mM de CdCl₂). Na concentração de 0,6 há uma queda na quantidade de proteínas totais até o tempo de 12

horas de exposição, sendo que após esse período, há um aumento na quantidade de proteínas aproximando-se da quantidade encontrada no tratamento controle. Esse dado está em concordância com os dados anteriores referentes ao efeito dessa dosagem sobre o crescimento da linhagem CadG1 (Figura 1). Provavelmente o aumento das proteínas totais após 12 horas de exposição ao metal na concentração 0,6 mM de CdCl_2 , indica uma resposta metabólica que possibilitou o aumento da massa micelial nos dois últimos tempos estudados.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, Romandini et al. (1992), estudando linhagens resistentes à exposição ao Cd, observou um aumento significativo de proteínas totais, especialmente na linhagem SS1090, seguida das linhagens SS1189 e S.C. em presença do cádmio, quando comparadas com o controle.

Em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), Chaoui et al. (1997) em estudo sobre o efeito conjunto do cádmio e do zinco na indução da atividade de enzimas antioxidantes observaram que a concentração de proteínas não foi afetada pelos metais nas folhas e no caule, enquanto que nas raízes houve um decréscimo na quantidade de proteínas comparado com o tratamento controle, indicando que as raízes são mais afetadas pelo estresse provocado por esses metais que as partes altas das plantas.

2.3.3 Efeito da exposição ao cádmio sobre a atividade da Superóxido Dismutase

A primeira enzima analisada foi a SOD. Nas condições estudadas, no período de 6 horas duas isoformas (I e II, Figura 3) de SOD foram identificadas, sofrendo alterações com o aumento das dosagens de cádmio (Figura 3). A isoforma 1 aumenta sua atividade conforme o aumento da dosagem do metal. A isoforma 2 sofre um pequeno aumento na sua expressão, sendo que na concentração de 0,6 mM de CdCl_2 ela apresenta a maior atividade. Na dose de 1,2 mM de CdCl_2 ela não aparece no gel e na maior dose (2 mM de CdCl_2) ela volta a aparecer. O tempo de 9 horas apresentou um padrão de atividade semelhante ao de 6 horas, com exceção da banda 2 na dosagem de 0,6 mM de CdCl_2 , que não apresentou maior atividade como no tempo de exposição anterior. Nos tempos de 12, 24 e 48 horas de exposição ao metal, observa-se uma diminuição de atividade desta enzima, principalmente nas duas maiores dosagens utilizadas. Com 12 horas já não aparece a segunda isoforma nas duas maiores concentrações. No tempo 24 horas, há apenas a isoforma 1 nas três maiores concentrações e no tempo de exposição de 48 horas, há apenas a

isoforma 1 e apenas nas duas menores concentrações e no controle, sendo que neste último, muito menos intensa do que nas concentrações de 0,2 e 0,6 mM de CdCl₂.

Balestrasse et al., (2005) estudando o efeito do Cd nas enzimas antioxidantes em nódulos de soja, demonstraram que na dose de 200 µM de CdCl₂ houve uma diminuição na atividade de SOD, em comparação com o tratamento controle. Já na dose de 50 µM, não houve alteração da atividade enzimática em relação ao controle.

Pelah; Cohen (2005) estudando a resposta celular de *Chlorella zofingiensis* à exposição ao selênio concluíram que quando células desse microrganismo são expostas ao selênio, ocorre a indução de enzimas antioxidantes nas células. Esses autores também concluíram que o acúmulo de ROS na célula foi prevenido pelo aumento da atividade de SOD.

Angelova et al. (2005), estudando a resposta de fungos filamentosos ao estresse induzido pelo peróxido de hidrogênio e paraquat, observaram que as respostas celulares contra o estresse provocado pelo peróxido de hidrogênio e paraquat aumentou a expressão das enzimas SOD e CAT, que são enzimas chaves na defesa contra as ROS.

Lyjun et al. (2005) estudaram atividades de enzimas antioxidantes após tratamento de *Oxya chinensis* (Orthoptera Acridoidae) com diferentes concentrações de cádmio e concluíram que houve mudança na atividade de SOD e CAT depois da exposição dos insetos ao metal. A atividade de SOD aumentou nas baixas concentrações utilizadas ($0,55 \times 10^{-4} \text{ gg}^{-1}$, $1,10 \times 10^{-4} \text{ gg}^{-1}$ de peso seco do inseto) e não foi induzida nas altas concentrações ($2,20 \times 10^{-4} \text{ gg}^{-1}$, $2,75 \times 10^{-4} \text{ gg}^{-1}$ de peso seco). Com o aumento das concentrações de cádmio, constatou-se aumento da atividade da enzima CAT. Os autores concluíram que alterações no nível de enzimas antioxidantes sob estresse ambiental servem como indicadores de estresse biótico e(ou) abiótico.

Rabotti; Ballarin-Dente (1997) também comenta que o monitoramento das respostas de enzimas antioxidantes pode ser uma boa ferramenta para se diagnosticar o estresse oxidativo causado pela poluição e para se avaliar a qualidade de diversos ambientes. Zhao et al. (2005) estudando a toxicidade do cádmio em plântulas de trigo não observaram mudanças significativas na atividade de SOD em todas as amostras estudadas.

Figura 3 – Gel de atividade da SOD, onde A, B, C, D e E correspondem aos períodos de exposição de 6, 9, 12, 24 e 48 horas de exposição e (a) representa o padrão de SOD de fígado bovino; 1, 2, 3, 4 e 5 representam respectivamente as concentrações de 0; 0,2; 0,6; 1,2 e 2,0 mM de CdCl_2

2.3.4 Efeito da exposição ao cádmio sobre a atividade da Catalase

Conforme visto na Figura 4, a linhagem CadG1 apresentou uma das isoformas (I, Figura 4) da enzima CAT no tempo de 6 horas. Nesse mesmo período de exposição ao metal, houve um aumento da atividade dessa enzima nas diferentes dosagens de cádmio comparadas com o tratamento controle. Esse aumento manteve-se constante em todas as concentrações. No período de 9 horas também houve aumento na isoforma sendo que esse aumento tornou-se mais expressivo nas concentrações de 1,2 e 2,0 mM de CdCl_2 . No tempo de 12 horas, na concentração de 0,6 mM de CdCl_2 , apareceu mais uma isoforma (II, Figura 4), que também manteve-se nos tempos de 24 e 48 horas. Esse resultado está em concordância com o aumento da quantidade de proteínas totais na concentração de 0,6 mM de CdCl_2 após 12 horas de exposição ao metal (Figura 2). Nos dois últimos tempos de exposição também apareceu mais uma isoforma, na concentração de 1,2 mM de CdCl_2 .

Kapoor et al. (1990), estudando o fungo *N. crassa*, afirmaram que o cádmio gera diretamente o H_2O_2 . No presente trabalho, a quantidade de H_2O_2 provavelmente gerada pelo cloreto de cádmio na concentração de 0,6 mM de CdCl_2 , após 12 horas de exposição, permitiu o aparecimento de mais uma isoforma de catalase que auxiliou na destoxificação do H_2O_2 gerado pelo metal, sendo que essa destoxificação possibilitou o aumento da massa micelial nos dois últimos tempos estudados (Figura 1).

Calera et al. (2000), em estudo de caracterização da catalase B (CatB) do *A. nidulans*, que é codificada pelo gene *catB*, observaram a presença dessa enzima no micélio do fungo, a qual tem sua atividade aumentada durante a formação do conídio, mas, praticamente não é detectada nos esporos. Esses autores também concluíram que a expressão do gene *catB* é induzida pelo H_2O_2 ou condições associadas à geração desse, não apresentando controle regulatório pós-transcricional. O *A. nidulans* apresenta também a catalase A (CatA), que é codificada pelo gene *catA*, induzido especificamente durante a esporulação e em resposta a diferentes tipos de estresses. Tal resultado está em concordância com Michán et al. (2002) que estudando a regulação de dois genes da catalase (*cat-1* e *cat-3*) em *N. crassa* também observaram um aumento na atividade dessa enzima durante a fase de formação do conídio. Esses autores constataram que os conídios possuem uma atividade de catalase 60 vezes maior que a encontrada em hifas em desenvolvimento. Também observaram que a atividade de *cat-1* é predominante nos conídios,

durante a germinação e no começo do crescimento exponencial, já a atividade de cat-3 predomina durante a fase final do crescimento exponencial e no começo do processo de formação dos conídios.

Já Kawasaki; Aguirre (2001) caracterizaram um terceiro gene de catalase em *A. nidulans*, o cat C, que codifica uma pequena subunidade monofuncional de catalase, localizada nos peroxissomos. Esses autores observaram que esse gene mostra um padrão relativamente constante de expressão ao longo do desenvolvimento do fungo, sendo que ele não foi induzido por estresse oxidativo ou outros tipos de estresse (condições nutricionais, estresse osmótico e crescimento em Tween 80), possuindo expressão constante sob diferentes condições. Também afirmam que a destoxificação do H_2O_2 é um aspecto fundamental da resposta antioxidante celular, na qual as catalases desempenham função preponderante.

Emri; Pocs; Szentirmai (1997), estudando a resposta de *Penicillium chrysogenum*, à exposição a peróxidos, observaram elevada atividade da CAT e atribuíram a esse fato, a acentuada resistência desse organismo ao estresse oxidativo decorrente da exposição a peróxidos. Em Noventa-Jordão et al. (1999), observou-se que o tratamento com H_2O_2 aumentou a viabilidade de germinação do *A. nidulans* após tratamento com calor (heat shock), enquanto mutantes deficientes em CAT foram mais sensíveis à exposição ao calor. Concluiu-se que a defesa contra os efeitos letais da exposição ao calor pode estar correlacionada com a atividade do sistema de defesa contra o estresse oxidativo, e neste caso, à atividade de CAT. Romandini et al. (1992), em trabalho com *S. cerevisiae*, detectaram variações significativas na atividade de CAT após tratamento da levedura com cádmio.

Chaoui et al. (1997) estudando o efeito do cádmio e do zinco na indução da atividade de enzimas antioxidantes em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) detectaram alteração na atividade de CAT após tratamento com os metais. Por outro lado, a atividade de GPx foi fortemente estimulada no caule.

Figura 4 – Gel de atividade da CAT, onde A, B, C, D e E correspondem aos períodos de exposição de 6, 9, 12, 24 e 48 horas de exposição e (a) representa o padrão de CAT bovina; 1, 2, 3, 4 e 5 representam respectivamente as concentrações de 0; 0,2; 0,6; 1,2 e 2,0 mM de CdCl_2

2.3.5 Efeito da exposição ao cádmio sobre a atividade da Glutathione Redutase

Quanto à atividade da enzima glutathione redutase no micélio da linhagem CadG1 exposta ao cádmio em diferentes tempos e diferentes concentrações, observou-se um efeito altamente significativo de tempo, dose e da interação entre esses fatores, todos apresentando $\text{prob.} > F = 0,00001$ (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de variância dos resultados provenientes da atividade de glutathione redutase do micélio da linhagem CadG1

Causas de variação	GL	QM	Prob.F
Tempo	4	10,2949	0,00001
Dosagem	4	33,5805	0,00001
Tempo*Dosagem	16	3,9304	0,00001
Resíduo	50	0,0124	
Total	74		

Média= 2,5541 C.V= 4,373%

A figura 5 mostra a atividade da enzima glutathione redutase nas concentrações e nos tempos estudados.

Figura 5 - Efeito dos tempos de exposição e dosagens de Cd sobre a atividade de Glutathione Redutase na linhagem CadG1

A atividade da enzima glutathiona redutase no tratamento controle (0 mM de CdCl_2), embora existente (em torno de 1 $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$) não apresentou alterações significativas entre as diferentes dosagens estudadas (Figura 3, Tabela 6A). Em todas as demais concentrações estudadas houve um efeito altamente significativo do cádmio sobre a atividade dessa enzima, com ajustes a uma regressão de 4º grau ($\text{prob.}>F = 0,00001$) (Tabela 6A). Em todos os tempos de exposição estudados, houve efeito significativo de dosagem de CdCl_2 sobre a atividade da enzima GR constatando-se um ajuste a uma regressão de 4º grau ($\text{prob.}>F = 0,00001$, $r^2=1,00$), indicando diferenças significativas na atividade dessa enzima, entre todos os tempos testados (Figura 3, Tabela 6B). Observa-se na Figura 3 que nas maiores concentrações de CdCl_2 testadas (0,6; 1,2 e 2,0 mM de CdCl_2) ocorreu uma maior atividade dessa enzima em relação ao controle e a menor dosagem (0,2 mM CdCl_2), com variações da atividade entre esses tempos, sugerindo que essa enzima é ativada quando se submete o microrganismo às altas dosagens de Cd, o que provoca um estresse, ativando o sistema de resposta antioxidante. O pico de GR observado com 12 horas de exposição à dosagem de 0,6 mM de CdCl_2 coincide com o pico de proteína total observado nessas mesmas condições experimentais (Figura 1) indicando que provavelmente a resposta antioxidante que permitiu o crescimento micelial posterior deveu-se à atividade de GR.

A glutathiona é uma molécula antioxidante importante na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, segundo Stephen; Jamieson (1996), que observaram que mutantes deficientes na síntese de glutathiona mostraram-se hipersensíveis ao H_2O_2 e aos ânions superóxido, na fase exponencial e na fase estacionária do crescimento da cultura. Esses autores ressaltaram ainda que tanto as mudanças nos níveis de GSH como na relação GSH/GSSG podem ser sentidas pela célula e utilizadas como sinal para induzir a resposta adaptativa ao estresse. Kawasaki; Aguirre (2001) afirmam que as catalases e as peroxidases são os mais importantes sistemas enzimáticos usados para degradar o H_2O_2 .

Tabela 6 - Regressão polinomial para a atividade de GR extraída da linhagem CadG1 exposta ao metal pesado cádmio

A. Níveis de dosagem			
Dosagem de CdCl ₂ (mM)	Prob>F	Equação de Regressão	R ²
0	n.s	-	-
0,2	0,00001	$Y = 15,2364 - 4,0537 x + 0,3791 x^2 - 0,0133 x^3 + 0,00014 x^4$	1,00
0,6	0,00001	$Y = 26,6703 - 7,8760 x + 0,8374 x^2 - 0,0316 x^3 - 0,00036 x^4$	1,00
1,2	0,00001	$Y = 48,9620 - 12,3501 x + 1,1262 x^2 - 0,0391 x^3 + 0,00043 x^4$	0,99
2,0	0,00001	$Y = -26,8205 + 9,1778 x - 0,8586 x^2 + 0,0297 x^3 + 0,00032 x^4$	1,00
B. Níveis de Tempo			
Tempo de exposição (h)	Prob>F	Equação de Regressão	R ²
6	0,00001	$Y = 1,0181 + 6,0613 x - 11,7896 x^2 + 16,4098 x^3 + 5,8706 x^4$	1,00
9	0,00001	$Y = 1,2013 - 8,1089 x + 35,0690 x^2 - 33,5575 x^3 + 9,3099 x^4$	1,00
12	0,00001	$Y = 1,0039 - 7,2897 x + 53,1243 x^2 + 56,9902 x^3 - 16,3300 x^4$	1,00
24	0,00001	$Y = 0,5392 + 0,5097 x + 2,4237 x^2 - 14,9569 x^3 - 16,3300 x^4$	1,00
48	0,00001	$Y = 0,5139 - 4,7422 x + 22,1581 x^2 - 19,8385 x^3 + 5,0820 x^4$	1,00

Em plantas, Smeets et al. (2005), estudaram em plântulas de *Phaseolus vulgaris* os efeitos causados pela exposição a baixas concentrações de Cd (2 µM) no meio de cultura. Após a exposição ao metal, enzimas antioxidantes foram ativadas. A atividade de GR aumentou significativamente após 24 horas de exposição ao metal. O tratamento com Cd causou um acúmulo de glutathione nas folhas primárias; sendo que o nível máximo alcançado foi em 48 horas depois do início do tratamento. Depois desse tempo, observou-se um decréscimo desse acúmulo nas plantas tratadas com Cd em relação ao controle. De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho de Smeets et al. (2005), a exposição ao Cd provoca distúrbio no ambiente redox celular nas folhas primárias de *Phaseolus vulgaris*.

Upadhyay; Panda (2005) estudaram a tolerância ao sal nas espécies aquáticas *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*. Concluíram que nas plantas expostas a 200 mM de NaCl houve um aumento nas atividades de SOD, GR, CAT e GPx, indicando que houve um desenvolvimento do sistema antioxidante de defesa contra o agente que provocou estresse, nesse caso, o sal NaCl.

Balestrasse et al. (2005) estudando o efeito do Cd nas enzimas antioxidantes em nódulos de soja, demonstrou que na dose de 200 µM de CdCl₂ houve uma diminuição na atividade de GR,

comparado com o tratamento controle. Já na dose de 50 μM , não houve alteração da atividade enzimática em relação ao controle.

Em células de fumo cv BY-2 expostas ao Cd, observou-se o aumento da atividade de GR na concentração de 0,200 mM, sendo que esse aumento ocorreu no início da exposição ao metal. Essa é uma resposta comum ao cádmio, com o consumo da glutathione para produção de fitoquelatinas (GRATÃO, 2003).

2.3.6 Efeito da exposição ao cádmio sobre a atividade da Guaiacol Peroxidase

Nas condições estudadas, a linhagem CadG1 de *Aspergillus* sp. não apresentou atividade da enzima guaiacol peroxidase. O mesmo resultado foi observado por Guelfi (2001) em estudo sobre enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Aspergillus* sp. na presença do metal pesado cádmio.

Estudando enzimas no micélio do fungo *Botrytis cinerea* capazes de quebrar o H_2O_2 , Gilad et al. (2000), encontrou três peroxidases distintas na especificidade no seu substrato. A atividade de guaiacol peroxidase foi maior em um pH de 3,5 à 4,5.

Balestrasse et al., 2005 estudando o efeito do Cd nas enzimas antioxidantes em nódulos de soja, demonstrou que na dose de 200 μM de CdCl_2 houve uma diminuição na atividade de guaiacol peroxidase, comparado com o tratamento controle. Já na dose de 50 μM , não houve alteração da atividade enzimática em relação ao controle.

Zhao et al. (2005) estudando a toxicidade do cádmio em plântulas de trigo observaram indução na atividade de peroxidases nas folhas conforme se aumentou a concentração do metal.

3. CONCLUSÕES

O presente trabalho caracterizou o efeito de maiores dosagens de CdCl_2 que as anteriormente testadas, sobre a linhagem CadG1 de *Aspergillus* sp., confirmada, pelos resultados obtidos neste estudo, como superior com relação à resistência a esse metal.

Quanto ao desenvolvimento micelial e proteínas totais:

Constatou-se que houve influencia do cádmio sobre o crescimento da linhagem CadG1 e sobre a quantidade de proteínas totais extraídas do micélio dessa linhagem, influência esta diferenciada em função da dosagem;

- na dosagem de 0,6 mM de CdCl_2 e no tempo de 24 horas de exposição houve uma resposta de defesa que permitiu a retomada do crescimento até atingir níveis equivalentes aos do controle; nas demais dosagens (0,2, 1,2 e 2,0 mM de CdCl_2) houve severa inibição do desenvolvimento da massa micelial;

- houve um aumento das proteínas totais após 12 horas de exposição ao metal na concentração 0,6 mM de CdCl_2 , indicando uma resposta metabólica que possibilitou o aumento da massa micelial nos dois últimos tempos estudados; nas demais dosagens (0,2, 1,2 e 2,0 mM de CdCl_2) houve severa inibição da quantidade de proteínas totais;

Quanto às respostas de defesa antioxidante:

Constatou-se que houve influência do cádmio sobre a atividade das enzimas do sistema antioxidante, influência esta diferenciada em função da dosagem e tipo de enzima;

- nos tempos de 12, 24 e 48 horas de exposição ao metal, observa-se uma diminuição de atividade de SOD em relação ao controle, principalmente nas duas maiores dosagens utilizadas;

- a linhagem quando exposta ao Cd apresentou aumento na atividade das enzimas CAT e GR; o aumento observado foi tanto maior quanto maiores foram dosagens do metal;

- a linhagem não apresentou atividade da enzima GPx, nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, J.; RÍOS-MOMBERG, M.; HEWITT, D.; HANSBERG, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.13, p. 111-118, 2005.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Molecular responses to reactive oxygen species: multifaceted changes in gene expression. In: KOK, L.J.; STULEN, I. (Ed.) **Responses of plant metabolism to air pollution and global change**. Leiden: Backhuys Publishers, 1998, p.233-240.

AMADO FILHO, G.M.; ANDRADE, L.R.; KAREZ, C.S.; FARINA, M.; PFEIFFER, W.C. Brown algae species as biomonitors of Zn and Cd at Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Environmental Research**, Barking, v.48, p.213-224, 1999.

ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SLOKOSKA, L. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus niger* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.26, p.544-549, 2000.

ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SPASOVA, B.K.; VASSILEV, S.V. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Micology Research**, London, v.109, p.150-158, 2005.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: Nacional, 1973, 288p.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.104, p.280-292, 1998.

BALESTRASSE, K.B.; NORIEGA, G.O.; BATLLE, A.; TOMARO, M.L. Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules. **Free radical research**, Londres, v.39, p.145-451, 2005.

BAY, Z.HARVEY, L.M.; McNEIL, B. Physiological responses of chemostat cultures of *Aspergillus niger* (B1-D) to stimulated and actual oxidative stress. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.82, p. 691-701, 2003

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide-dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.43, p.83-116, 1992.

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**, New York, v.72, p.248-259, 1976.

CALERA, J.A.; SÁNCHEZ-WEATHERBY, J.; LÓPES-MEDRANO, R.; LEAL, F. Distinctive properties of the catalase B of *Aspergillus nidulans*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.475, p.117-120, 2000.

CAMPA, A. Biological roles of plant preoxidases: known and potential function. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.E.; GRISHAM, M.B. (Eds.). **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 25-50.

CARVALHO, C.E.V.; LACERDA, L.D.; GOMES, M.P. Heavy-metal contamination of the marine biota along the Rio-de Janeiro coast, Se-Brazil. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v.57, p.645-653, 1991.

CASTILHO, F.J. Peroxidases and stress. In: PENEL, C.; GASPAR, T.H.; GREPPIN, H. **Plant Peroxidases: topics and detailed literature of molecular, biochemical, and physiological aspects**, Geneva: University of Geneva, 1992, chap. 4, p.187-203.

CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORBAL, M.H.; EL FERJANI. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Clare, v.127, p. 139-147, 1997.

CHARY, P.; DILLON, D.; SCHROLDER, A.L.; NATVIG, D.O. Superoxide dismutase (sod 1) null mutants of *Neurospora crassa*: oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation rate and response to mutagens. **Genetics**, Bethesda, v. 157, p. 723-730, 1994.

CHAUDIÉRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.37, p.949-962, 1999.

CHEN, S.L.; KAO, C.H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedling root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v.16, p.249-252, 1995.

CREISSEN, G.P.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.M. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.343-364.

DAMIEN, C.; CHANTAL, V.H.; PIROUZ, S.; ZERIMECH, F.H.; LAURENCE, J.; JEAN, M.H. Cellular impact of metal trace elements in terricolous lichen *Diploschistes muscorum* (Scop) R. Sant.- identification of oxidative stress biomarkers. **Water air soil pollution**, Dordrecht, v.152, p. 55-69, 2004.

DI TOPPI, L.S.; LAMBARDI, M.; PAZZAGLI, L.; CAPPUGI, G.; DURANTE, M.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in carrot *in vitro* plants and cell suspension cultures. **Plant science**, Amsterdam, v.137, p.119-129, 1999.

DÖNMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of Koper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, Oxon, v.35, p.135-142, oct.1999.

EMRI, T.; POCSI, I.; SZENTIRMAI, A. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.23, p.809-814, 1997.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educ, 2004. 510 p.

FERGUSON, J.E. **The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects**. Pergamon Press, 1990. 614p.

FIELDER, M.A.; GERHARDT, K.E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. **Plant Science**, Amsterdam, v.132, p.89-99, 1998.

FRUGOLI, J.A.; ZONGH, H.H.; NUCCIO, M.L.; McCOURT, P.; McPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; McCCLUNG, C.R. Catalase is encoded by multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

FUJII, T.; HAMAOKA, R.; FUJII, J.; TANIGUCHI, N. Redox capacity of cells affects inactivation of glutathione reductase by nitrosative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.378, p.123-130, 2000.

GADD, G.M. Biosorption. **Chemistry and Industry**, London, v.13, p. 421-427, 1990.

GESSELER, N.N.; SOKOLOV, A.V.; BYKHOVSKII, V.; BELOZERSKAIA, T.A. Superoxide dismutase and catalase activities in carotenoid-synthesizing fungi *Blakeslea trispora* e *Neurospora crassa* under the oxidative stress. **Prikladnaya Biokhimiya I Mikrobiologiya**, Bethesda, v.38, p. 237-242, 2002.

GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **The Plant Journal**, London, v.15, p.591-602, 1998.

GIL-AD, N.L.; BAR-NUN, N.; NOY, T.; MAYER, A.M. Enzymes of *Botrytes cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 190, p. 121-126, 2000.

GOLDBERG, R.; IMBERTY, A.; LIBERMAN, M.; PRAT, R. Relationship between peroxidase activities and cell wall plasticity. In: GREPIN, H.; PENEL, C.; GASPER, T. (Eds.). **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**, Boca Raton: CRC Press, 1986. p.208-220.

GRATÃO, P.L. **Análise da resposta antioxidativa de células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas ao cádmio**. 2003, 109 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GRISEBACH, H. Lignins. In: CONN, E.E. (Ed.). **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1981. v.7, p.457-478.

GUELFÍ, A. **Análise das enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Aspergillus* sp. na presença do metal pesado cádmio**. 2001, 60 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GUELFÍ, A.; AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J.; MOLINA, S.M.G. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.49, p. 63 – 73, 2003.

GUIDOT, D.M.; McCORD, J.M.; WRIGHT, R.M.; REPINE, J.E. Absence of electron transport (Rho^o satate) restores growth of a manganese-Superoxide dismutase- deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.268, p.26699-26703, 1993.

HOLDOM, M.D.; HAY, R.J.; HAMILTON, A.J. The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.64, p.3326-3332, 1996.

ISTOMIM, A.V.; IUDINA, T.V.; NIKOLAEVA, N.I.; KHAMIDULIN, R.S.; AGMINA, R.S. Ilygienic aspects of safe use of agrochemicals. **Vopr Pitan**, Geneva, v.68, p.41-44, 1999.

KAPOOR, A.; SREENIVASAN, G.M.; GOEL, N.; LEWIS, J. Development of thermotolerance in *Neurospora crassa* by heat shock and other stresses eliciting peroxidase induction. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 172, p.2798-2801, 1990.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, D.; CULLIMORE, D.R. Removal of heavy metals using *Aspergillus niger*. **Bioresourse Technology**, Essex, v.70, p.95-104, 1998.

KAWASAKI, L.; AGUIRRE, J. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, p. 1434-1440, 2001.

KEFALA, M.I.; ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A. Biosorption of cadmium ions by *Actinomycetes* and separation by flotation. **Environmental Pollution**, London, v.104, p.283-293, 1999.

KUMAR, R.; PANT, N.; SRIVASTAVA, S.P. Chlorinated pesticides and heavy metals in human sêmen. **International Journal of Andrology**, London, v.23, p. 145-149, 2000.

KVARATSKHELLA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R.N.F. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.114, p.1237-1245, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; MENCH, M.; VANGRONSVELD, J. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). **Plant and soil**, Netherlands, v.200, p. 241-250, 1998.

LEA, P.J.; WELLBURN, F.A.M.; WELLBURN, A.R.; CREISSEN, G.P.; MULLINEAUX, P.M. Use of transgenic plants in the assessment of responses to atmospheric pollutants. In: Kok, L.J.; Stulen, I. **Responses of plant metabolism to air pollution and global change**. Leiden: Backhuys Publishers, 1998. chap.5, p.241-250.

LESSER, M.P.; STOCHAJ, W.R. Protoadaptation and protection against active forms of oxygen in the symbiotic prokaryote *Prochloron* sp. And its ascidian host. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p. 1530-1535, 1990.

LIJUN, L.; XUEMEI, L.; YAPING, G.; ENBO, M. Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera Acridoidae). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Netherlands, v.20, p.412-416, nov. 2005.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e metais pesados: mitos, mistificação e fatos. São Paulo: Produquímica, 1994. 153p.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.157, p.183-193, 2000.

MALLICK, N.; RAI, L.C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to cooper. **Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.1555, p.146-149, 1999.

MANO, E.B.; PACHECO, E.B.A.V.; BONELLI, C.M.C. **Meio ambiente, poluição e reciclagem**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. 182p.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Ireland, v.133, p.83-104, 2000.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.13, p.1091-1101, 1972.

MATTIAZO-PREZOTO, M.E. **Comportamento de cobre, cádmio, crômio, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH**. 1994. 197p. Tese (Livres-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

MEGHARAJ, K.V.M.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. **Advances in Environmental Research**, Netherlands, v.8, p.121-135, 2003.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**, New York, v. 220, p.472-477, 1983.

MICHÁN, S.; LLEDÍAS, F.; BALDWIN, J.D.; NATVIG, D.O.; HANSBERG, W. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.33, p.521-532, 2002.

MULIUNEAUX, P.M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants**. Flórida: CRC Press, 1994, p. 275-315.

NASCIMENTO, C.W.A.; PEREIRA, J.B.M. Absorção e distribuição de cádmio e micronutrientes em cultivares de feijoeiro expostas a doses de cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, p.1303-1308, dez. 1997.

NETO, J.A.B.; SMITH, B.J.; MCALLISTER, J.J. Heavy metal concentrations in surface sediments in a nearshore environment, Jurujuba Sound, Southeast Brazil. **Environmental Pollution**, London, v.109, p.1-9, 2000.

NOVENTA-JORDÃO, M.A.; COUTO, R.M.; GOLDMAN, M.H.; AGUIRRE, J.; IYER,S.; CAPLAN, A.; TERENCEZ, H.F.; GOLDMAN, G.H. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. **Microbiology**, London, v.145, p.3229-3234, 1999.

OLIVEIRA, J.A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; JORDÃO, C.P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvínia. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v.13, p.329-341, 2001.

OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, A.P.E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 291-301, 2003.

OZIEWACZ, H.D. Mitochondrial functions and aging. **Gene**, London, v. 286, p.65-71, mês 2002.

PAGE, A.L.; BINGHAM, F.T. Cadmium residues in the environment. **Residue Reviews**. New York, v.48, p.1-44, 1973.

PANAGOPOULOS, I.; BORNMAN, J.F.; BJORN, L.O. Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultraweek luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. **Jornal of Photochemistry and Photobiology**, Lousanne, v.8, p.73-87, 1990.

PELAH, D.; COHEN, E. Cellular response of *Chlorella zofingiensis* to exogenous selenium. **Plant Growth Regulation**, Netherlands ,v.45, p.225-232, 2005.

PELCZAR, M.J.J.; CHAN, E.C.S.; KRUG, N.R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makran Books.1997.

PENNINCKX, M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. **Enzyme and Microbiol Technology**, Surrey, v.26, p.737-742, 2000.

PERIN, G.; FABRIS, R.; MANENTE, S.; WAGENER, A.R.; HAMACHER, C.; SCOTTO, S. A five-year study on the heavy-metal pollution of Guanabara Bay sediments (Rio de Janeiro, Brazil) and evaluation of the metal bioavailability by means of geochemical. **Water Research**, New York, v.31, p.3017-3028, 1997.

PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T.C.S.; LEITÃO, M.A.S.; OKAMOTO, O.K.; MORSE, D.; COLEPICCOLO, P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, Baltimore, v.39, p.1008-1018, 2003.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v.5, p.141-238, 1953.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.35, p.525-545, 1995.

RABOTTI, G.; BALLARIN-DENTI, A. Biochemical responses to abiotic stress in beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves. **Chemosphere**, Oxford, v.36, p. 871-875, 1997.

RADY, A.A.; EL-SHEEKH, M.M.; MATROVICS, B. Temperature shift-induced changes in the antioxidant enzyme system of cyanobacterium *Synechosystis* PCC6803. **International Journal Biochemistry**, Bristol, v.26, p. 433-435, 1994.

ROMANDINI, P.; TALLANDINI, L.; BELTRAMINI, M.; SALVATO, B.; MANZANO, M.; DE BERTOLDI, M.; ROCCO, G.P. Effects of Cooper and cadmium on growth, superoxide dismutase and catalase activities in different yeast strains. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Tarrytown, v.103, p.255-262, 1992.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.7-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C.H.; MULIUNEUX, P.M. (Ed). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Flórida: CRC Press, 1994, p. 275-315

SCHUTZENDUBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, D.L.; POLLE, A. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, p.887-898, 2001.

SHIMBO, S.; ZHANG, Z.W.; MOON, C.S.; WATANABE, T.; NAKATSUKA, H.; MATSUDA-INOGUCHI, N.; HIGASHIKAWA, K.; IKEDA, M. Correlation between urine and blood concentrations, and dietary intake of cadmium and lead among women in the general population of Japan. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Verlag, v.73, p. 163-170, 2000.

SILVA, S.M.; BASSO, L.C. Efeitos do cádmio sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904, e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, p.16-22, 2004.

SIQUEIRA, J.O. **Microrganismos e processos biológicos no solo: perspectiva ambiental**. Brasília: EMBRAPA, p.59-62, 1998.

SMEETS, k.; CUYPERS, A.; LAMBRECHTS, A.; SEMANE, B.; HOET, P.; LAERE, A.V.; VANGRONSVELD, J. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after cadmium application. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.43, p. 437-444, 2005.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, London, v.125, p. 27-28, 1993.

STAMLER, J. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, Cambridge, v.78, p. 931-936, 1994.

STEPHEN, D.W.S.; JAMIESON, D.J. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.141, p. 207-212, 1996.

TEKCHANDANI, S.; GURUPRASAD, K.N. Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons. **Plant Science**, Amsterdam, v.136, p.131-137. 1998.

UPADHYAY, R.K.; PANDA, S.K. Salt tolerance of two aquatic macrophytes, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*. **Biologia Plantarum**, Netherlands, v.49, p.157-159, 2005.

VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding, part A**. Amsterdam, 1983. p.469-516.

VERDUYN, C.; GIUSEPPIN, M.L.F.; SCHEFFERS, A.; VAN DIJKEN, J.P. Hydrogen peroxide metabolism in yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.54, p.2086-2090, 1988.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**, 2.ed. New York: John Wiley, 1995. 1361p.

WAISBERG, M.; JOSEPH, P.; HALE, B.; BEYERSMANN, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, Ireland, v.192, p.95-117, 2003.

WILSON, S.C.; JONES, K.C. Biorremediation of the soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PHAs). **Environmental Pollution**, London, v.81, p. 229-249, 1993.

WOODBURY, W.; SPENCER, A.K.; STAHMANN, M.A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isosymes. **Analytical Biochemistry**, New York, v.44, n.1, p.301-305, 1971.

ZHAO, Z.Q.; ZHU, Y.G.; KNEER, R.; SMITH, S.E. Effect of zinc on cadmium toxicity-induced oxidative stress in winter wheat seedlings. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.28, p.1947-1959, nov. 2005.