

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

Análise da resposta antioxidativa de células *in vitro* de fumo (*Nicotiana tabacum*
cv BY-2) submetidas ao metal pesado níquel

Georgia Bertoni Pompeu

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ecologia de Agroecossistemas. Área de
concentração: Ecologia de Agroecossistemas

**Piracicaba
2005**

Georgia Bertoni Pompeu
Engenheira Agrônoma

**Análise da resposta antioxidativa de células *in vitro* de fumo (*Nicotiana tabacum* cv BY-2)
submetidas ao metal pesado níquel**

Orientador:
Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ecologia de Agroecossistemas. Área de concentração: Ecologia
de Agroecossistemas**

Piracicaba
2005

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

Pompeu, Georgia Bertoni

Análise da resposta antioxidativa de células *in vitro* de fumo (*Nicotiana tabacum* cv BY-2) submetidas ao metal pesado níquel / Georgia Bertoni Pompeu. - - Piracicaba, 2005. 97 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

1. Antioxidante 2. Enzima 3. Estresse 4. Fumo 5. Metais 6. Níquel 7. Poluição do solo – Remediação I. Título

CDD 633.71

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

"...O relógio

O relógio de Nasrudin vivia marcando a hora errada.

- Mas será que não dá para tomar uma providência? - alguém comentou.

- Qual providência? - falou Mullá.

- Bem, o relógio nunca marca a hora certa. Qualquer que seja a providência já será uma melhora.

Nasrudin deu uma martelada no relógio. O relógio parou.

- Você tem toda a razão - disse ele. - De fato, já dá para sentir uma melhora.

- Eu não quis dizer "qualquer providência", assim literalmente. Como é que agora o relógio pode estar melhor do que antes?

- Bem, antes ele nunca marcava a hora certa. Agora, pelo menos, duas vezes por dia ele vai estar certo.

Moral: *É melhor estar certo algumas vezes do que jamais estar certo.*

Khawajah Nasr Al-Din

século XIV

Turquia

História da tradição Sufi ou sufismo, seita religiosa ou de sabedoria de vida, de antiga tradição persa e que se espalha no mundo até hoje.

(Os 100 melhores contos de humor da literatura universal, Flávio Moreira da Costa, Ediouro, 546p., 4ª edição, 2001)."

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pelas oportunidades, pela confiança e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello, pela colaboração e apoio;

Ao Dr. Renato Rodrigues Ferreira, pela amizade e pelo apoio;

À Dra. Salete Aparecida Gaziola, pela amizade e pelo apoio;

Aos amigos do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, Yolanda, Cileide, Vanderlei, Alejandro, Rafael, Bertha, Ariane, Zé Carmezini, Carol, Marina, Marston e em especial, Fabrício, Rui, Priscila e Carlos;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Flávia, em especial e Vanderlei;

Aos professores e funcionários do programa;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo;

À Esalq, pela formação profissional e realização pessoal;

Aos meus pais, Jorgino e Ivone, pelo apoio e compreensão, aos meus irmãos, Ricardo e Marcelo, pela amizade, ao André, pelo companheirismo e ao meu filho Lucas, pelo amor incondicional.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Revisão de literatura.....	11
2.1.1 Metais pesados.....	11
2.1.2 O níquel nas plantas.....	13
2.1.3 Mecanismos de defesa das plantas em resposta à exposição a metais pesados.....	16
2.1.3.1 Sistema oxidante de resposta.....	17
2.1.3.2 Enzimas antioxidantes.....	18
2.1.3.2.1 Superóxido dismutase (SOD).....	18
2.1.3.2.2 Catalase (CAT).....	19
2.1.3.2.3 Glutationa redutase (GR).....	21
2.1.3.2.4 Glutationa-S-transferase (GST).....	22
2.1.3.2.5 Guaiacol peroxidase (GPX).....	22
2.1.3.2.6 Ascorbato peroxidase (APX).....	23
2.1.4 <i>Nicotiana tabacum</i> cv BY-2.....	24
2.2 Materiais e métodos.....	25
2.2.1 Material biológico.....	25
2.2.2 Meio de cultura.....	25
2.2.2.1 Meio completo líquido.....	25
2.2.2.2 Soluções.....	26
2.2.2.2.1 Solução B1-Inositol.....	26
2.2.2.2.2 Solução Mullers 1.....	26
2.2.2.2.3 2,4-D (estoque 10 mM).....	26
2.2.3 Cultivo de células.....	26
2.2.4 Experimento básico.....	27
2.2.5 Extração protéica.....	27
2.2.6 Determinação de proteínas.....	27

2.2.7 Atividade das enzimas antioxidantes.....	28
2.2.7.1 Atividade de superóxido dismutase (SOD).....	28
2.2.7.1.1 Atividade em PAGE não-desnaturante.....	28
2.2.7.1.2 Determinação das isoenzimas de SOD.....	29
2.2.7.2 Atividade de catalase (CAT).....	30
2.2.7.2.1 Atividade em espectrofotômetro.....	30
2.2.7.2.2 Atividade em PAGE não-desnaturante.....	30
2.2.7.3 Atividade de glutathione redutase (GR).....	30
2.2.7.3.1 Atividade em espectrofotômetro.....	31
2.2.7.3.2 Atividade em PAGE não-desnaturante.....	31
2.2.7.4 Atividade de glutathione-S-transferase (GST).....	31
2.2.7.4.1 Atividade em espectrofotômetro.....	31
2.2.7.5 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX).....	32
2.2.7.5.1 Atividade em espectrofotômetro.....	32
2.2.7.6 Atividade de ascorbato peroxidase (APX).....	32
2.2.7.6.1 Atividade em espectrofotômetro.....	32
2.2.8 Peroxidação de lipídios.....	32
2.2.9 Gel SDS-PAGE.....	33
2.2.10 Delineamento experimental.....	34
2.3 Resultados.....	34
2.3.1 Determinação das concentrações tóxicas e/ou estimuladoras do crescimento das células <i>in vitro</i>	34
2.3.2 Atividade de superóxido dismutase em PAGE não-desnaturante.....	42
2.3.2.1 Atividade de SOD em PAGE não-desnaturante.....	42
2.3.2.2 Isoenzimas de SOD.....	42
2.3.3 Atividade de catalase em espectrofotômetro e PAGE não-desnaturante.....	43
2.3.4 Atividade de glutathione redutase em espectrofotômetro e em PAGE não-desnaturante.....	47
2.3.5 Atividade de glutathione-S-transferase em espectrofotômetro.....	51
2.3.6 Atividade de guaiacol peroxidase em espectrofotômetro.....	54
2.3.7 Atividade de ascorbato peroxidase em espectrofotômetro.....	57
2.3.8 Peroxidação lipídica.....	60

2.3.8.1	Quantificação de MDA em espectrofotômetro.....	60
2.3.9	Proteína.....	63
2.3.9.1	Quantificação de proteína em espectrofotômetro.....	63
2.3.9.2	Proteína em gel SDS-PAGE.....	65
2.4	Discussão.....	67
3	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80

RESUMO

Análise da resposta antioxidativa de células *in vitro* de fumo (*Nicotiana tabacum* cv BY-2) submetidas ao metal pesado níquel

Células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 foram tratadas por cinco dias com 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂. A relação entre a toxicidade do níquel (Ni) e as reações oxidativas foram estudadas nas células durante a acumulação do metal. A atividade da superóxido dismutase não se alterou na presença do Ni. Entretanto, as atividades da catalase e da guaiacol peroxidase aumentaram às 36 e 72h depois do tratamento com o metal. As atividades da glutathiona redutase, da glutathiona-S-transferase e da ascorbato peroxidase aumentaram nas primeiras horas do tratamento. A peroxidação lipídica da membrana aumentou somente às 24h do tratamento com o metal. Os resultados sugerem que a desordem oxidativa é resultante dos efeitos da toxicidade do Ni nas células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2.

Palavras chaves: *Nicotiana tabacum* cv BY-2; níquel; enzimas antioxidantes; estresse; EAO; fitorremediação.

ABSTRACT

Antioxidant response of BY-2 *Nicotiana tabacum* cells to nickel stress

BY-2 *Nicotiana tabacum* cells were treated for five days with 0.075 and 0.750 mM NiCl₂. The relationship between nickel (Ni) toxicity and oxidative reactions were studied in cells during metal accumulation. The activity of superoxide dismutase was unaffected by Ni stress. However, catalase and guaiacol peroxidase activities increased from 36 and 72h after the metal treatment. Glutathione reductase, glutathione-S-transferase and ascorbate peroxidase activities increased in the first hours of the treatment. Membrane lipid peroxidation was enhanced only after 24h of the metal treatment. The results suggest that oxidative disorder is part of the overall effect of Ni toxicity in BY-2 *Nicotiana tabacum* cells.

Keywords: BY-2 *Nicotiana tabacum*; nickel; antioxidative enzymes; stress; ROS; phytoremediation.

1 INTRODUÇÃO

A presença de metais pesados no ambiente (solo, água e ar), originários das atividades industriais e o seu uso indiscriminado na agricultura, resulta em perdas na produção agrícola e efeitos danosos ao homem e aos animais.

A entrada destes elementos na cadeia alimentar tem início através da sua bioacumulação nas plantas. Estas, por sua vez, possuem mecanismos de defesa com a função de reduzir os danos causados pelos metais pesados. Entre estes mecanismos, podem ser citados, o sistema antioxidante não enzimático e o sistema de enzimas antioxidantes, que possuem a capacidade de remover, neutralizar ou limpar espécies ativas de oxigênio e que inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona redutase, glutatona-S-transferase, guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase. O estudo da atividade enzimática pode ser utilizado como critério de avaliação da fitotoxicidade de metais pesados em plantas.

O estudo do estresse em linhagens de células vegetais apresenta vantagens, pois, estas são estabelecidas de forma relativamente fácil, com a obtenção de quantidades elevadas a partir dos tecidos de plantas superiores, reduzindo o volume de solução contendo o metal pesado, contribuindo para diminuir a geração de resíduos.

Sendo o níquel um micronutriente essencial para as espécies vegetais, porém, como outros metais pesados, tóxico em altas concentrações, o estudo da atividade das enzimas antioxidantes, resultantes da presença do metal, fornece informações através da via de desintoxicação da planta, que podem ser utilizadas na fitorremediação de ambientes poluídos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 Metais pesados

O crescimento populacional e a sua concentração nos centros urbanos geraram aumento no consumo de alimentos e de produtos industrializados que resultou em um acréscimo nas quantidades de resíduos urbanos e industriais, maior do que a capacidade do ambiente em degradá-los, ocasionando problemas decorrentes do seu acúmulo.

O uso de resíduos na agricultura, como fonte alternativa de nutrientes, pode atenuar o problema. Porém, esses resíduos possuem, além de características benéficas, metais pesados em sua composição, devido ao uso destes elementos nas atividades industriais.

Os metais pesados representam o maior contaminante industrial de solos, plantas e animais no ecossistema (GHOSHROY et al., 1998), com efeitos tóxicos ao homem e outros seres vivos (DÖNMEZ; AKSU, 1999). O estudo da toxicidade de metais pesados em plantas atrai a atenção de cientistas ambientalistas (PRASAD, 1995). Quantidades naturais de metais pesados no ambiente são geralmente baixas, porém as atividades antropogênicas podem aumentar estes níveis. Tais atividades incluem a mineração, fundição, utilização de lodo de esgoto para fertilização na agricultura (CHAOUUI et al., 1997a), gases liberados pela combustão de combustíveis fósseis, pesticidas (LAGRIFFOUL et al., 1998), aplicação de fertilizantes (CHEN; KAO, 1995; GALLI et al., 1996), fabricação de baterias, aplicações militares, aeroespaciais, estabilização de plásticos e formulação de pigmentos (PRASAD, 1995), atividades automotivas e industriais como a manufatura de ligas níquel-aço (aço inox), componentes eletrônicos e baterias (SCHICKLER; CASPI, 1999).

A importância de se estudar os metais pesados deve-se aos seus efeitos tóxicos aos seres vivos juntamente com a sua liberação no ambiente. O estudo da toxicidade destes, em plantas e microrganismos, é importante porque estes são os organismos mais afetados pela contaminação, o que os tornam potencialmente interessantes para recuperação de áreas contaminadas, através das técnicas de biorremediação (GRATÃO, 2003).

O termo “metal pesado” é aplicado a um grupo de elementos que incluem metais, semimetais e não metais (MELO et al., 1997), que possuem número atômico maior que 20 ou peso específico maior que 5 g.cm^{-3} (MALAVOLTA, 1994). Alguns são nutrientes essenciais aos vegetais, como o cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), molibdênio (Mo) e zinco (Zn), outros são benéficos ao crescimento das plantas, como o cobalto (Co), e outros não são essenciais ou não apresentam função, caso do alumínio (Al), cádmio (Cd), cromo (Cr), selênio (Se), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) (MELO et al., 1997). Segundo Mattiazzo-Prezotto (1994), são também conhecidos por “elementos traços” ou ainda “metais traços”, por serem naturalmente encontrados em concentrações de poucas partes por milhão.

O Se é tóxico em altas concentrações, podendo ser incorporado em aminoácidos, devido a sua similaridade estrutural com enxofre (S), alterando a estrutura e função das proteínas. De forma geral, o Se atua como antioxidante em baixas concentrações e em altas, induz o estresse oxidativo (MINORSKY, 2003; GOMES-JUNIOR, 2005). O Al é considerado o elemento em maior abundância no solo e constitui fator limitante para o crescimento das plantas em solo ácido (VITORELLO et al., 2005), causando inibição do crescimento da raiz, redução da respiração e síntese de ATP (YAMAMOTO et al., 2003).

O Ni é um micronutriente essencial em certas espécies vegetais, especialmente quando cultivadas em meio com uréia, pois, o Ni é constitutivo da enzima urease e sua deficiência leva a redução da atividade enzimática, resultando em um acúmulo excessivo de uréia, que é tóxico (POLACCO, 1977). Porém, como outros metais pesados, o Ni torna-se tóxico em altas concentrações. O Cd pode causar sérios danos ao metabolismo celular, incluindo o estresse oxidativo, devido a produção excessiva de espécies ativas de oxigênio, apresentando alterações nas atividades de enzimas antioxidantes (VITÓRIA et al., 2001; GRATÃO et al., 2005).

O Cu e o Mn provocam estresse oxidativo em altas concentrações (DUCIC; POLLE, 2005), agindo sobre o fotossistema (KÜPPER et al., 2003). O Cr pode provocar danos severos a plantas e animais. Sua fitotoxicidade pode causar inibição da germinação de sementes, degradação da clorofila, alteração nos cloroplastos e nas estruturas das membranas (PANDA et al., 2003; PANDA; CHOUDHURY, 2005).

Os metais pesados podem causar estresse oxidativo, porém o papel do sistema antioxidante resultante deste estresse, é controverso, pois 1) os metais apresentam diferentes mecanismos de indução do estresse oxidativo, 2) o sistema antioxidante das células possui

diversos componentes e é compartimentalizado, 3) o sistema de desintoxicação/complexação pode reduzir os efeitos dos metais, sendo que o estresse oxidativo pode ser problemático depois que este sistema esteja sobrecarregado, 4) a glutathione, componente do sistema antioxidante, participa da síntese de fitoquelatinas, que são agentes complexantes de metais. Assim, o sistema antioxidante e o sistema de desintoxicação de metais pesados da célula, podem competir entre si (SCHUTZENDUBEL et al., 2001; GRATÃO, 2003).

As propriedades químicas dos metais pesados determinam mecanismos diferentes de estresse oxidativo e sua resposta. O Ni é um elemento de transição, que participa das reações de Haber-Weiss, gerando radicais livres, é o único metal que possui diferentes estados de oxidação. O Cd e o Al possuem estado de oxidação 2+ e 3+, respectivamente, não sendo considerados elementos de transição. Esta propriedade influencia o mecanismo de geração de estresse oxidativo (COWAN, 1998; CUYBERS et al., 1999; GRATÃO, 2003).

2.1.2 O níquel nas plantas

Descoberto em 1751 por Cronsted no mineral nicolita, este elemento químico pertence ao grupo VIII da tabela periódica, juntamente com o Fe e o Co (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994). Apesar de ser um poluente ambiental (SAJWAN et al., 1996) e fitotóxico em altas concentrações (L'HUILLIER et al., 1996), o Ni é considerado menos tóxico a organismos vivos do que outros metais, como o Cd (PERALTA-VIDEA et al., 2004) e o 24º metal em abundância na crosta terrestre (McGRATH; SMITH, 1990).

Brown et al. (1987) consideram o Ni um micronutriente essencial em certas espécies vegetais, especialmente quando cultivadas em meio com uréia, pois é constitutivo da enzima urease (DIXON et al., 1975), e sua deficiência leva a redução da atividade desta, em tecidos de soja (*Glycine max* (L) Merr.), arroz (*Oriza sativa* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.), resultando em acúmulo excessivo de uréia, tornando-a fitotóxica (POLACCO, 1977).

Dentre outros aspectos positivos do Ni, destacam-se a influência no complexo enzimático hidrogenase, que aumenta a eficiência da fixação do nitrogênio por leguminosas (KLUCAS, 1983) e a participação na síntese de fitoalexinas, aumentando a resistência das plantas às doenças (WALKER et al., 1985; PAIVA et al., 2002).

Possui alta mobilidade no vegetal, encontrando-se em todos os tecidos das plantas tratadas com o metal, e, principalmente, nas sementes (MALAN; FARRANT, 1998). A acumulação ocorre de modo diferencial entre os tecidos e ao longo do ciclo vital da planta, sendo maior nos grãos, nas folhas e nas partes jovens. O Ni é capaz de modificar a absorção e o transporte do nitrato (NO_3), alterando a atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintase, essenciais para a síntese de aminoácidos (PALACIOS; MATAIX, 1999).

Estudos sobre os efeitos do Ni no metabolismo de plantas demonstraram que o metal pode induzir a produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs) (FOYER et al., 1997). As EAOs estão envolvidas na peroxidação de lipídios e na quebra da clorofila (SOMASHEKARAIHAH et al., 1992; STROINSKI, 1999). O Ni é capaz de inibir enzimas do Ciclo de Calvin, a biossíntese de clorofila (VAN ASSCHE et al., 1990), o metabolismo do nitrogênio (BOUSSAMA et al., 1999), a glicólise (CHUGH; SAWHNEY, 1999) e a assimilação do sulfato (LEE; LEUSTEK, 1999).

O Ni é um elemento que pode afetar o crescimento e o desenvolvimento das plantas (MARSCHNER, 1995). Os sintomas mais comuns da sua fitotoxicidade são a clorose, a inibição da fotossíntese e da respiração, gerando redução da biomassa e da produção de sementes (MALLAN; FARRANT, 1998), alterações nas atividades enzimáticas e metabólicas (GALLEGO et al., 1996a,b; COBBETT, 2000; PERALTA-VIDEA et al., 2004) e danos no sistema radicular, diminuindo a assimilação de nutrientes, como Fe, Zn e Mn (CROOKE; INKSON, 1956; YANG et al., 1996; PALACIOS et al., 1998).

O aumento do conteúdo de pectina em raízes de aveia (*Avena sativa* L.) (CROOKE, 1955), a diminuição na concentração de clorofila em folhas de café (*Coffea arabica* L.) (PAVAN; BINGHAM, 1982) e de milho (*Zea mays* L.) (BACCOUCH et al., 1998), a diminuição da atividade da enzima fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilase (MORGUTTI et al., 1984), o aumento da atividade da enzima peroxidase, distúrbios mitóticos nas pontas das raízes de algumas plantas (MISHRA; KAR, 1974), alterações nas estruturas das mitocôndrias de rabanetes (*Raphanus sativus* L.) (PALACIOS et al., 1998) e necrose nas folhas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (PALACIOS; MATAIX, 1999), são exemplos da fitotoxicidade provocada pelo Ni (PAIVA et al., 2002). Porém, os mecanismos que governam a toxicidade por Ni não estão bem esclarecidos (SCHICKLER; CASPI, 1999).

As plantas que crescem em ambientes contaminados pelo Ni, podem apresentar distúrbios nutricionais. Os sintomas de toxidez pelo metal são confundidos com deficiência ou toxidez por

outros elementos essenciais (PAIVA et al., 2002). Segundo Kabata-Pendias; Pendias (1984), os teores de Ni superiores a 100 mg.dm^{-3} de solo são potencialmente fitotóxicos.

O efeito do Ni na absorção de Zn, Cu, Fe e Mn difere com as espécies. Plantas de couve (*Brassica oleracea* L.), crescendo em solução nutritiva com 60 mM de Ni, tiveram a absorção de Cu, Fe e Mn diminuída em 40, 70 e 20%, respectivamente, com relação à apresentada pelo controle. A absorção de Zn diminuiu 80% e a de Cu, 60%, em plantas de trevo branco (*Trifolium repens* L.), crescendo na mesma solução. Plantas de azevém (*Lolium perenne* L.) e de milho, que cresceram em solução contendo 120 mM de Ni, não diminuíram a absorção de Zn, Fe, Mn e Cu. A absorção de Ca foi inibida em azevém, cultivada em concentrações inferiores a 60 mM de Ni. A redução na absorção de Ca e Mg é pronunciada com o aumento das doses de Ni, para todas as espécies. A absorção de P e de S aumentou em milho e em azevém com a crescente concentração de Ni (YANG et al., 1996; PAIVA et al., 2002).

Algumas plantas, denominadas de hiperacumuladoras podem crescer em solos contendo metais pesados e são capazes de translocar o Ni das raízes para a parte aérea, onde o metal é acumulado. Isto pode sugerir um possível uso destas na biorremediação de solos poluídos com metais pesados (ZHU et al., 1999; BOOMINATHAN; DORAN, 2002).

Células de fumo, *Nicotiana tabacum* L. cv BY-2, selecionadas para a tolerância ao Ni, são também mais tolerantes ao Co, porém, não ao Cd, quando comparadas a células não tolerantes. Sugere-se que a histidina está envolvida nesta tolerância e na desintoxicação do metal nas células tolerantes (NAKAZAWA et al., 2004).

Em raízes de milho, expostas ao Ni, a análise da atividade das enzimas antioxidantes juntamente com a peroxidação lipídica demonstrou que ocorreu uma resposta a presença do metal e que a peroxidação foi consequência primária dos efeitos do Ni (BACCOUCH et al., 2001).

A germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico em tabaco foram alterados na presença dos metais Ni, Pb, Fe, Co, Cd, Hg, Al, Zn e Cu. Os metais considerados mais danosos para a germinação do pólen foram o Cu, Hg e Ni e para o crescimento do tubo polínico, Hg, Cd e Ni. Os efeitos tóxicos do Co, Al e Fe foram considerados baixos (TUNA et al., 2002).

O cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) apresentou tolerância quando submetido a ambientes contaminados, sendo, portanto, considerado promissor para a fitorremediação (MARQUES, 1996). A aplicação de Ni nestas plantas aumentou a absorção de P, reduziu a de Ca, Mg, Cu, Fe e Mn, o teor de Zn foi pouco afetado e não afetou o teor de K e de S. O teor de Ni, na matéria seca

de raiz, caule e folha, elevou-se com o aumento das doses deste metal, que mostrou ser móvel nas plantas analisadas (PAIVA et al., 2002).

2.1.3 Mecanismos de defesa das plantas em resposta à exposição a metais pesados

A contaminação por metais pesados é um problema mundial, devido as perdas na produção agrícola e efeitos nocivos após inseridos na cadeia alimentar dos animais e do homem (SALT et al., 1995). Os metais pesados tendem a se concentrar no solo tornando-o um reservatório disponível para as raízes que são vulneráveis as variações de concentrações destes elementos. Em ambientes aquáticos estes se disponibilizam tanto para as raízes quanto para a parte aérea. A disponibilidade para as plantas é afetada por fatores como a textura do solo, tipo de mineral de argila, pH do solo e da água, e outros parâmetros fisiológicos (PRASAD, 1995; MELO et al., 1997).

As plantas desenvolveram mecanismos para reduzir a concentração de metais pesados livres no citossol das células, os quais, incluem, a compartimentalização do metal em estruturas sub-celulares, exclusão e/ou diminuição do transporte através da membrana e a formação de peptídeos ricos em cisteínas, conhecidos como fitoquelatinas e metalotioneínas, que podem complexar esses metais (LOZANO-RODRIGUEZ et al., 1997). Outro mecanismo desenvolvido pelas plantas, é o sistema antioxidante de defesa, que inclui componentes de baixa massa molecular, tais como glutathione e um sistema de enzimas antioxidantes, capazes de remover, neutralizar ou limpar espécies ativas de oxigênio e que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), glutathione-S-transferase (GST), guaiacol peroxidase (GPX) e ascorbato peroxidase (APX) (SCANDALIOS, 1993; GRATÃO et al., 2005).

O estudo da atividade enzimática pode ser considerado como critério de avaliação da fitotoxicidade de metais pesados em plantas (MENCH et al., 1994). Conhecendo-se a via preferencial de desintoxicação destes metais, pode-se traçar estratégias de estudo e melhoramento genético, como por exemplo, a manipulação de enzimas que possam condicionar tanto a sensibilidade quanto a tolerância a metais, em diferentes cultivares (GRATÃO, 2003).

2.1.3.1 Sistema oxidante de resposta

Os organismos aeróbios dispõem de vantagens energéticas utilizando o oxigênio molecular como um oxidante terminal na respiração. A presença do oxigênio no ambiente celular pode provocar a oxidação das suas próprias estruturas devido ao seu potencial de agir como redutor parcial, formando as espécies ativas de oxigênio (EAOs) (RICE-EVANS et al., 1991; FOYER et al., 1997; MALLICK; MOHN, 2000).

As EAOs, como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e oxigênio "singlet" (1O_2), são produtos gerados pelo metabolismo dos organismos aeróbios e provocam estresse oxidativo devido a ação tóxica e mutagênica sobre as células (ANGELOVA et al., 2000; MALLICK; MOHN, 2000).

Em plantas, a produção das EAOs é estimulada por fatores ambientais de estresse como a exposição a níveis elevados de luminosidade, seca, metais pesados, concentração de sais, temperatura, radiação ultravioleta (UV), poluição do ar, herbicidas, estresse físico e como resposta a estresses bióticos, tais como, o ataque de patógenos (MALLICK; MOHN, 2000). A produção de EAOs, ocorre também durante as reações fotoquímicas da fotossíntese (BOWLER et al., 1994).

Os vegetais possuem mecanismos não enzimáticos que os protegem contra os danos oxidativos. São compostos de baixa massa molecular, como glutathiona reduzida (GSH), ascorbato (AA), tocoferol, cisteínas, alcalóides, ferredoxina (Fd), vitaminas, flavonóides e pigmentos carotenóides, que agem em conjunto com enzimas antioxidantes (BOWLER et al., 1992; SCANDALIOS, 1993; FOYER et al., 1997; RUIZ, 1998; SAKAKI, 1998; ASADA, 1999).

Os O_2^- são produzidos através da reação do oxigênio molecular (O_2) dos fotossistemas na reação de Meyer, sendo convertidos em H_2O_2 pela SOD, associada ao tilacóide. O H_2O_2 é convertido pela CAT, nos peroxissomos e pela APX, nos cloroplastos, em água (H_2O) (SCANDALIOS, 1990; FOYER et al., 1994; ALLEN, 1995; FADZILLAH et al., 1996; AZEVEDO et al., 1998). As moléculas de O_2^- e H_2O_2 que não foram degradadas nos tilacóides, são degradadas no estroma pela SOD e APX. Os radicais monodesidroascorbato (MDHA), produzidos pela APX, são convertidos a AA através da via Fd ou pela enzima monodesidroascorbato redutase (MDHAR) (GRATÃO, 2003).

Em alisso (*Alyssum maritimum* L.), uma planta hiperacumuladora de Ni e Cd, quando em presença de Ni, exibiu um típico mecanismo de defesa antioxidante, elevando a atividade das enzimas SOD, GR e APX. Na presença de Cd, aumentou a atividade de SOD e reduziu a de GR (SCHICKLER; CASPI, 1999).

As EAOs são altamente reativas e citotóxicas, podendo reagir com os ácidos graxos insaturados da membrana, promovendo a peroxidação lipídica. Os metais pesados podem causar danos oxidativos diretos, agindo como redutores e produzindo EAOs, ou indiretos, inativando o sistema antioxidante da célula (MANNAZZU et al., 2000).

2.1.3.2 Enzimas antioxidantes

2.1.3.2.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD (EC 1.15.1.1) foi isolada em eritrócitos bovinos em 1938 e sua função foi descrita em 1969, por McCorde e Fridovick. Presente em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, esta enzima caracteriza um grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de H_2O_2 a partir de O_2^- , livrando as células da oxidação por esses radicais.

A SOD é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EAOs nas células. É a única cuja atividade interfere nas concentrações de O_2^- e H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss, que origina os radicais hidroxila (OH^-) e, provavelmente por isso, representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (BOWLER et al., 1992; ALSCHER et al., 2002).

Estas metaloenzimas multiméricas são classificadas em três grupos, de acordo com o componente metálico de seu sítio ativo. O grupo cobre/zinco (Cu/Zn), o grupo manganês (Mn) e o grupo ferro (Fe), sendo que a cobre/zinco superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD) é considerada mais abundante nos vegetais (WINGSLE et al., 1991; SCANDALIOS, 1993; NIYOGI, 1999; MALLICK; MOHN, 2000).

A Cu/Zn-SOD é encontrada no citosol e no estroma dos cloroplastos e é sensível às concentrações do radical cianeto (CN^-) (HAYAKAWA et al., 1984; MALLICK; MOHN, 2000).

A manganês superóxido dismutase (Mn-SOD) e ferro superóxido dismutase (Fe-SOD) não são sensíveis ao CN^- e são encontradas na matriz mitocondrial de células eucarióticas e em células procarióticas, embora, Mn-SOD associada à membrana, foi observada nos cloroplastos de algumas plantas. A Fe-SOD foi observada em algumas famílias de plantas e está associada principalmente aos cloroplastos (MALLICK; MOHN, 2000).

As isoenzimas de SOD apresentam semelhanças entre as espécies vegetais, porém, o número e grupo destas isoenzimas é variável. A Cu/Zn-SOD foi encontrada no citosol de arroz, nas mitocôndrias de girassol (*Helianthus annuus* L.) e no cloroplasto de arábida (*Arabidopsis thaliana* L.) (CORPAS et al., 1991; PAN; YAU, 1991; KLIEBENSTEIN et al., 1998).

A Mn-SOD foi encontrada em mitocôndria de aveia e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (SEHMER; DIZENGREMEL, 1998; CORPAS et al., 1991). A Fe-SOD é rara em plantas, sendo encontrada em arábida, com a função de catalisar a produção de H_2O_2 formado durante a β -oxidação de ácidos graxos e nos peroxissomos das folhas, durante a fotorrespiração, transformando o glicolato em glioxilato (KLIEBENSTEIN et al., 1998; HAVIR; McHALE, 1989; GRATÃO, 2003).

Em milho, verificou-se que o Ni foi capaz de inibir a atividade da SOD durante a primeira hora de estresse (BACCOUCH et al., 1998). Em guandu (*Cajanus cajan* L.) ocorreu um aumento na atividade da SOD, quando exposto ao metal, indicando que, provavelmente, a SOD é um importante intermediário no processo de destoxificação do Ni (RAO et al., 2000).

2.1.3.2.2 Catalase (CAT)

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6), descrita em 1901 por Loew (FRUGOLI et al., 1996), é uma enzima tetramérica, que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Possui ampla distribuição e capacidade de degradar o H_2O_2 . Foi proposto por vários pesquisadores, que a CAT desempenha papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbios (MALLICK; MOHN, 2000).

Existem três tipos de isoenzimas de CAT, a Cat1, a Cat2 e a Cat3 (genes codificantes da catalase 1, 2 e 3, respectivamente) (SCANDALIOS, 1993). Em plantas, a Cat1 é responsável por

80% da atividade total desta enzima e está localizada no interior dos peroxissomos, sendo responsável pela transformação do H_2O_2 produzido na fotorrespiração em H_2O e O_2 (WILLEKENS et al., 1995). A Cat2 é encontrada nos tecidos vasculares, enquanto a Cat3 está localizada no mesófilo das células (SCANDALIOS, 1990).

De acordo com Foyer et al. (1994), a CAT torna-se essencial para destruição de H_2O_2 formado na fotorrespiração realizada em plantas C3. Em plantas C4, onde a fotorrespiração é reduzida, ocorre uma diminuição da atividade da CAT. Segundo Willekens et al. (1995), a ausência da atividade da CAT em plantas tornam-nas mais sensíveis a estresses.

A CAT, provavelmente, utiliza mecanismos de dois estágios para as reações peroxidativas e catalíticas. No primeiro estágio, o Fe do grupo heme interage com o H_2O_2 formando peróxido de ferro, rico em O_2 , denominado componente I. Em baixas concentrações de H_2O_2 , este componente pode ser reduzido por doadores de hidrogênio (H), como o etanol e o ácido ascórbico. Em elevadas concentrações, o componente I reage com outra molécula de H_2O_2 , produzindo H_2O e O_2 (SCANDALIOS, 1994).

Condições ambientais podem alterar a atividade da CAT. Em bactérias do gênero *Prochloron* sp, a atividade da CAT é diretamente proporcional a radiação UV, enquanto que a alteração na temperatura afeta a atividade da CAT em cianobactérias do gênero *Synechocystis* sp (LESSER; STOCHAJ, 1990; RADY et al., 1994). Em eucalipto (*Leucaena leucocephalla* L.), feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) e milho, coletados em solos contaminados por Ni, foi observado o aumento da atividade da CAT, após 24 horas de exposição ao metal (BACCOUCH et al., 1998; ROUT et al., 1999; SAMANTARY et al., 1999).

Duas isoformas foram identificadas no fungo aspergilos (*Aspergillus nidulans* L.). A CAT A, codificada pelo gene *catA*, cuja transcrição é induzida durante a esporulação e em resposta a estresses e a CAT B, codificada pelo gene *catB*, presente no micélio, cuja expressão é induzida pelo H_2O_2 ou $H_2O_2^-$, não possuindo controle regulatório pós-transcricional. Estas enzimas constituem mecanismos de defesa antioxidativa alternativo e específico para os diferentes estágios do ciclo de vida do fungo (CALERA et al., 2000).

2.1.3.2.3 Glutationa redutase (GR)

A enzima glutaciona redutase (GR, EC 1.6.4.2) (VALLEJOS, 1983) possui ocorrência quase universal, distribuída em procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (FOYER et al., 1994). A GR contém grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD), transferidor de elétrons, que catalisa a redução dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) da glutaciona oxidada (GSSG), para a glutaciona reduzida (GSH) (VOET; VOET, 1995).

A GR tem importante papel na proteção do cloroplasto contra danos oxidativos, mantendo a razão entre os níveis de GSH e GSSG (GALLEGO et al., 1996a,b). A GSH é o componente tiol mais abundante dos vegetais, essencial para plantas e animais em resposta a estresses oxidativos, possuindo papel importante como antioxidante e na síntese de fitoquelatinas (PCs), podendo controlar a quantidade de Ni livre no citossol e promover a remoção do H₂O₂ no cloroplasto e, para isto, a GSH deve estar na sua forma reduzida. Essa oxi-redução é catalisada pela GR (CREISSEN et al., 1994).

Os PCs são peptídeos ricos em cisteína, gama-glutamil-cistenil-glicina (γ -Glu-Cys)_n-Gly, sintetizados pela fitoquelatina sintase (γ -glutamil-cisteína dipeptidiltranspeptidase), que transfere a γ -glutamil-cisteína de uma molécula de GSH para o polímero de γ -glutamil-cisteinil-glicina (HOWDEN et al., 1995; MEJÁRE; BÜLOW, 2001; TSUJI et al., 2003).

Foram encontradas espécies de plantas capazes de sintetizar PCs na presença de metais pesados (GRILL et al., 1985), sendo que apenas alguns metais podem formar complexos com PCs (Cd, Cu, Ni, Zn, Ag, Hg e Pb). Em tomate, metais pesados alteraram os níveis de PCs nas raízes e na parte aérea da planta, sugerindo que a síntese pode ser regulada apenas em resposta a exposição ao metal. Em pesquisa realizada com feijão, onde foram aplicados Cd e Ni, verificou-se que o Cd induziu a síntese de PCs, diferentemente do Ni, onde não foi observada resposta (CHEN et al., 1997; GUO; MARSCHNER, 1995).

Em plantas de guandu tratadas com Ni, observou-se o aumento da atividade da enzima GR após o início do tratamento (RAO et al., 2000). A alta concentração da enzima em raízes de trigo (*Triticum aestivum* L.) contribuiu para aumentar a tolerância ao Ni, através da ação da GSH,

mediante a síntese de PCs (PANDOLFINI et al., 1996). Plantas do gênero *Alyssum* sp, expostas a altas concentrações do metal, tiveram a atividade da GR aumentada (SCHICKER; CASPI, 1999).

2.1.3.2.4 Glutationa-S-transferase (GST)

As GSTs (EC 2.5.1.18) são enzimas que catalisam a adição de glutatona reduzida (GSH) para substratos hidrofóbicos eletrofílicos (DIXON et al., 2002). Estas enzimas são induzidas em resposta ao estresse oxidativo. A atividade de GST leva a uma desintoxicação dos produtos da peroxidação lipídica, resultado da produção acelerada de EAOs. A GST remove metais pesados, herbicidas e outros xenobióticos e é responsável pela principal via na eliminação de moléculas endógenas, como metabólitos secundários (FOYER et al., 1997). A atividade de GST foi elevada em seis vezes, a nível do controle, em resposta ao estresse oxidativo desencadeado pelo herbicida *oxyfluorfen* em culturas *in vitro* de soja (KNÖRZER et al., 1996).

A identificação da GST em vegetais ocorreu devido a sua associação com mecanismos de resistência ao herbicida *atrazina* em milho (MARRS, 1996). Outras classes de GST foram classificadas após a exposição a estresses bióticos e abióticos, *Phi*, *Zeta*, *Tau* e *Theta* (DIXON et al., 2002).

2.1.3.2.5 Guaiacol peroxidase (GPX)

As peroxidases são hemoproteínas que catalisam a oxidação do substrato concomitantemente à redução do H₂O₂. Participam de processos metabólicos essenciais, incluindo lignificação (GRISEBACH, 1981), regulação do crescimento celular (GOLDBERG et al., 1986), oxidação fenólica, defesa contra patógenos e proteção contra estresses (FIELDES; GERHARDT, 1998).

Nas espécies vegetais e em particular no linho (*Linum usitatissimum* L.), a GPX (EC 1.11.1.7) apresenta isoformas ácidas e básicas. A isoforma ácida está envolvida com a biossíntese

da parede celular, incluindo a formação de lignina. A isoforma básica participa da regulação da degradação do ácido indol-acético (AIA) e da síntese de etileno (FIELDES; GERHARDT, 1998).

A GPX catalisa a oxidação dos doadores de H em experimentos *in vitro*, devido à ausência de substrato específico. *In vivo*, a GPX utiliza o ascorbato como substrato para suas reações, sugerindo que a desintoxicação possa ser a principal função das isoformas. As principais funções das peroxidases não foram bem esclarecidas. Estudos das alterações provocadas pela indução de estresses fisiológicos podem contribuir para a melhor compreensão da ação específica das isoformas da GPX (FIELDES; GERHARDT, 1998; CAMPA, 1991).

Em raízes milho não ocorreu alteração da atividade da GPX, quando expostas à concentração de 250 mM de NiCl₂ por um período de cinco dias (BACCOUCH et al., 2001).

2.1.3.2.6 Ascorbato peroxidase (APX)

O substrato redutor mais importante na desintoxicação do H₂O₂ em células vegetais é o ascorbato (AA). A ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) catalisa a reação na qual duas moléculas de ascorbato são oxidadas reduzindo uma molécula de H₂O₂ em H₂O. A regeneração do ascorbato envolve a oxidação da GSH, o que, por sua vez, é regenerada por ação da GR, constituindo o ciclo ascorbato-glutationa (NOCTOR; FOYER, 1998).

A APX é específica para plantas e algas, é indispensável na proteção dos cloroplastos e outros constituintes celulares aos danos causados pelo H₂O₂. As propriedades básicas da enzima ascorbato peroxidase são distintas em relação às propriedades da guaiacol (GPX), possuindo semelhança às peroxidases do citocromo c (ASADA, 1992). Isoenzimas de APX estão distribuídas em quatro compartimentos celulares 1) no estroma e na membrana do tilacóide, 2) nos cloroplastos, 3) nos microcorpos e 4) no citosol (ASADA, 1992; MIYAKE; ASADA, 1992). Os cDNA que codificam as isoenzimas de APX foram isolados e caracterizados em várias espécies vegetais (KUBO et al., 1995), sendo que uma segunda família de cAPX foi relatada em espécies como espinafre (*Spinacia oleracea* L.), soja e arroz (SANTOSH et al., 1999).

Estudos visam examinar as alterações da atividade e do nível de expressão da APX, sob condições de estresse ambiental, tais como ozônio, radiação UV, baixa temperatura associada à

alta luminosidade, estresse hídrico, infecção por patógenos e estresse gerado por metais pesados (WILLEKENS et al., 1995; MITTLER et al., 1999; HERNÁNDEZ et al., 2004).

A atividade da APX aumentou nas plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) e de feijão, expostas ao Cd e Cu e diminuiu para girassol, *Pinus* sp e aveia (GALLEGO et al., 1996; HEGEDUS et al., 2001; SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001). A exposição da hiperacumuladora do gênero *Alyssum* sp ao Cd e Ni alterou a atividade da enzima em altas concentrações (SCHICKLER; CASPI, 1999).

2.1.4 *Nicotiana tabacum* cv BY-2

A cultura de tecidos é um processo onde células, fragmentos de tecidos e órgãos, que foram obtidos de raízes, caules e folhas, originam brotos, raízes e até plantas inteiras, quando cultivados em meio nutritivo. A cultura de células envolve o crescimento desorganizado de massas celulares, denominadas calos ou células indiferenciadas. Estas células podem manter-se neste estado por longos períodos, quando repicadas rotineiramente para novo meio, podendo resultar em plantas regeneradas, quando tratadas com uma combinação adequada de fatores de crescimento vegetal.

A capacidade das células de restabelecerem o crescimento a partir de um estágio latente de diferenciação e iniciar a divisão na presença de concentrações hormonais apropriadas, facilita o cultivo *in vitro* de espécies de plantas originárias de diferentes fontes teciduais (GRATÃO, 2003). As linhagens celulares possuem importante papel na compreensão da biologia celular e molecular de células de mamíferos. A descoberta da imortalidade de linhagens celulares como HeLa, permitiram elucidar o mecanismo de tumorigênese em células animais (NAGATA et al., 1992).

A linhagem Bright Yellow-2 de *Nicotiana tabacum* L, estabelecida através da indução de calos do caule, cultivados a partir de sementes e *seedlings*, foi a que mais proliferou entre as quarenta espécies de *Nicotiana* e três espécies de *Populus* examinadas, sugerindo que esse cultivar de fumo pode ter características específicas. Esta linhagem apresenta vantagem para o estudo com metais pesados, devido ao fácil estabelecimento, obtenção em altas quantidades, reduzindo o volume de solução contendo o metal, contribuindo para a diminuição de resíduos. A

BY-2 é considerada um modelo experimental para pesquisa da biologia vegetal, pois apresenta altas taxas de crescimento e permite a obtenção de culturas altamente sincronizadas quanto ao ciclo celular, o que é importante para a realização de estudos envolvendo as fases do ciclo (NAGATA et al., 1992; GEELLEN; INZÉ, 2001).

Células de BY-2 são utilizadas em estudos do citoesqueleto, regulação do ciclo celular e crescimento celular, identificação do papel do AMP cíclico como mensageiro secundário, síntese de celulose, síntese de isoprenóides, expressão gênica e resposta defensiva (VITORELLO; HAUG, 1996; YAMAMOTO et al., 1996; NAKAGAWA; SAKURAI, 1998; ANDREA et al., 2000; GEELLEN; INZÉ, 2001; HOUOT et al., 2001; YANG et al., 2001).

2.2 Materiais e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, do Departamento de Genética, pertencente à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) em conjunto com o Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP).

2.2.1 Material biológico

Foram utilizadas células não diferenciadas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2 (BY-2)), para testar o efeito do metal níquel (Ni) no sistema antioxidante da célula. A linhagem BY-2 é originária da University of Pennsylvania, EUA, e está estabelecida no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA-USP). A suspensão celular utilizada foi obtida a partir do mesófilo de folhas de fumo.

2.2.2 Meio de cultura

2.2.2.1 Meio completo líquido

O meio de cultura foi preparado de acordo com o descrito por Nagata et al. (1992) e Vitorello; Haug (1996). Foram utilizados 0,5 g de MES, 4,3 g de sais MS, Murashige; Skoog

(1962), 30,0 g de sacarose, 10,0 mL de solução B1-Inositol, 3,0 mL de solução Mullers 1, 0,1 mL de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e 1000,0 mL de água Milli-Q.

O pH foi ajustado para 5,7 com KOH e o meio foi esterilizado em autoclave sob 1 atm, 120°C, por 20 minutos.

2.2.2.2 Soluções

2.2.2.2.1 Solução B1-Inositol

Para esta solução foram utilizados 0,1 g de tiamina, 10,0 g de Mio-Inositol e 1000,0 mL de água Milli-Q.

2.2.2.2.2 Solução Mullers 1

A solução de Mullers 1 contém 6,0 g de KH_2PO_4 dissolvidos em 100,0 mL de água Milli-Q.

2.2.2.2.3 2,4-D (estoque 10 mM)

Foram utilizados 0,1105 g de 2,4-D em 5,0 mL de etanol.

2.2.3 Cultivo de células

As células foram cultivadas de acordo com Nagata et al. (1992) e Vitorello; Haug (1996) em incubadora-agitadora, à temperatura de 28°C, no escuro e subcultivadas em intervalos de 7 dias.

O crescimento celular foi avaliado através do volume de células compactadas após centrifugação a 200 rpm. A viabilidade celular foi avaliada através da contagem de células viáveis, por microscopia óptica.

2.2.4 Experimento básico

As células foram obtidas a partir do inóculo de 3,0 mL de suspensão celular por frasco erlenmeyer contendo 50,0 mL de meio líquido completo e mantido à 28°C por 7 dias.

Foram realizados ensaios preliminares para estabelecer os períodos de tempo e de concentração de cloreto de níquel (NiCl_2) a serem utilizados. Em seguida, foram conduzidos os experimentos utilizando-se células com 2 dias de crescimento. O período de exposição ao NiCl_2 foi de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h. As concentrações estabelecidas foram de 0; 0,075 e 0,750 mM.

Os experimentos foram repetidos 3 vezes e para cada tratamento, 3 repetições. Os ensaios espectrofotométricos foram repetidos 3 vezes.

2.2.5 Extração protéica

As amostras de cada tratamento foram maceradas em mortar onde foi adicionado nitrogênio líquido, até formar uma farinha. Em seguida, foi adicionado o tampão de extração (1 g de tecido(p)/1,7 mL de tampão(v)).

O tampão de extração ou tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contém fosfato de potássio dibásico (14,52 g K_2HPO_4 /L de tampão), fosfato de potássio monobásico (2,27 g de KH_2PO_4 /L de tampão), 1 mM de ácido etileno diamino tetracético (0,372 g de EDTA/L de tampão), 3 mM de ditioneitol (0,462 g de DTT/L de tampão) e 4% (p/v) de polivinil polipirrolidona (PVPP).

O homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm, por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi coletado, alíquotado e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

2.2.6 Determinação de proteínas

A determinação das concentrações de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão.

2.2.7 Atividade das enzimas antioxidantes

Para os ensaios enzimáticos foram utilizados extratos provenientes de amostras de células de fumo expostas as concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h, congelados a -80°C.

2.2.7.1 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) não-desnaturante.

2.2.7.1.1 Atividade em PAGE não-desnaturante

A atividade de SOD em PAGE não-desnaturante foi determinada através dos extratos vegetais, cujas proteínas foram separadas por eletroforese em gel (8%). O gel possui espessura de 3,0 mm, altura de 6,5 cm e largura de 7,3 cm, contendo 4,0 mL de solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 5,0 mL de tampão tris (hidroximetil)-aminometano (TRIS) 2,9 M (pH 8,9) e 11,0 mL de água deionizada (d.d.). Como catalisadores foram utilizados 38,0 µL de N, N, N', N'-tetrametilenodiamina (TEMED) e 50,0 µL de persulfato de amônia (PA) (10%).

Após a polimerização, 9,0 mL de gel de empilhamento foram aplicados sobre o gel principal. Foram utilizados para este gel 1,0 mL da solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 0,5 M (pH 6,8) e 5,5 mL de água d.d. Para a polimerização do gel foram utilizados 20,0 µL de TEMED e 100,0 µL de PA (10%).

A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 20 mA, por placa. O tampão de eletrodo continha 15,2 g de TRIS 250 mM (pH 8,3) e 72,0 g de glicina (Gly) (192 mM), onde, 150,0 mL deste tampão foram misturados em 600,0 mL de água d.d. O padrão utilizado foi duas unidades de SOD de fígado de boi (Sigma) e a concentração de proteínas das amostras foi de 60,0 µg.

Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp; Fridovick (1971). Os géis foram lavados em água d.d. e incubados no escuro à temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM de EDTA, 0,05 mM de riboflavina, 0,1 mM de *nitro blue tetrazolium* (NBT) e 0,3% de TEMED.

Depois de 30 minutos, a mistura da reação foi removida, os géis lavados com água d.d. e colocados sob iluminação até o aparecimento das bandas negativas sob fundo roxo. Nestas condições, ocorre a fotoxidação do gel com a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes a atividade de SOD permanecem sem fotoxidar, promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação é interrompida com solução de água d.d. e ácido acético 7%.

2.2.7.1.2 Determinação das isoformas de SOD

Para a determinação das isoformas de SOD foi realizada uma eletroforese com 60,0 µg de proteína do tratamento 0 mM de NiCl₂, 36h, nas condições anteriormente descritas para SOD. Em seguida, o gel foi dividido verticalmente em três partes. Uma delas foi mantida à 4°C em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. Outra foi imersa em 100,0 mL do mesmo tampão contendo 0,0292 g de EDTA e 0,0130 g de KCN e a terceira, imersa em 100,0 mL do referido tampão acrescido de 0,0292 g de EDTA e 70,0 µL de H₂O₂. Todos os passos descritos foram realizados no escuro.

Após 20 minutos nestas soluções, os géis foram submetidos a revelação com NBT e riboflavina, como citado anteriormente. Ao final da revelação, foi analisada a presença ou ausência de bandas no controle, e nos tratamentos com KCN e H₂O₂. As bandas foram então classificadas como Cu/Zn-SOD, Fe-SOD ou Mn-SOD. A Cu/Zn-SOD é inativada por KCN e H₂O₂ e em geral ocorre no citoplasma e no cloroplasto. Fe-SOD é inativada por H₂O₂ e resistente a KCN, ocorrendo no cloroplasto. A forma Mn-SOD é resistente a ambos (KCN e H₂O₂) e está presente nas mitocôndrias (AZEVEDO et al., 1998).

2.2.7.2 Atividade de catalase (CAT)

A atividade de catalase foi determinada por espectrofotometria e em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) não-desnaturante.

2.2.7.2.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de catalase foi determinada segundo Kraus et al. (1995) com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998).

Em espectrofotômetro, a catalase foi determinada à 25°C, em solução contendo 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de H₂O₂ (solução 0,25%) preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 0,015 mL de extrato vegetal e a atividade determinada seguindo-se a decomposição de H₂O₂ por 1 minuto, através das alterações na absorbância à 240 nm. Os resultados são expressos em µmol/min/mg de proteína.

2.2.7.2.2 Atividade em PAGE não-desnaturante

A eletroforese foi realizada em PAGE (8%), como descrito para SOD. Para cada gel, foram aplicadas amostras de 2 unidades de padrão de CAT de fígado de boi (Sigma) e 60,0 µg de proteína dos extratos dos tratamentos de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂.

A revelação para a atividade de CAT foi realizada após a lavagem do gel por 45 minutos em água d.d. (3x15 min) e incubação do mesmo por 10 minutos em H₂O₂ (0,003%), à temperatura ambiente, com agitação constante. Após este período, o gel foi lavado em água d.d. e colocado em solução de cloreto férrico (FeCl₃) 1% (p/v) e ferricianeto de potássio (K₂Fe(CN)₆) 1% (p/v), por 10 minutos, com agitação. A solução foi retirada e o gel lavado com água d.d.. Para a fixação, utilizou-se solução de ácido acético 7%.

2.2.7.3 Atividade de glutathiona redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada por espectrofotometria e em PAGE não-desnaturante.

2.2.7.3.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade da GR foi determinada de acordo com Smith et al. (1988), com algumas modificações. Em espectrofotômetro, à 30°C, em uma solução contendo 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 0,5 mL de 5,5' ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) 1mM, 0,1 mL de GSSG 1 mM e 0,1 mL de NADPH 0,1 mM. A reação inicia-se com a adição de 0,050 mL de extrato vegetal. A atividade da GR foi estimada pela redução da GSSG, acompanhada por monitoramento na alteração da absorbância à 412 nm. Os valores de atividade foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

2.2.7.3.2 Atividade em PAGE não-desnaturante

A atividade da GR foi revelada segundo Lee; Lee (2000). Depois da eletroforese em PAGE (8%), como descrito em SOD, utilizando-se como padrão uma unidade de GR, o gel foi lavado com água d.d. e incubado em temperatura ambiente em 50,0 mL de solução contendo 0,25 M de TRIS (pH 7,5) (1,514 g de TRIS), 10,0 mg de MTT, 10,0 mg de dicloroindolacético (DPIP), 2,4 mM GSSG (0,1041g de GSSG) e 0,5 mM de NADPH (0,0208g de NADPH). A reação foi interrompida com ácido acético 7%, após o aparecimento das bandas.

2.2.7.4 Atividade de glutathione-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada por espectrofotometria.

2.2.7.4.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de GST foi determinada como descrito por Anderson (1995), com algumas modificações. Em solução contendo 0,9 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 100 mM (pH 6,5) e 0,05 mL de GSH 100 mM foram adicionados 0,025 mL de amostra e 0,025 mL de 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 40 mM, à 30°C. O monitoramento da absorbância foi feito por 10 minutos, à 340 nm. A atividade foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

2.2.7.5 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX)

A atividade de GPX foi determinada por espectrofotometria.

2.2.7.5.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de GPX 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 µmol/min/mg de proteína.

2.2.7.6 Atividade de ascorbato peroxidase (APX)

A atividade de APX foi determinada por espectrofotômetro.

2.2.7.6.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de APX foi determinada segundo Nakano; Assada (1981). Em 0,650 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0), à 30°C, foi adicionado 0,1 mL de ascorbato, 0,1 mL de EDTA, 0,1 mL de H₂O₂ e 0,05 mL de extrato vegetal. A atividade foi monitorado por 2 minutos, em uma absorbância de 290 nm e expressa em µmol/min/mg de proteína.

2.2.8 Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi determinada através da produção de metabólitos reativos a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malonaldeído (MDA), segundo Heath; Packer

(1968) e Buege; Aust (1978). Amostras pesando 0,1 g foram maceradas com 1,3 mL de TCA (0,1%) juntamente com 20% de PVPP. Após a homogeneização, 1,0 mL foi transferido para tubos eppendorf e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. Do sobrenadante, foi retirado 0,25 mL ao qual foi adicionado 1,0 mL de TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho seco por 30 minutos, à 95°C e resfriada em gelo, na seqüência. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 10.000 rpm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 535 e 600 nm. A quantidade de MDA é expressa em mmol/mg de tecido fresco.

2.2.9 Gel SDS-PAGE

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante para desnaturá-las em subunidades. O agente dissociante comumente utilizado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína é desnaturada pelo aquecimento, na presença do SDS e mercaptoetanol, cuja função é quebrar as ligações dissulfeto. Esta eletroforese ocorre em cuba vertical, em sistema de tampão descontínuo e desnaturante, utilizando-se mini-gel no tamanho de 8,3 x 10,2 cm na concentração de acrilamida de acordo com Laemmli (1970). As soluções estoques são descritas como segue.

O tampão de corrida (5x concentrado) contém 15,2 g de TRIS (25 mM), 72,0 g de glicina (192 mM) (pH 8,3) e 1% SDS (10%). O tampão do gel principal contém 36,3 g de TRIS (pH 8,9) e o tampão do gel de empacotamento, 6,0 g de TRIS (pH 6,7).

Para a preparação de 2 géis na concentração de 10% de acrilamida, foram utilizados no gel de resolução (principal) 5,0 mL de acrilamida/bis-acrilamida (40%), 5,0 mL do tampão do gel principal, 10,0 mL de H₂O destilada, 200,0 µL SDS (10%), 38,0 µL de TEMED e 50,0µL de PA (10%).

Para o gel de empacotamento, 1,0 mL de acrilamida/bis-acrilamida (40%), 2,5 mL de tampão de empacotamento, 5,5 mL de H₂O destilada, 100,0 µL de SDS (10%), 20,0 µL de TEMED e 100,0 µL de PA (10%).

O tampão de amostra contém 3,0 mL de H₂O destilada, 1,0 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de SDS (10%), 0,4 mL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 0,4 mL mercaptoetanol. A corrida foi realizada em amperagem constante de 20 mA por placa.

2.2.10 Delineamento experimental

Os tratamentos foram dispostos de forma inteiramente casualizada, com 3 repetições. Para a análise estatística foi empregado o teste de Tukey, utilizando o programa ESTAT desenvolvido pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - UNESP, Jaboticabal.

2.3 Resultados

2.3.1 Determinação das concentrações tóxicas e/ou estimuladoras do crescimento das células *in vitro*

Análises preliminares foram realizadas para a determinação dos períodos de exposição das células e das concentrações de Ni a serem utilizadas. A Tabela 1 e a Figura 1 mostram as concentrações analisadas e os tempos de exposição. A Tabela 2, referente à análise estatística (análise fatorial com dois fatores, teste de Tukey, programa ESTAT), demonstrou que ocorreu diferenças significativas entre as concentrações e entre os períodos analisados e que ocorreu interação entre as concentrações e os tempos, com relação ao controle. As Tabelas 3 e 4 mostram que todas as concentrações (3) e os tempos (4), com exceção do tempo 0h, apresentam pelo menos um valor diferindo da média com relação ao tempo de exposição e às concentrações, respectivamente.

A concentração de 0,750 mM de NiCl₂ foi escolhida por apresentar viabilidade celular, através da contagem das células coradas com *trypan blue*, em torno de 62,8% para os períodos de exposição. As concentrações de 1,000 mM e 2,000 mM resultaram na queda expressiva da viabilidade, no decorrer do tempo de exposição ao metal, prejudicando as análises. Consequentemente, foi escolhida a concentração de 0,075 mM por ser um valor 10x menor.

A viabilidade das células para as concentrações de Ni selecionadas, 0; 0,075 e 0,750 mM, pode ser observada na Figura 2. A Tabela 5 fornece a média das células viáveis para cada período, a Tabela 6 demonstra que ocorreu diferença significativa entre as concentrações e os períodos de exposição e que também ocorreu interação entre estes fatores, com relação ao controle. Nas Tabelas 7 e 8, observa-se que todas as concentrações (7) e os tempos (8), com

exceção do tempo 0h, apresentam pelo menos um valor diferindo da média com relação ao tempo de exposição e as concentrações, respectivamente.

O efeito do metal pode ser comprovado pela análise da curva de crescimento, Figura 3. Observou-se o crescimento gradativo das células do controle e da concentração de 0,075 mM, no decorrer do tempo, as células expostas ao tratamento de 0,750 mM apresentaram redução no crescimento.

A Tabela 9 fornece as médias do crescimento do número de células. Observa-se que ocorreu diferenças significativas entre as concentrações e os períodos de exposição, além da interação entre os fatores, como demonstra a Tabela 10. Entre todas as concentrações ocorreu pelo menos um valor que difere da média para os diferentes tempos (Tabela 11) e o mesmo ocorreu com os tempos, com exceção do tempo 0h, com relação as concentrações (Tabela 12).

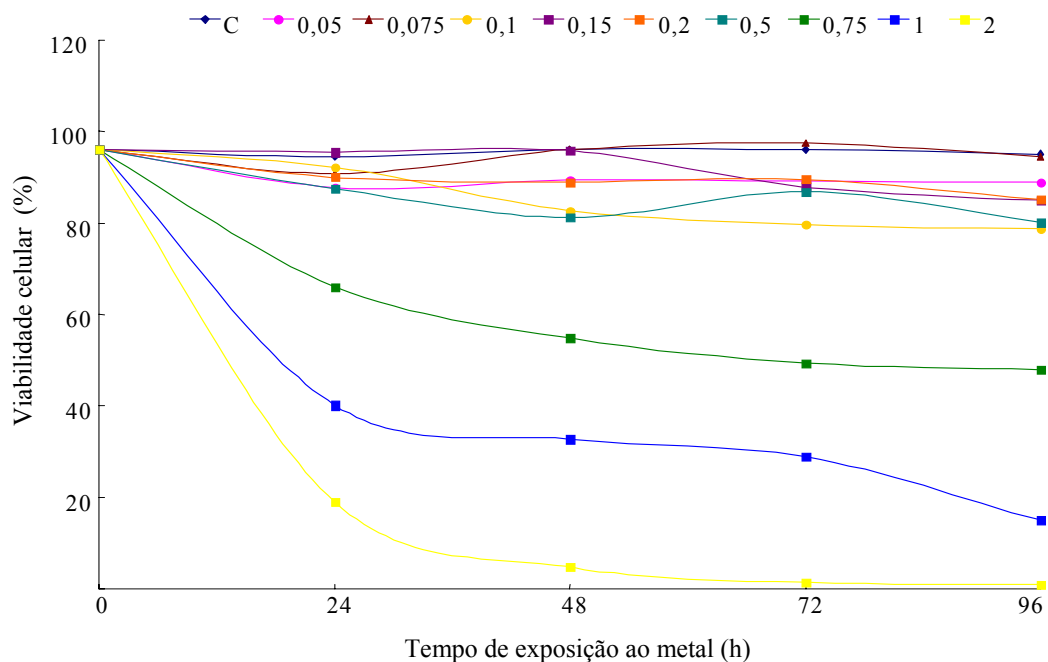


Figura 1 - Viabilidade das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas às concentrações de 0; 0,050; 0,075; 0,100; 0,150; 0,200; 0,500; 0,750; 1,000 e 2,000 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96h, em porcentagem (%)

Tabela 1 - Média da viabilidade das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 expostas às concentrações de NiCl₂, por determinados tempos, em porcentagem (%)

Concentração (mM NiCl ₂)	Tempo (h)				
	0	24	48	72	96
Controle	96,0	94,6	96,3	96,2	95,2
0,050	96,0	87,5	89,4	89,2	88,8
0,075	96,0	90,7	96,1	97,5	94,5
0,100	96,0	92,3	82,8	79,6	78,6
0,150	96,0	95,5	95,6	87,9	84,7
0,200	96,0	90,3	88,6	89,5	85,2
0,500	96,0	87,6	81,3	86,6	80,2
0,750	96,0	66,2	54,5	49,4	48,0
1,000	96,0	40,0	32,7	28,8	15,0
2,000	96,0	19,2	4,7	1,4	1,0

Tabela 2 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises da viabilidade celular (Programa ESTAT)

Varição	GL	SQ	QM	F
Concentração	9	83213,2721	9245,9191	397389,0739**
Tempo	4	15621,0471	3905,2618	167847,9269**
Conc x Tempo	36	22628,5756	628,5715	27015,9690**
Tratamentos	49	121462,8947	2478,8346	
Resíduos	100	2,3267	0,0233	

** 1% de significância; CV = 0,1994; DP = 0,1525

Tabela 3 - Análise de variância da Tabela 2 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	4	6,2640	1,5660	67,3066**
0,050	4	133,1560	33,2890	1430,7593**
0,075	4	81,4867	20,3717	875,5731**
0,100	4	732,7107	183,1777	7872,9656**
0,150	4	333,7400	83,4350	3586,0315**
0,200	4	185,1240	46,2810	1989,1547**
0,500	4	474,7307	118,6827	5100,9742**
0,750	4	4734,9493	1183,7373	50876,9628**
1,000	4	11721,7107	2930,4277	125949,6132**
2,000	4	19845,7507	4961,4377	213242,3066**

Tabela 4 - Análise de variância da Tabela 2 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	9	0,0000	0,0000	0,0000 NS
24	9	18871,7937	2096,8660	90123,1789**
48	9	26650,3013	2961,1446	127269,8249**
72	9	29110,5230	3234,5026	139018,7345**
96	9	31209,2297	3467,6922	149041,2114**

NS = não significativo

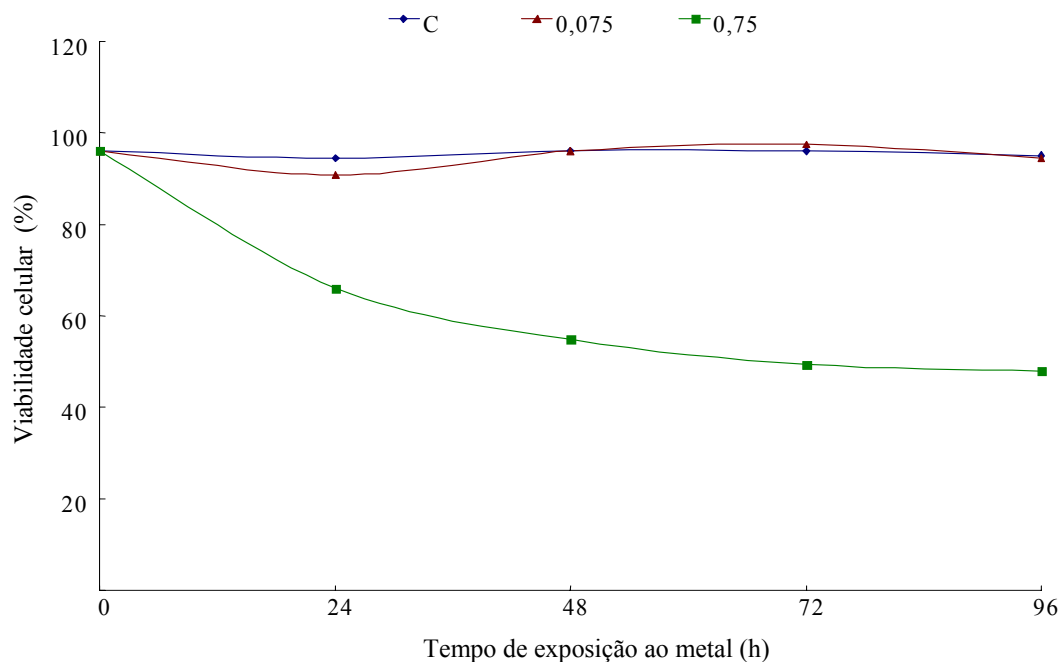


Figura 2 - Viabilidade das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96h, em porcentagem (%)

Tabela 5 - Média da viabilidade das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas as concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96h, em porcentagem (%)

Tempo (h)	Controle	0,075	0,750
0	96,0	96,0	96,0
24	94,6	90,7	66,2
48	96,2	96,0	54,7
72	96,0	97,5	49,6
96	95,4	94,6	48,1

Tabela 6 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises da viabilidade celular (Programa ESTAT)

Varição	GL	SQ	QM	F
Concentração	2	10481,5696	5240,7847	298525,7089**
Tempo	4	1580,8209	395,2052	22511,6899**
Conc x Tempo	8	3205,8551	400,7319	22826,5000**
Tratamentos	14	15268,2453	1090,5890	
Resíduos	30	0,5267	0,0176	

** 1% de significância; CV = 0,1568; DP = 0,1325

Tabela 7 - Análise de variância da Tabela 6 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	4	4,9307	1,2327	70,2152**
0,075	4	78,9827	19,7457	1124,7532**
0,750	4	4702,7627	1175,6907	66969,7215**

Tabela 8 - Análise de variância da Tabela 6 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	2	0,0000	0,0000	0,0000NS
24	2	1426,9267	713,4633	40640,3165**
48	2	3416,9489	1708,4744	97318,1646**
72	2	4449,6200	2224,8100	126729,6835**
96	2	4393,9289	2196,9644	125143,5443**

NS = não significativo

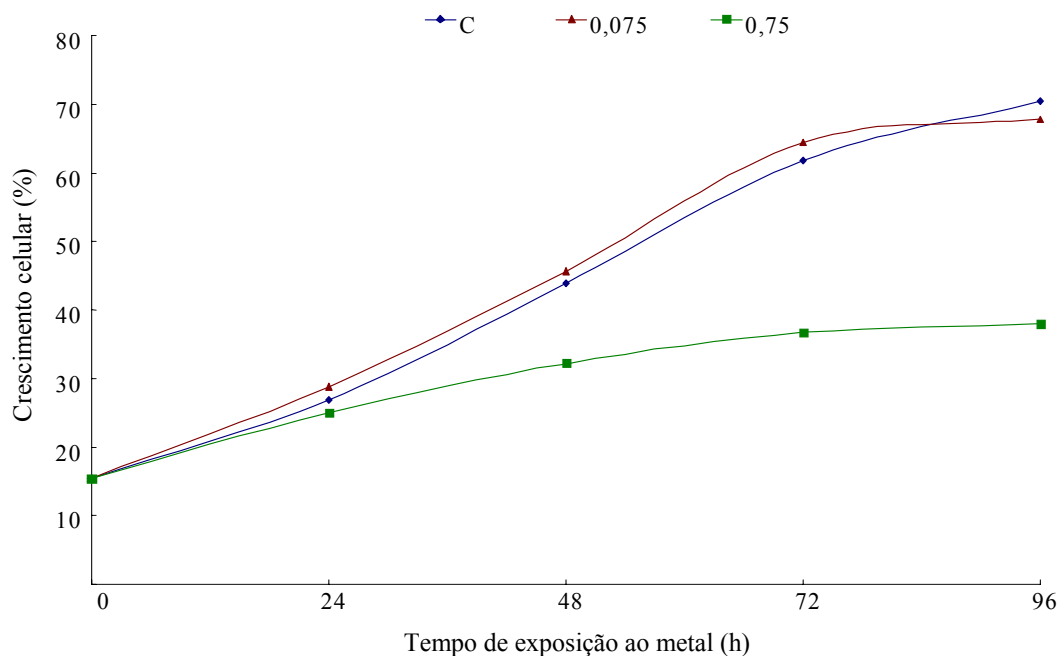


Figura 3 - Crescimento das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas as concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96h, em porcentagem (%)

Tabela 9 - Média do crescimento das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas as concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96h, em porcentagem (%)

Tempo (h)	Controle	0,075	0,750
0	15,5	15,5	15,5
24	26,8	28,8	25,0
48	43,7	45,5	32,2
72	61,6	64,5	36,6
96	70,4	67,8	38,2

Tabela 10 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises do crescimento celular (Programa ESTAT)

Varição	GL	SQ	QM	F
Concentração	2	2110,4440	1055,2220	45658,6442**
Tempo	4	11940,8320	2985,2080	129167,6538**
Conc x Tempo	8	1552,4627	194,0578	8396,7332**
Tratamentos	14	15603,7387	1114,5528	
Resíduos	30	0,6933	0,0231	

** 1% de significância; CV = 0,3879; DP = 0,1520

Tabela 11 - Análise de variância da Tabela 10 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	4	6345,9240	1586,4810	68645,8125**
0,075	4	6095,6000	1523,9000	6537,9808**
0,750	4	1051,7707	262,9427	11377,3269**

Tabela 12 - Análise de variância da Tabela 10 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	2	0,0000	0,0000	0,0000NS
24	2	22,0689	11,0344	477,4519**
48	2	313,0289	156,5144	6772,2596**
72	2	1406,2467	703,1233	30423,6058**
96	2	1921,5622	960,7811	41572,2596**

NS = não significativo

2.3.2 Atividade de superóxido dismutase em PAGE não-desnaturante

2.3.2.1 Atividade de SOD em PAGE não-desnaturante

Os resultados da atividade de SOD em PAGE não-desnaturante demonstraram que não ocorreu variação expressiva da atividade da enzima tanto para as concentrações, como para os períodos de exposição ao metal. Foi possível observar duas isoformas, Mn-SOD (I), resistente à presença de KCN e H₂O₂ e Fe-SOD (II), resistente à KCN e inativada na presença de H₂O₂, através da análise das amostras do controle (0 mM) para o tempo de 36h.

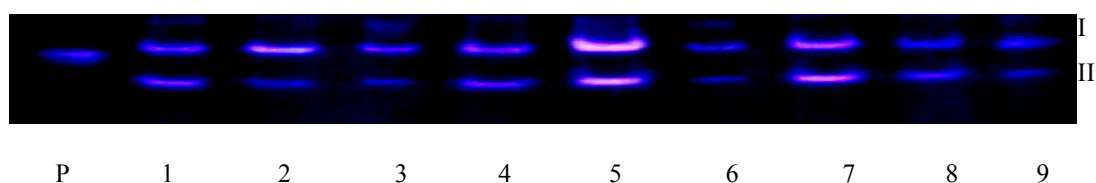


Figura 4 - Atividade de SOD em PAGE não-desnaturante em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas aos tratamentos com NiCl₂. Padrão (P) de SOD de fígado bovino; 1, 2 e 3 representam a concentração de 0 mM nos tempos 12, 36 e 72h; 4, 5 e 6 representam a concentração de 0,075 mM e 7, 8 e 9, a concentração de 0,750mM, para os mesmos tempos

2.3.2.2 Isoenzimas de SOD

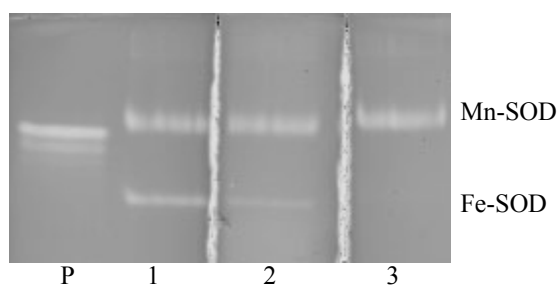


Figura 5 - Atividade das isoformas de SOD em PAGE não-desnaturante em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2. Padrão (P) de SOD de fígado bovino; 1 (controle, 36h); 2 (controle, 36h, KCN) e 3 (controle, 36h, H₂O₂)

2.3.3 Atividade de catalase em espectrofotômetro e PAGE não-desnaturante

A atividade de catalase (Figura 6 e Tabela 13) apresentou diferenças significativas entre as concentrações e durante o período de exposição ao metal, foi observado também a ocorrência de interação entre as concentrações e os tempos, com relação ao controle (Tabela 14). Na concentração de 0,075 mM ocorreu um aumento progressivo da atividade da enzima até às 48h, seguido de queda até 72h, ocorrendo outro aumento da atividade até 96h. A concentração de 0,750 mM resultou também em um aumento da atividade, porém até às 36h de exposição ao metal, após este período ocorreu uma diminuição até às 72h, seguida de aumento até 96h.

A maior atividade de CAT observada para o controle foi às 96h, para a concentração de 0,075 mM, foi às 48h e para a concentração de 0,750 mM, às 36h, sendo que esta concentração possui, em média, a maior atividade detectada para a enzima, neste experimento.

A atividade de CAT em PAGE não-desnaturante (Figura 7) foi analisada nos tempos 12h, 36h e 72h, seguindo o padrão da análise em espectrofotômetro, sendo observada somente uma isoforma.

Na Tabela 15 observa-se que todas as concentrações apresentaram pelo menos um valor diferindo da média com relação aos períodos de exposição. Na Tabela 16, com exceção do tempo 0h, os demais horários apresentaram pelo menos um valor diferindo da média para as concentrações.

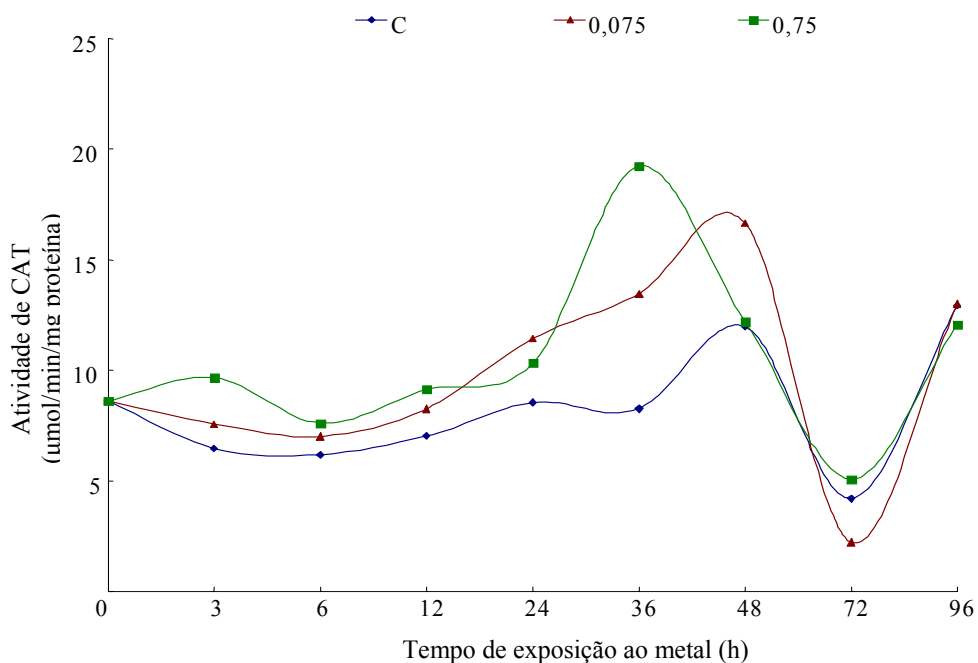


Figura 6 - Atividade específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h

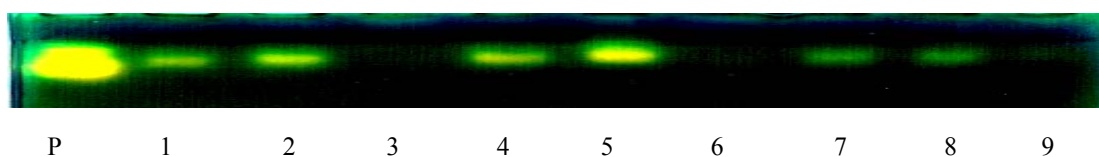


Figura 7 - Atividade de CAT em PAGE não-desnaturante em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas aos tratamentos com NiCl_2 . Padrão (P) de CAT bovina; 1, 2 e 3 representam a concentração de 0 mM nos tempos 12, 36 e 72h; 4, 5 e 6 representam a concentração de 0,075 mM e 7, 8 e 9, a concentração de 0,750mM, para os mesmos tempos

Tabela 13 - Média da atividade da enzima catalase das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetida às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h, em µmol/min/mg de proteína

Tempo (h)	Controle	0,075	0,750
0	8,614	8,614	8,614
3	6,487	7,578	9,675
6	6,197	7,015	7,609
12	7,026	8,256	9,125
24	8,546	11,439	10,322
36	8,274	13,462	19,232
48	11,972	16,651	12,200
72	4,203	2,237	5,093
96	12,938	12,991	12,057

Tabela 14 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises da atividade enzimática da catalase (Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Concentração	2	68,3139	34,1569	160687,1270**
Tempo	8	793,9664	99,2458	466889,8903**
Conc x Tempo	16	206,4248	12,9016	60693,7898**
Tratamentos	26	1068,7051	41,1040	
Resíduos	54	0,0115	0,0002	

** 1% de significância; CV = 0,1535; DP = 0,0146

Tabela 15 - Análise de variância da Tabela 14 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	8	183,7489	22,9686	108053,0758**
0,075	8	440,7774	55,0972	259197,9911**
0,750	8	375,8649	46,9831	221026,4030**

Tabela 16 - Análise de variância da Tabela 14 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	2	0,0000	0,0000	0,0000NS
3	2	15,7510	7,8755	37049,4179**
6	2	3,0172	1,5086	7097,0049**
12	2	6,6679	3,3340	15684,2307**
24	2	12,7784	6,3892	30057,2678**
36	2	180,2752	90,1376	424041,5490**
48	2	41,7747	20,8873	98261,9854**
72	2	12,8204	6,4102	30156,0634**
96	2	1,6537	0,8269	3889,9262**

NS = não significativo

2.3.4 Atividade de glutathiona redutase em espectrofotômetro e em PAGE não-desnaturante

A atividade de GR (Figura 8 e Tabela 17) apresentou diferenças significativas entre as concentrações e os períodos de exposição, além da interação entre os fatores, com relação ao controle (Tabela 18). Para a concentração de 0,075 mM ocorreu um aumento progressivo da atividade até às 36h, seguido de queda até 72h e significativo aumento até às 96h. No tratamento de 0,750 mM de NiCl₂ a atividade da enzima aumentou durante as primeiras 6h de exposição e em seguida houve uma queda da atividade até às 72h, seguida do aumento desta até 96h.

A maior atividade desta enzima, para o controle, foi observada às 96h. Para a concentração de 0,075 mM, este pico ocorreu às 36h e às 6h de exposição das células a concentração de 0,750 mM. A concentração de 0,750 mM de NiCl₂ possui, em média, a maior atividade da enzima, neste experimento.

A atividade em PAGE não-desnaturante (Figura 9) foi observada nos três tratamentos, para os tempos de 12h, 36h e 72h, seguindo o padrão da análise em espectrofotômetro. Observou-se duas isoformas.

A Tabela 19 demonstra que todas as concentrações apresentaram pelo menos um valor diferindo da média com relação aos períodos de exposição ao metal. Estes períodos, com exceção do tempo 0h, apresentaram pelo menos um valor diferindo da média com relação as concentrações (Tabela 20).

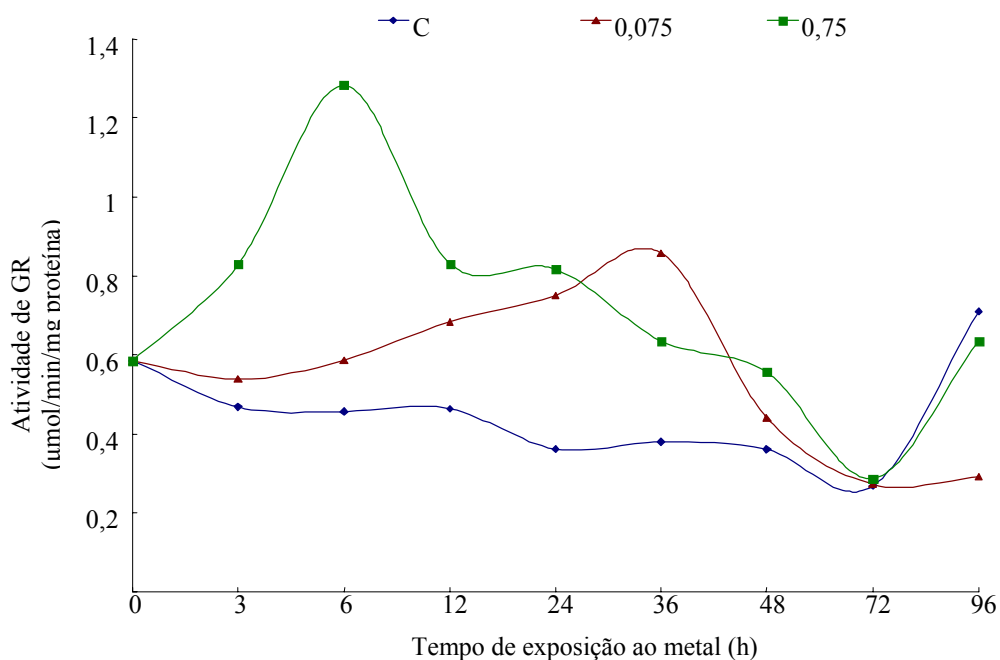


Figura 8 - Atividade específica de GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h

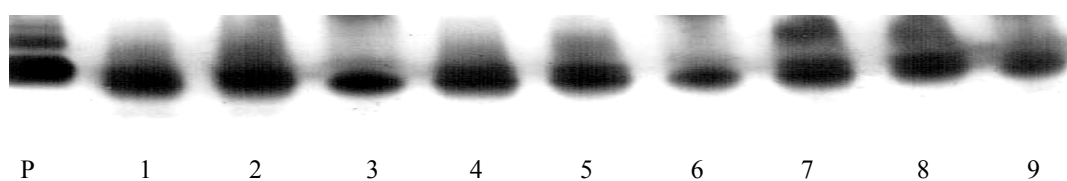


Figura 9 - Atividade de GR em PAGE não-desnaturante em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas aos tratamentos com NiCl_2 . Padrão (P) de GR; 1, 2 e 3 representam a concentração de 0 mM nos tempos 12, 36 e 72h; 4, 5 e 6 representam a concentração de 0,075 mM e 7, 8 e 9, a concentração de 0,750 mM, para os mesmos tempos

Tabela 17 - Média da atividade da enzima glutationa redutase das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetida às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h, em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína

Tempo (h)	Controle	0,075	0,750
0	0,586	0,586	0,586
3	0,468	0,538	0,829
6	0,457	0,587	1,282
12	0,463	0,683	0,831
24	0,362	0,751	0,818
36	0,380	0,858	0,636
48	0,361	0,440	0,556
72	0,267	0,273	0,287
96	0,710	0,292	0,635

Tabela 18 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises da atividade enzimática da glutationa redutase (Programa ESTAT)

Varição	GL	SQ	QM	F
Concentração	2	0,9776	0,4888	36489,2636**
Tempo	8	1,4538	0,1817	13566,2373**
Conc x Tempo	16	1,6909	0,1057	7889,4887**
Tratamentos	26	4,1222	0,1585	
Resíduos	54	0,0007	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,6367; DP = 0,5748

Tabela 19 - Análise de variância da Tabela 18 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	8	0,4222	0,0528	3940,2525**
0,075	8	0,9328	0,1166	8704,8276**
0,750	8	1,7896	0,2237	16700,1346**

Tabela 20 - Análise de variância da Tabela 18 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	2	0,0000	0,0000	0,0000NS
3	2	0,2199	0,1100	8208,3235**
6	2	1,1793	0,5896	44019,1161**
12	2	0,2057	0,1029	7679,2479**
24	2	0,3637	0,1819	13577,6157**
36	2	0,3438	0,1719	12832,8470**
48	2	0,0574	0,0287	2140,9963**
72	2	0,0006	0,0003	23,5908**
96	2	0,2980	0,1490	11123,4276**

NS = não significativo

2.3.5 Atividade de glutathiona-S-transferase em espectrofotômetro

A atividade de GST (Figura 10 e Tabela 21) demonstrou diferenças significativas entre as concentrações e os períodos de exposição, e também a interação entre as concentrações e os tempos, com relação ao controle (Tabela 22). A atividade do tratamento com 0,075 mM do metal iniciou-se com queda até às 6h, porém, esta foi aumentando progressivamente até às 36h, seguindo-se da diminuição da atividade da enzima até às 72h, com outro aumento observado até às 96h. Para a concentração de 0,750 mM NiCl₂ ocorreu aumento da atividade até às 24h de exposição, seguindo-se de queda até às 72h e aumento significativo até às 96h.

A maior atividade enzimática foi observada para o controle às 96h, às 36h para a concentração de 0,075 mM e às 24h para 0,750 mM, sendo que esta concentração possui a maior média da atividade de GST, neste experimento.

A análise estatística mostra que todas as concentrações apresentaram pelo menos um valor diferindo da média com relação aos períodos de exposição (Tabela 23). A Tabela 24 mostra que com exceção do tempo 0h, pelo menos um valor de exposição está diferindo da média com relação as concentrações.

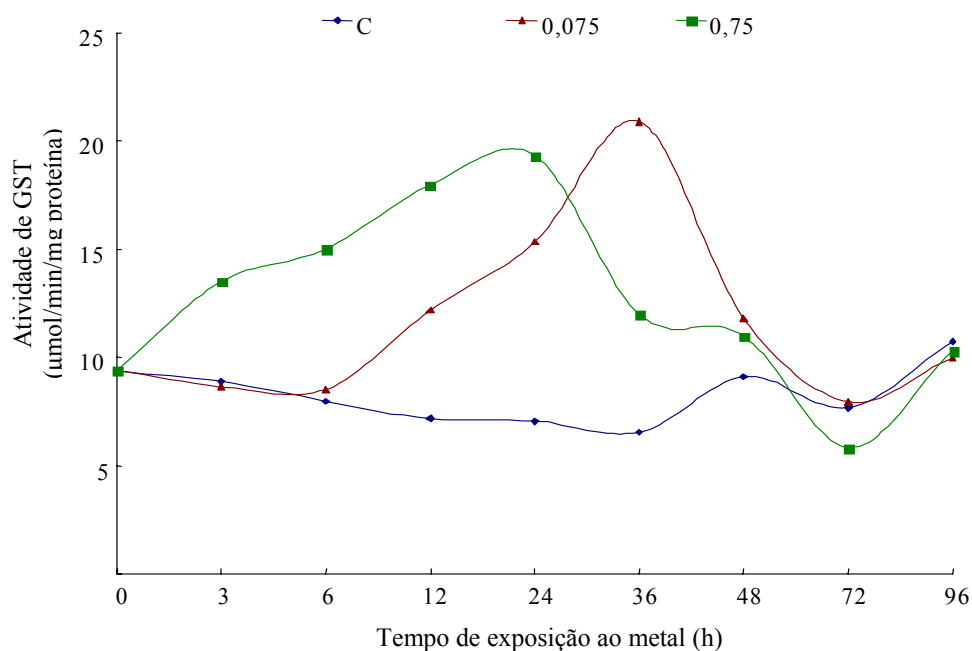


Figura 10 - Atividade específica de GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h

Tabela 21 - Média da atividade da enzima glutationa-S-transferase das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetida às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h, em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína

Tempo (h)	Controle	0,075	0,750
0	9,386	9,386	9,386
3	8,874	8,638	13,488
6	7,953	8,500	15,001
12	7,154	12,163	17,952
24	7,036	15,323	19,296
36	6,532	20,881	11,957
48	9,092	11,769	10,985
72	7,667	7,939	5,813
96	10,714	9,964	10,292

Tabela 22 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises da atividade enzimática da glutatona-S-transferase (Programa ESTAT)

Varição	GL	SQ	QM	F
Concentração	2	286,9698	143,4849	8745129,8247**
Tempo	8	301,4547	37,6818	2296635,3523**
Conc x Tempo	16	595,3354	37,2085	2267784,3845**
Tratamentos	26	1183,7599	45,5292	
Resíduos	54	0,0009	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,0373; DP = 0,0041

Tabela 23 - Análise de variância da Tabela 22 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	8	43,5409	5,4426	331716,8200**
0,075	8	419,1148	52,3893	3193030,1682**
0,750	8	434,4344	54,2668	3307457,1332**

Tabela 24 - Análise de variância da Tabela 22 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	2	0,0000	0,0000	0,0000NS
3	2	44,8672	22,4336	1367284,6321**
6	2	92,2275	46,1137	2810544,0203**
12	2	175,2105	87,6052	5339370,8059**
24	2	234,7941	117,3970	7155124,7878**
36	2	314,9622	157,4811	958170,9413**
48	2	11,3644	5,6822	346320,2235**
72	2	8,0312	4,0156	244742,3837**
96	2	0,8482	0,4241	25847,1061**

NS = não significativo

2.3.6 Atividade de guaiacol peroxidase em espectrofotômetro

A atividade da enzima GPX (Figura 11 e Tabela 25) apresentou diferenças significativas entre os tratamentos e os períodos de exposição ao metal, e interação entre as concentrações e os períodos de exposição, com relação ao controle (Tabela 26). Na concentração de 0,075 mM ocorreu queda na atividade até às 6h. Em seguida, ocorreu um aumento significativo até às 72h, seguido de queda até às 96h. Foi observado para a concentração de 0,750mM queda nas primeiras 3h, seguindo-se de aumento progressivo até às 72h, com queda até às 96h de exposição.

A maior atividade enzimática observada neste experimento foi às 72h para as concentrações e o controle. Em média, a concentração que provocou o maior aumento da atividade foi 0,750mM.

A análise estatística mostra que todas as concentrações apresentaram pelo menos um valor diferindo da média com relação aos períodos de exposição (Tabela 27). A Tabela 28 mostra que com exceção do tempo 0h, pelo menos um valor de exposição está diferindo da média com relação as concentrações.

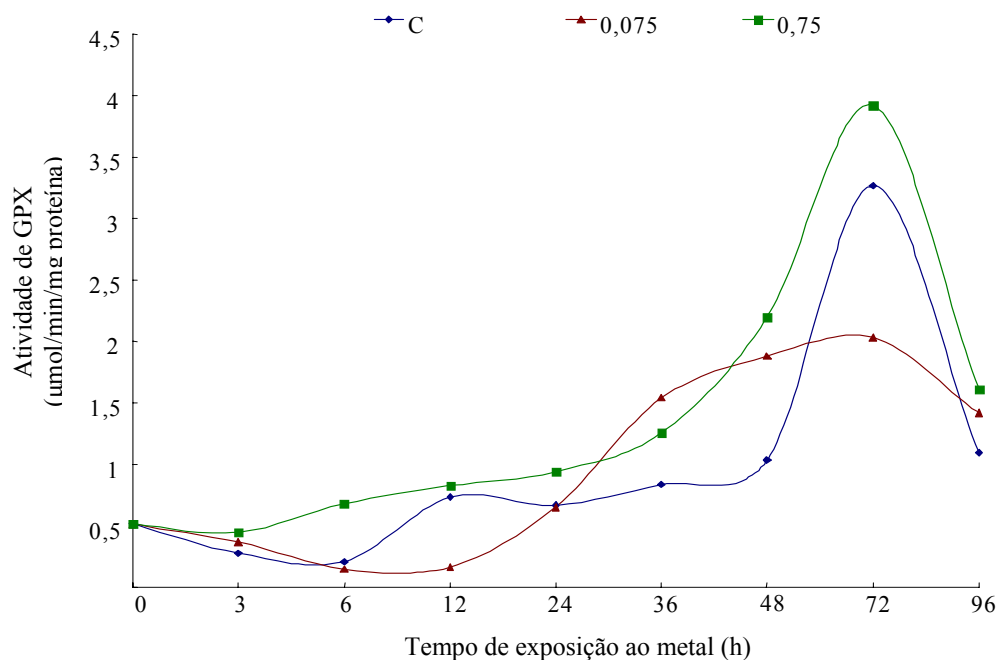


Figura 11 - Atividade específica de GPX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h

Tabela 25 - Média da atividade da enzima guaiacol peroxidase das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetida às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h, em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína

Tempo (h)	Controle	0,075	0,750
0	0,515	0,515	0,515
3	0,276	0,368	0,448
6	0,209	0,147	0,679
12	0,732	0,165	0,826
24	0,669	0,651	0,939
36	0,837	1,540	1,256
48	1,035	1,876	2,196
72	3,266	2,031	3,922
96	1,096	1,421	1,612

Tabela 26 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises da atividade enzimática da guaiacol peroxidase (Programa ESTAT)

Varição	GL	SQ	QM	F
Concentração	2	3,1419	1,5709	155368,3626**
Tempo	8	55,6257	6,9532	687679,9313**
Conc x Tempo	16	7,2468	0,4529	44795,0302**
Tratamentos	26	66,0144	2,5390	
Resíduos	54	0,0005	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,2883; DP = 0,0032

Tabela 27 - Análise de variância da Tabela 26 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	8	20,1703	2,5213	249357,9890**
0,075	8	13,4141	1,6768	165833,9093**
0,750	8	29,2881	3,6610	362078,0934**

Tabela 28 - Análise de variância da Tabela 26 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	2	0,0000	0,0000	0,0000NS
3	2	0,0444	0,0222	2197,9780**
6	2	0,5078	0,2539	25109,4066**
12	2	0,8325	0,4163	41168,4725**
24	2	0,1562	0,0781	7722,5934**
36	2	0,7504	0,3752	37108,9780**
48	2	2,1576	1,0788	106694,6044**
72	2	5,5314	2,7657	273532,8462**
96	2	0,4084	0,2042	20193,7253**

NS = não significativo

2.3.7 Atividade de ascorbato peroxidase em espectrofotômetro

A atividade da enzima APX (Figura 12 e Tabela 29) também apresentou diferenças significativas entre as concentrações e os períodos de exposição, e interação entre as concentrações e os tempos, com relação ao controle (Tabela 30). A atividade da concentração de 0,075 mM iniciou-se com uma queda significativa às 3h, seguida do aumento progressivo, até o período de 6h, em seguida, ocorreu outra queda até às 96h. Para 0,750 mM, observou-se um aumento na atividade enzimática até às 24h, seguido de queda até 72h de exposição ao metal e aumento às 96h.

Em média, a concentração de 0,750 mM obteve a maior atividade de APX, sendo o pico desta observado às 24h de exposição. A concentração de 0,075 mM obteve a maior atividade às 6h e o controle às 48h, neste experimento.

A análise estatística mostra que todas as concentrações apresentaram pelo menos um valor diferindo da média com relação aos períodos de exposição (Tabela 31). A Tabela 32 mostra que com exceção do tempo 0h, pelo menos um valor de exposição está diferindo da média com relação as concentrações.

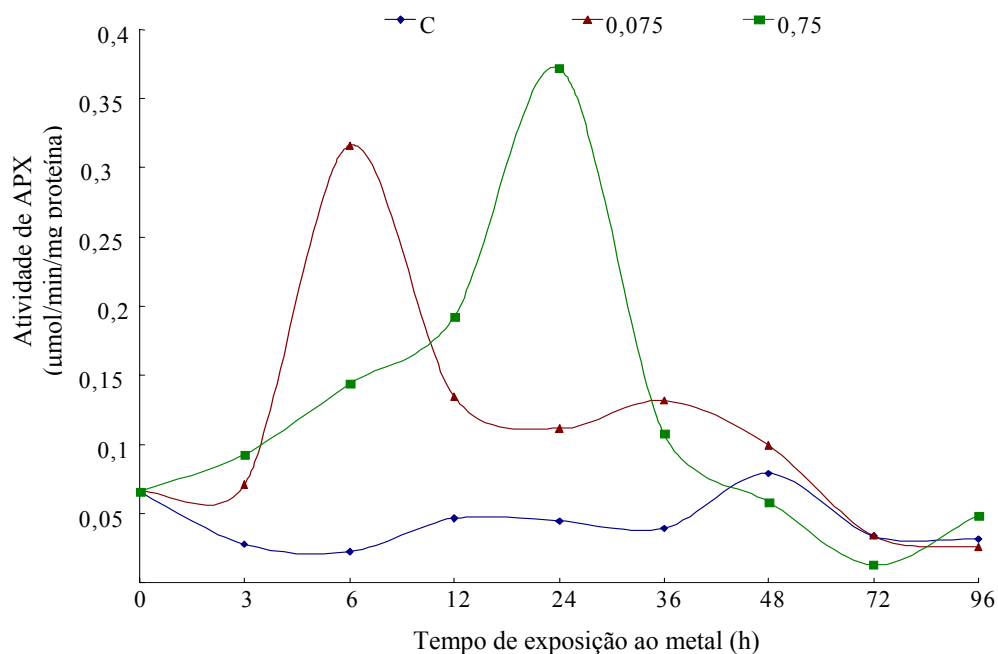


Figura 12 - Atividade específica de APX ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h

Tabela 29 - Média da atividade da enzima ascorbato peroxidase das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetida às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl_2 , nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h, em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína

Tempo (h)	Controle	0,075	0,750
0	0,065	0,065	0,065
3	0,027	0,071	0,092
6	0,022	0,315	0,143
12	0,046	0,134	0,192
24	0,044	0,111	0,371
36	0,039	0,131	0,108
48	0,078	0,099	0,058
72	0,033	0,033	0,013
96	0,031	0,025	0,048

Tabela 30 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises da atividade enzimática da ascorbato peroxidase (Programa ESTAT)

Varição	GL	SQ	QM	F
Concentração	2	0,0905	0,0453	495,3957**
Tempo	8	0,2052	0,0256	280,7543**
Conc x Tempo	16	0,2754	0,0172	188,3795**
Tratamentos	26	0,5711	0,0220	
Resíduos	54	0,0049	0,0001	

** 1% de significância; CV = 10,7601; DP = 0,0096

Tabela 31 - Análise de variância da Tabela 30 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	8	0,0080	0,0010	10,9824**
0,075	8	0,1931	0,0241	264,2476**
0,750	8	0,2794	0,0349	382,2833**

Tabela 32 - Análise de variância da Tabela 30 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	2	0,0000	0,0000	0,0000NS
3	2	0,0066	0,0033	36,1324**
6	2	0,1301	0,0650	711,8876**
12	2	0,0324	0,0162	177,4547**
24	2	0,1790	0,0895	979,7554**
36	2	0,0138	0,0069	75,2749**
48	2	0,0024	0,0012	12,8741**
72	2	0,0008	0,0004	4,3784**
96	2	0,0009	0,0004	4,6739**

NS = não significativo

2.3.8 Peroxidação lipídica

2.3.8.1 Quantificação de MDA em espectrofotômetro

A quantificação de MDA (Figura 13 e Tabela 33) possui diferenças significativas entre as concentrações e os períodos de exposição, e interação entre os fatores, com relação ao controle (Tabela 34). A quantidade de MDA para a concentração de 0,075 mM diminuiu até às 6h, em seguida, ocorreu um aumento até às 36h. Entre 12h e 24h, a variação da quantidade não foi significativa. Às 48h ocorreu diminuição seguida do aumento da quantidade às 72h, seguido de diminuição até às 96h.

Para a concentração de 0,750 mM observou-se uma diminuição da quantidade de MDA até às 6h, seguindo-se de um aumento progressivo até às 36h. Às 48h de exposição ao metal ocorreu uma diminuição da quantidade de MDA, em seguida, às 72h, ocorreu aumento, finalizando-se com queda às 96h.

A média da quantidade de MDA foi maior para a concentração de 0,750 mM, sendo observada no período de 72h de exposição. A concentração de 0,075 mM apresentou maior quantidade às 36h e 72h, não sendo significativa a diferença entre estes dois tempos. O controle apresentou a maior quantidade nos períodos de 3h, 24h, 48h e 72h, não sendo significativa a diferença entre estes tempos.

A Tabela 36 mostra que com exceção do tempo 0h, pelo menos um valor de exposição está diferindo da média com relação às concentrações. A análise estatística mostra que todas as concentrações apresentaram pelo menos um valor diferindo da média com relação aos períodos de exposição (Tabela 35).

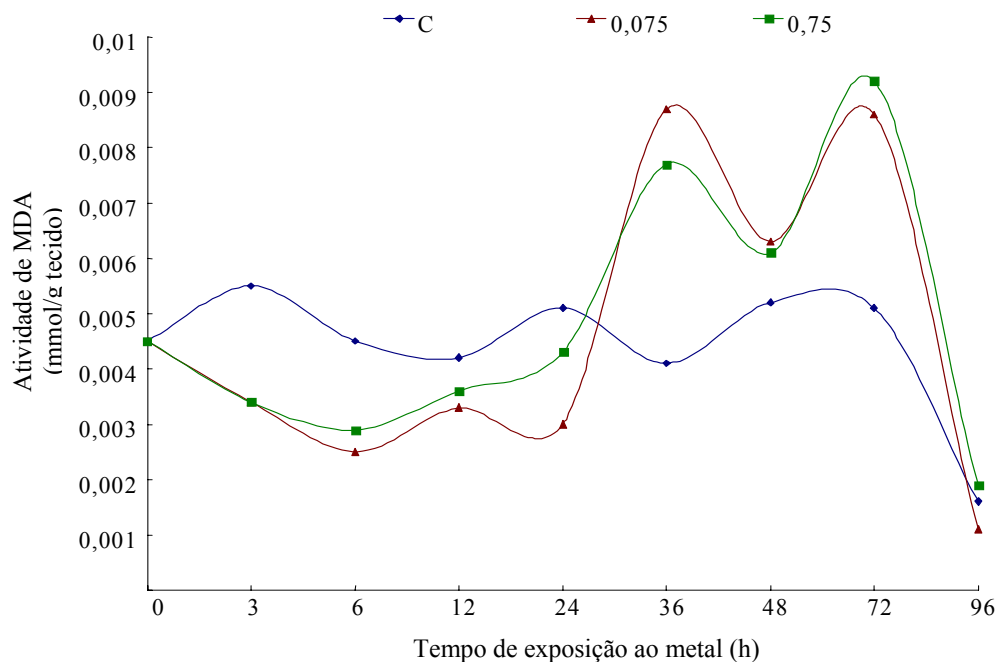


Figura 13 – Quantidade de MDA (mmol/g de tecido) em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h

Tabela 33 - Média da quantidade do ácido malonaldeído das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetida às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h, em mmol/g de tecido

Tempo (h)	Controle	0,075	0,750
0	0,0045	0,0045	0,0045
3	0,0055	0,0034	0,0034
6	0,0045	0,0025	0,0029
12	0,0042	0,0033	0,0036
24	0,0051	0,0030	0,0043
36	0,0041	0,0087	0,0077
48	0,0052	0,0063	0,0061
72	0,0051	0,0086	0,0092
96	0,0016	0,0011	0,0019

Tabela 34 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises da quantidade do ácido malonaldeído (Programa ESTAT)

Varição	GL	SQ	QM	F
Concentração	2	0,0000	0,0000	32,7600**
Tempo	8	0,0003	0,0000	855,6975**
Conc x Tempo	16	0,0001	0,0000	149,6700**
Tratamentos	26	0,0003	0,0000	
Resíduos	54	0,0000	0,0000	

** 1% de significância; CV = 4,1636; DP = 0,0002

Tabela 35 - Análise de variância da Tabela 34 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	8	0,0000	0,0000	109,5075**
0,075	8	0,0002	0,0000	587,8575**
0,750	8	0,0001	0,0000	457,6725**

Tabela 36 - Análise de variância da Tabela 34 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	2	0,0000	0,0000	0,0000NS
3	2	0,0000	0,0000	119,0700**
6	2	0,0000	0,0000	90,7200**
12	2	0,0000	0,0000	17,0100**
24	2	0,0000	0,0000	90,9900**
36	2	0,0000	0,0000	474,1200**
48	2	0,0000	0,0000	27,8100**
72	2	0,0000	0,0000	397,1700**
96	2	0,0000	0,0000	13,2300**

NS = não significativo

2.3.9 Proteína

2.3.9.1 Quantificação de proteína em espectrofotômetro

Os teores de proteína (Figura 14 e Tabela 37) possuem diferenças significativas entre as concentrações e os períodos de exposição, e possuem também interação entre os fatores, com relação ao controle (Tabela 38). A quantidade de proteína para a concentração de 0,075 mM aumentou até às 6h, em seguida, ocorreu uma diminuição até às 24h, outro aumento foi observado às 48h, seguido de diminuição às 72h, finalizando com um aumento no teor de proteína às 96h.

Para a concentração de 0,750 mM observou-se queda da quantidade de proteína até às 24h, seguindo-se de um aumento progressivo até às 48h. Às 72h foi observado uma queda e às 96h novamente um aumento no teor de proteína das células expostas ao metal.

A média do teor de proteína foi maior para o controle, sendo observada no período de 48h de exposição. A concentração de 0,075 mM apresentou maior quantidade de proteína às 6h. A concentração de 0,750 mM apresentou o maior teor no período 0h, ou seja, quando o metal foi colocado.

A Tabela 40 mostra que com exceção do tempo 0h, pelo menos um valor de exposição está diferindo da média com relação as concentrações. A análise estatística mostra que todas as concentrações apresentaram pelo menos um valor diferindo da média com relação aos períodos de exposição (Tabela 39).

Em SDS-PAGE (Figura 15) os períodos analisados foram 12h, 36h e 72h de exposição, seguindo o padrão da análise em espectrofotômetro.

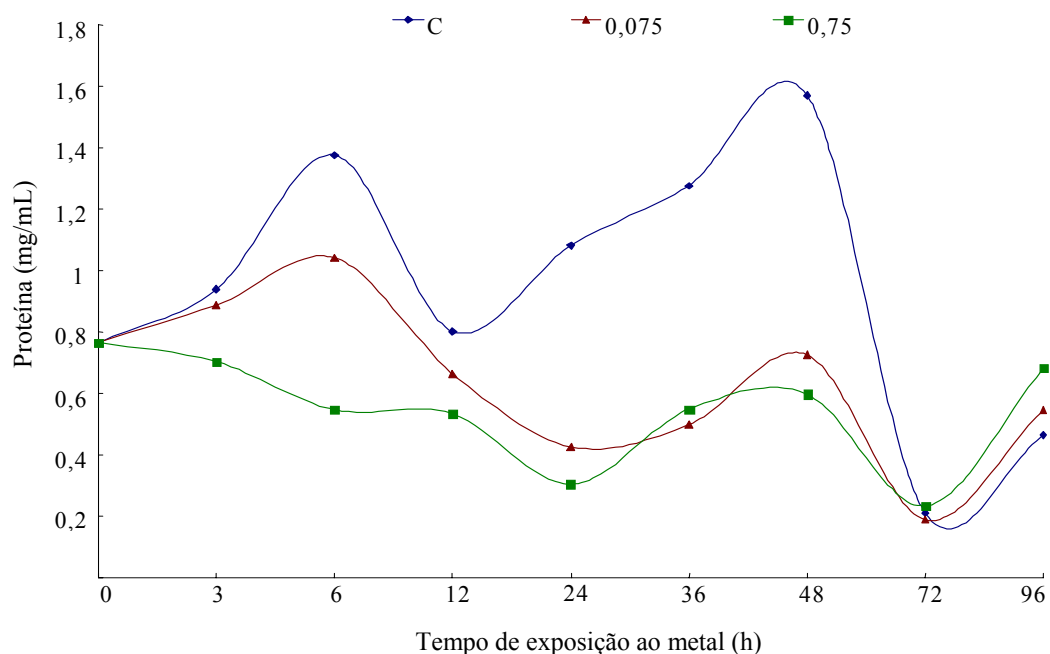


Figura 14 - Quantificação de proteínas (mg/mL) em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas as concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h.

Tabela 37 - Média do teor de proteína das células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetida às concentrações de 0; 0,075 e 0,750 mM de NiCl₂, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h, em mg/mL

Tempo (h)	Controle	0,075	0,750
0	0,767	0,767	0,767
3	0,488	0,888	0,702
6	1,374	1,043	0,547
12	0,801	0,665	0,534
24	1,082	0,424	0,316
36	1,275	0,498	0,547
48	1,570	0,726	0,597
72	0,212	0,188	0,234
96	0,463	0,547	0,682

2.3.9.2 Proteína em gel SDS-PAGE

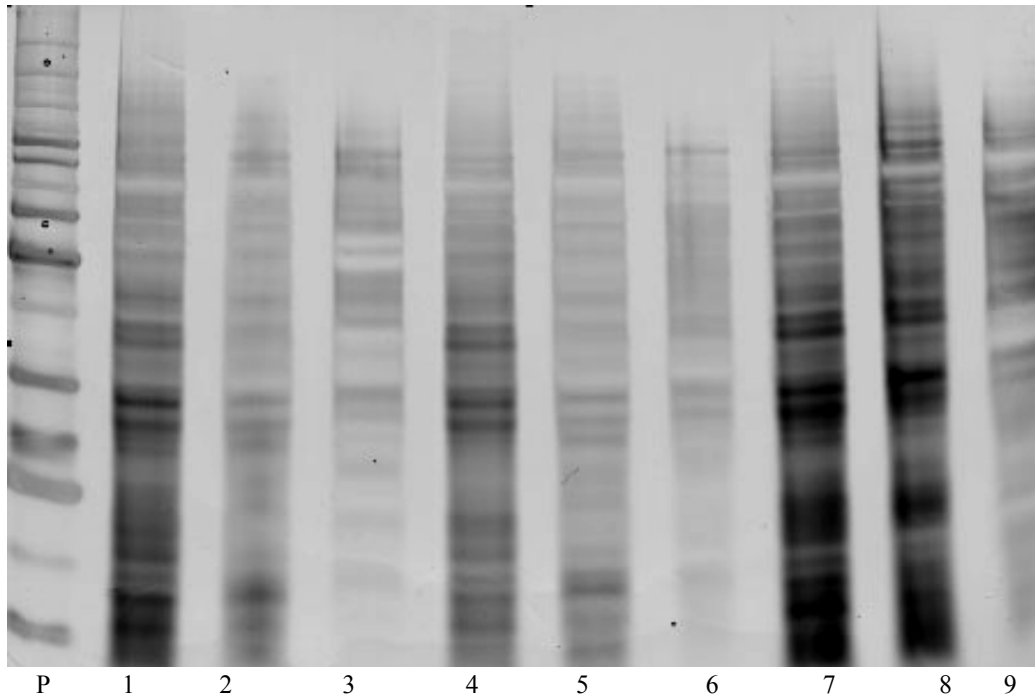


Figura 15 - Proteína em gel SDS-PAGE em células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas aos tratamentos com NiCl₂. Padrão (P) BSA; 1, 2 e 3 representam a concentração de 0 mM nos tempos 12, 36 e 72h; 4, 5 e 6 representam a concentração de 0,075 mM e 7, 8 e 9, a concentração de 0,750mM, para os mesmos tempos

Tabela 38 - Análise fatorial com 2 fatores, concentração e tempo, dos dados provenientes das análises da atividade da peroxidação lipídica (Programa ESTAT)

Varição	GL	SQ	QM	F
Concentração	2	1,7280	0,8640	714106,1327**
Tempo	8	3,8632	0,4829	399132,5740**
Conc x Tempo	16	3,5799	0,2237	184930,7449**
Tratamentos	26	9,1711	0,3527	
Resíduos	54	0,0001	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,1587; DP = 0,011

Tabela 39 - Análise de variância da Tabela 38 com desdobramento do fator concentração

Varição (mM)	GL	SQ	QM	F
Controle	8	5,1255	0,6407	529552,5459**
0,075	8	1,5834	0,1979	163586,6633**
0,750	8	0,7342	0,0918	75854,8546**

Tabela 40 - Análise de variância da Tabela 38 com desdobramento do fator tempo

Varição (h)	GL	SQ	QM	F
0	2	0,0000	0,0000	0,0000NS
3	2	0,2404	0,1202	99353,4796**
6	2	1,0396	0,5198	429637,3163**
12	2	0,1067	0,0533	44087,5102**
24	2	1,0316	0,5158	426324,7653**
36	2	1,1377	0,5688	470158,9898**
48	2	1,6757	0,8379	692511,1531**
72	2	0,0031	0,0016	1293,8878**
96	2	0,0730	0,0365	30184,9898**

NS = não significativo

2.4 Discussão

A cultura de células é o crescimento desorganizado de massas celulares (células indiferenciadas ou calos) que podem ser mantidas por longos períodos quando repicadas rotineiramente para novo meio. Apresenta vantagem no estudo com metais pesados devido ao fácil estabelecimento e a obtenção em elevadas quantidades, reduzindo o volume de solução contendo o metal, diminuindo os resíduos (NAGATA et al., 1992). Neste estudo foram utilizadas células não diferenciadas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2), para testar o efeito do metal níquel (Ni) no sistema antioxidante da célula.

O Ni é considerado um micronutriente essencial pois é constitutivo da enzima urease, participa do complexo enzimático hidrogenase, aumentando a eficiência da fixação do nitrogênio por leguminosas e participa da síntese de fitoalexinas, aumentando a resistência das plantas às doenças. Possui alta mobilidade sendo que sua acumulação ocorre de modo diferencial entre os tecidos e ao longo do ciclo vital da planta, sendo maior nos grãos, nas folhas e nas partes jovens (DIXON et al., 1975; POLACCO, 1977; KLUCAS et al., 1983; WALKER et al., 1985; BROWN et al., 1987; MALAN; FARRANT, 1998; PAIVA et al., 2002).

Em altas concentrações pode modificar a absorção e o transporte do nitrato, inibir as enzimas do Ciclo de Calvin, a biossíntese da clorofila, a glicólise, a assimilação do sulfato e pode induzir a produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs) (VAN ASSCHE; CLIJSTERS, 1990; FOYER et al., 1997; CHUGH; SAWHNEY, 1999; LEE; LEUSTEK, 1999; PALACIOS; MATAIX, 1999). Por esses motivos, essencialidade e fitotoxidez, este metal foi escolhido para o estudo.

As concentrações de NiCl₂ e os períodos de exposição utilizados foram determinados em análises preliminares onde as células de fumo cv BY-2 foram expostas às concentrações de 0,050; 0,075; 0,100; 0,150; 0,200; 0,500; 0,750; 1,000 e 2,000 mM de NiCl₂ nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96h.

As concentrações de 0,050 até 0,500 mM, apesar de apresentarem diferenças significativas entre elas, não apresentaram diferenças expressivas com relação ao controle. As concentrações de 1,000 e 2,000 mM provocaram a morte de elevado número de células, não sendo interessante o uso destas para o estudo enzimático, pois poderia ocorrer prejuízos na análise devido a presença reduzida de células viáveis.

A concentração de 0,750 mM de NiCl₂ apresentou viabilidade das células em torno de 63%, ou seja, ocorreu a morte celular, porém este valor não diminuiu drasticamente o número de células viáveis, permitindo que os dados obtidos possuísem maior credibilidade em se tratando de garantir que as células a serem analisadas estavam sob efeito significativo do estressor metal. De forma similar, foi escolhida a concentração de 0,075 mM por ser um valor dez vezes menor e causar pouco efeito no crescimento das células. Entre as concentrações estudadas, nenhuma estimulou o crescimento, com relação ao controle.

Em doses elevadas, os metais provocam um efeito deletério sobre o metabolismo celular, diminuindo a viabilidade e conseqüentemente o crescimento (BARCELO; POSCHENRIEDER, 1990; PANDOLFINI et al., 1996). Plantas como crotalária (*Crotalaria juncea* L.), milho (*Zea mays* L.) e células de café (*Coffea arabica* L.) em suspensão, expostas às concentrações de 0,500; 0,250 e 0,500 mM de Ni, respectivamente, tiveram seu crescimento reduzido (MISHRA et al., 1974; BACCOUCH et al., 1998; CARDOSO et al., 2005; GOMES-JUNIOR et al., 2005). O mesmo foi observado em células de fumo cv BY-2, em calos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e em plântulas de soja (*Glycine max* (L) Merr), na presença das concentrações de 0,200; 5,0 e 0,500 mM de cádmio (Cd). Na concentração de 0,100 mM e 1,0 mM de Cd porém, foi observado estímulo do crescimento das células de fumo cv BY-2 e nos calos de cana-de-açúcar, com relação ao controle, respectivamente (FERREIRA et al., 2002; FORNAZIER et al., 2002a,b; GRATÃO, 2003). Este efeito foi ainda observado no fungo *Aspergillus nidulans*, na concentração de 0,025 mM de Cd, que apesar da sensibilidade ao crescimento na presença do metal, nesta concentração apresentou estímulo ao mesmo (GUELFY, 2002).

As células das plantas possuem diversos mecanismos contra o estresse provocado por metais pesados: 1) exclusão celular do metal, 2) adsorção (fixação) de íons na parede celular, 3) síntese de enzimas antioxidantes e 4) síntese de fitoquelatinas (PCs), agentes complexantes de metais. Esses mecanismos podem competir entre si (TURNER; MARSHALL, 1972; COX et al., 1976; LOLKEMA et al., 1986; RAUSER, 1995; NAKAZAWA et al., 2004).

Como já foi citado, elevadas concentrações de Ni podem induzir a produção de EAOs (FOYER et al., 1997). As EAOs (radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (OH⁻) e oxigênio "singlet" (¹O₂)) são produtos gerados normalmente pelo metabolismo dos organismos aeróbios e provocam estresse oxidativo, dependendo da concentração, devido a ação tóxica e mutagênica sobre as células. Sua produção é estimulada por

fatores ambientais de estresse como a exposição a níveis elevados de luminosidade, seca, metais pesados, concentração de sais, temperatura, radiação ultravioleta (UV), poluição do ar, herbicidas, estresse físico e como resposta a estresses bióticos, tais como, o ataque de patógenos e durante as reações fotoquímicas da fotossíntese (BOWLER et al., 1994; ANGELOVA et al., 2000; MALLICK; MOHN, 2000).

As EAOs, em baixas concentrações, induzem genes de defesa e respostas adaptativas, em altas concentrações podem dar início a morte celular. São consideradas moléculas sinalizadoras de estresse e também podem ser sinais intrínsecos regulatórios do crescimento e desenvolvimento da planta (VRANOVÁ et al., 2002).

As enzimas antioxidantes, que possuem a capacidade de remover, neutralizar ou limpar a célula das EAOs, são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona redutase (GR), a glutatona-S-transferase (GST), a guaiacol peroxidase (GPX) e a ascorbato peroxidase (APX), além de outras que participam das rotas metabólicas as quais estas pertencem. A SOD, associada ao tilacóide, converte o O_2^- , produzido pela reação do oxigênio molecular dos fotossistemas na reação de Meyer, em H_2O_2 . Este é convertido pela CAT, nos peroxissomos e pela APX, nos cloroplastos, em água (H_2O). As moléculas de O_2^- e H_2O_2 que não foram degradadas nos tilacóides, são degradadas no estroma pela SOD e APX. (SCANDALIOS, 1990;1993; FOYER et al., 1994; ALLEN, 1995; FADZILLAH et al., 1996; AZEVEDO et al., 1998; GRATÃO, 2003).

A SOD caracteriza um grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de H_2O_2 a partir de O_2^- , livrando as células da oxidação por esse radical, sendo considerada a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EAOs (BOWLER et al., 1992; ALSCHER et al., 2002). É classificada em três grupos, de acordo com o componente metálico de seu sítio ativo. O grupo cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), o grupo manganês (Mn-SOD) e o grupo ferro (Fe-SOD) (WINGSLE et al., 1991; SCANDALIOS, 1993; NIYOGI, 1999; MALLICK; MOHN, 2000).

Neste estudo foi observado o comportamento das células de fumo expostas às concentrações de 0 (controle), 0,075 e 0,750 mM de $NiCl_2$, nos períodos de 12, 36 e 72h em PAGE não-desnaturante. O ensaio enzimático em espectrofotômetro utilizado para a determinação da atividade total da SOD foi passível de erro elevado e a repetibilidade desejada não foi obtida, desta forma adotou-se apenas a análise em PAGE não-desnaturante.

A atividade da SOD não foi expressiva entre os três tratamentos, não apresentando um padrão claro que pudesse sugerir uma ação específica da enzima com relação aos tratamentos utilizados, seja para a distribuição das isoenzimas ou para a atividade total. Pode-se supor que outros mecanismos de defesa foram acionados para conter os danos provocados pelo metal quando em referência a geração do O_2^- .

Em milho, verificou-se que o Ni foi capaz de inibir a atividade da SOD durante a primeira hora de estresse, porém, nas raízes da mesma planta, não ocorreu alteração da atividade (BACCOUCH et al., 1998; 2001). Em guandu (*Cajanus cajan* L.) ocorreu um aumento da atividade da SOD, indicando que, provavelmente, a SOD é um importante intermediário no processo de desintoxicação do Ni (RAO et al., 2000). Em alisso, uma planta hiperacumuladora de Ni e Cd, foi observado que na espécie *Alyssum maritimum* L. a atividade de SOD aumentou na presença dos dois metais, no entanto, em *A. argentum* ocorreu diminuição desta atividade (SCHICKLER; CASPI, 1999).

Foram observadas duas isoformas de SOD, as quais foram classificadas como Mn-SOD e Fe-SOD, em todos os tratamentos. As isoformas da Mn-SOD são encontradas na matriz mitocondrial de células eucarióticas e em células procarióticas, embora, a Mn-SOD associada à membrana, tenha sido observada nos cloroplastos de algumas plantas. A Fe-SOD foi observada em algumas famílias de plantas e está associada principalmente aos cloroplastos (MALLICK; MOHN, 2000).

As isoformas de SOD apresentam semelhanças entre as espécies vegetais, porém, o número e o grupo destas são variáveis. A Mn-SOD tem sido encontrada em praticamente todas as espécies analisadas, incluindo espécies de distintos grupos vegetais. Na presença de Cd observou-se a Mn-SOD em soja e crotalária (FERREIRA et al., 2002; PEREIRA et al., 2002). A Fe-SOD é relativamente rara em plantas quando comparadas a Mn-SOD e Cu/Zn-SOD, sendo encontrada em arábida (*Arabidopsis thaliana* L.), com a função de catalisar a produção de H_2O_2 formado durante a β -oxidação de ácidos graxos e nos peroxissomos das folhas, durante a fotorrespiração, transformando o glicolato em glioxilato (HAVIR; McHALE, 1989; KLIEBENSTEIN et al., 1998).

Em milho e cana-de-açúcar foram observadas sete isoformas de SOD (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977; FORNAZIER et al., 2002a,b). Células em suspensão de café,

na presença de Ni, apresentaram nove isoformas (GOMES-JUNIOR et al., 2005). Na presença de Cd, células de fumo cv BY-2 apresentaram três isoformas quando expostas à concentração de 0,100 mM e duas isoformas, tanto para o controle quanto para 0,200 mM, indicando provavelmente uma resposta diferencial para o metal em distintas concentrações (GRATÃO, 2003).

A atividade da enzima SOD e a expressão dos genes que codificam as isoformas têm mostrado alterações sob diversas condições de estresse. Estas alterações dependem da espécie, da fase de desenvolvimento da planta, do tecido utilizado para a cultura *in vitro* e das particularidades das isoformas (WILLEKENS et al., 1995; AZEVEDO et al., 1998).

A CAT é uma enzima tetramérica, que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos, possuindo a capacidade de degradar o H_2O_2 . Foi proposto que a enzima desempenha papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbios (MALLICK; MOHN, 2000).

Existem três tipos de isoformas de CAT, a Cat1, a Cat2 e a Cat3. Em plantas, a Cat1 é responsável por 80% da atividade total desta enzima e está localizada no interior dos peroxissomos, sendo responsável pela transformação do H_2O_2 produzido na fotorrespiração em H_2O e O_2 . A Cat2 é encontrada nos tecidos vasculares, enquanto, a Cat3, está localizada no mesófilo das células (SCANDALIOS, 1990; 1993; WILLEKENS et al., 1995).

Neste estudo a atividade da CAT foi determinada pela atividade total em espectrofotômetro, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h e em PAGE não-desnaturante, nos períodos de 12, 36 e 72h. A atividade da enzima para a concentração de 0,075 mM atingiu maior valor às 48h de exposição ao metal, sendo que em 0,750 mM este valor foi atingido às 36h. Sendo a CAT diretamente regulada pelos níveis de H_2O_2 , sugere-se que ocorreu um aumento na produção do mesmo nestes períodos, ocasionado pela diminuição ou saturação da atividade de outros mecanismos de defesa. A produção de H_2O_2 pode ser ativada pela NADH-oxidase ou pelos níveis elevados de O_2^- (GROSS et al., 1977).

Às 72h de exposição ocorreu uma queda significativa da atividade enzimática para ambas as concentrações, o que sugere que outros mecanismos de defesa, até mesmo enzimáticos, estejam degradando o H_2O_2 .

Em plantas de milho, observou-se aumento da CAT depois de 40h de exposição ao Ni, sendo que as raízes apresentaram aumento às 24h. Em eucalipto (*Leucaena leucocephalla* L.) e feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) foi observado o aumento da atividade da CAT após 24 horas de exposição ao metal e em células em suspensão de café ocorreu aumento da atividade enzimática nas primeiras 12h e depois das 48h de exposição ao Ni (BACCOUCH et al., 1998; 2001; ROUT et al., 1999; SAMANTARY et al., 1999; GOMES-JUNIOR et al., 2005). Células de fumo cv BY-2 expostas ao Cd mostraram aumento da atividade da CAT nas últimas horas de exposição, o que pode estar associado a um aumento dos níveis de H_2O_2 , a diminuição da eficiência do ciclo glutaciona-ascorbato ou a depleção da glutaciona reduzida (GSH) para a síntese de fitoquelatinas (PCs) (GRATÃO, 2003).

Uma isoforma de CAT foi observada em PAGE não-desnaturante, assim com em células de café em suspensão, na presença de Ni e em células de fumo cv BY-2, em calos de cana-de-açúcar e em plântulas de soja, na presença de Cd (FERREIRA et al., 2002; FORNAZIER et al., 2002; GRATÃO; 2003; GOMES-JUNIOR et al., 2005). O fungo *Aspergillus nidulans* apresentou duas isoformas de CAT, a CAT A, codificada pelo gene *catA*, que apresenta sua transcrição induzida durante a esporulação e em resposta à estresses e a CAT B, codificada pelo gene *catB*, presente no micélio e que tem sua expressão induzida pelo H_2O_2 ou $H_2O_2^-$, não possuindo controle regulatório pós-transcricional. Estas enzimas constituem mecanismos de defesa antioxidativa alternativo e específico para os diferentes estágios do ciclo de vida do fungo (CALERA et al., 2000).

A GR possui importante papel na desintoxicação de metais pesados e xenobióticos e na proteção contra o estresse oxidativo, mantendo a razão entre os níveis de glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG) (GALLEGO et al., 1996a,b).

A GSH é essencial na resposta a estresses oxidativos como antioxidante e na síntese de fitoquelatinas (PCs), podendo controlar a quantidade de Ni e outros metais livres no citossol e promover a remoção do H_2O_2 e O_2^- . Para isto, a GSH deve estar na sua forma reduzida e essa oxirredução é catalisada pela GR (CREISSEN et al., 1994).

Neste estudo a atividade da GR foi determinada pela atividade total em espectrofotômetro, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h e em PAGE não-desnaturante, nos períodos de 12, 36 e 72h. Foi observado que na concentração de 0,750 mM a atividade da GR aumentou

durante as seis primeiras horas de exposição e para 0,075 mM, este aumento se estendeu até às 36h, porém com atividade menor. Este aumento da atividade da GR provavelmente ocorreu para manter elevado os níveis da GSH, permitindo que esta haja como antioxidante ou na síntese de PCs, formando complexos com o metal, reduzindo o teor de Ni livre na célula. Para confirmar qual das hipóteses está correta ou mesmo se ambas ocorrem simultaneamente, a quantificação de GSH torna-se necessária, pois uma concentração elevada de GSH não significa que PCs estejam sendo sintetizadas. Para confirmar a presença destas PCs é necessário que ocorra a identificação destas e de complexos GSH-Ni²⁺. O GSH pode estar atuando diretamente sobre o H₂O₂ como antioxidante (ALSCHER, 1989). Tais análises não foram realizadas neste experimento, mas são importantes para futuros projetos e melhor compreensão dos resultados aqui obtidos.

Certas espécies de plantas podem sintetizar PCs na presença de metais pesados (GRILL et al., 1985), sendo que apenas alguns metais podem formar complexos com PCs (Cd, Cu, Ni, Zn, Ag, Hg e Pb). Em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas à aplicação de Cd e Ni, verificou-se que o Cd induziu a síntese de PCs, diferentemente do Ni, onde não foi observada qualquer resposta (GUO; MARSCHNER, 1995).

O aumento da atividade da enzima GR, na presença de Ni, foi observado em plantas de guandu, em raízes de trigo (*Triticum aestivum* L.) juntamente com a síntese de PCs, em plantas do gênero *Alyssum* sp e em crotalária. Quando expostas ao Cd, observou-se um aumento da GR no fungo *Aspergillus* sp e em plantas de soja e de feijão (PANDOLFINI et al., 1996; SCHICKER; CASPI, 1999; RAO et al., 2000). Em células de fumo cv BY-2 expostas ao Cd, observou-se o aumento da atividade na concentração de 0,200 mM, este aumento ocorreu no início da exposição ao metal com depleção da GSSG. Esta resposta é comum ao Cd, com o consumo da glutatona para produção de PCs (GRATÃO, 2003).

Duas isoformas de GR foram observadas em PAGE não-desnaturante na concentração de 0,750 mM. Sugere-se que esta segunda isoforma seja específica com relação ao Ni. Em células em suspensão de café observou-se três isoformas quando na exposição ao Ni (GOMES-JUNIOR et al., 2005).

Existe uma correlação entre o sistema antioxidante e a atividade mitótica em células de fumo cv BY-2. O nível de ascorbato e de GR aumentam durante o segundo dia de crescimento da cultura, quando as células encontram-se em seu máximo índice mitótico. No mesmo período de

crescimento da célula, a expressão de dois genes, para a fase M (divisão nuclear) e S (duplicação do DNA nuclear), também aumenta. Sabe-se ainda que o ascorbato é requerido para a divisão celular e promove progressão do ciclo celular de células competentes (KERK; FELDMAN, 1995; KATO; ESAKA, 1999; PINTO et al., 2002).

As GSTs catalisam a adição da GSH para substratos hidrofóbicos eletrofilicos, sendo induzidas em resposta ao estresse oxidativo, removendo metais pesados, herbicidas e outros xenobióticos e é responsável pela principal via da eliminação de moléculas endógenas, como metabólitos secundários (FOYER et al., 1997; DIXON et al., 2002).

Neste estudo a atividade da GST foi determinada pela atividade total em espectrofotômetro, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 72 e 96h. Observou-se o aumento da atividade nas primeiras 24h de exposição para a concentração de 0,750 mM. Para a concentração de 0,075 mM verificou-se uma diminuição da atividade até as 6h seguida de aumento até 36h. Essa diminuição da atividade no início da exposição sugere que durante o período analisado a enzima GR tenha atuado suprindo o mecanismo de defesa. A elevada atividade das enzimas GST e GR nas primeiras horas de exposição ao metal na concentração maior, sugere que ocorreu um balanço na utilização da GSH por essas enzimas, que participam do ciclo ascorbato-glutationa.

Em células de fumo cv BY-2 expostas às concentrações de 0,100 e 0,200 mM de CdCl₂ foi observado o aumento da atividade da GST para ambas as concentrações, durante as primeiras horas de exposição. A concentração de 0,100 mM resultou em maior atividade provavelmente porque a GSH estava sendo utilizada pela GST. Para 0,200 mM, a GSH provavelmente estava envolvida na síntese de PCs (GRATÃO, 2003).

Como já mencionado, a GSH é um antioxidante importante na defesa contra EAOs. Quando é utilizada para sintetizar PCs, ocorre uma diminuição do seu nível, reduzindo a defesa, podendo por outro lado favorecer o aumento da peroxidação lipídica e diminuir a viabilidade celular. Plantas tolerantes a determinados metais possuem a capacidade de prevenir o uso excessivo da GSH antes da síntese de PCs, sendo que além desta síntese, a GSH é utilizada como substrato para as GSTs na redução do H₂O₂ (GRATÃO et al., 2005). Desta forma, os níveis de GSH são aumentados com a produção de H₂O₂, tanto em plantas como em cultura de células submetidas à situação de estresse (SMITH et al., 1985; GALLEGO et al., 1996a,b; JEMAL et al., 2000).

De forma geral, as peroxidases catalisam a oxidação do substrato concomitantemente à redução do H_2O_2 , "limpando" a célula e, além disso, participam de processos metabólicos essenciais, como a lignificação, a regulação do crescimento celular, a oxidação fenólica, a defesa contra patógenos e a proteção contra estresses (GRISEBACH, 1981; GOLDBERG et al., 1986; FIELDES; GERHARDT, 1998).

Neste estudo a atividade da GPX foi determinada pela atividade total em espectrofotômetro, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h. Nas células de fumo cv BY-2 expostas ao Ni observou-se um aumento da atividade da GPX somente às 72h, para o controle e os tratamentos. Neste mesmo período foi observada a diminuição da atividade das outras enzimas, CAT, GR, GST e APX. Este resultado pode estar relacionado com o aumento da disponibilidade do H_2O_2 no período final da exposição onde a ação da GPX estaria provocando uma diminuição dos níveis do H_2O_2 , ou seja, a GPX teria uma ação mais definida na resposta ao estresse na fase final.

Apesar da variação observada e de já ter sido relatado na literatura respostas claras da GPX para metais, como por exemplo o Cd em células de fumo cv BY-2 (GRATÃO, 2003), tal afirmativa apenas explicaria a concentração de 0,750 mM, pois até o controle apresentou atividade mais elevada do que vinha sendo observada ao longo do ciclo e da própria atividade observada na concentração mais baixa de Ni. Desta forma, o padrão da atividade enzimática da GPX não parece necessariamente estar correlacionado ao estresse causado pelo Ni, seja na fase inicial ou nesta mais tardia do ciclo de crescimento das células, visto não haver uma tendência clara que explique as variações observadas.

Como mencionado, o aumento da atividade da GPX nos períodos finais do tratamento pode ser observado em cevada (*Hordeum vulgare* L.), na presença de cobre (Cu) e manganês (Mn) e em células de fumo cv BY-2 na presença de Cd (GRATÃO, 2003; DEMIREVSKA-KEPOVA, et al., 2004). Em plantas de milho tratadas com Ni, em plantas de feijão expostas ao zinco (Zn), Cd e Ni e em raízes e caules de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) estressados com Cu, verificou-se o aumento da GPX e números variados de isoformas foram observados em PAGE não-desnaturante nas diversas concentrações utilizadas dos metais (VAN ASSCHE et al., 1986; MAZHOUDI et al., 1997; BACCOUCH et al., 1998).

O substrato redutor mais importante para a desintoxicação do H_2O_2 em células vegetais, é o ascorbato. A APX catalisa a reação em que duas moléculas de ascorbato são oxidadas para reduzir uma molécula de H_2O_2 em H_2O . A reciclagem do ascorbato é realizada pela monodehidroascorbato redutase (MDAR) e dehidroascorbato redutase (DAR) e que, juntamente com a GSH que é reciclada pela GR, constituem o ciclo ascorbato-glutationa (NOCTOR; FOYER, 1998).

Neste estudo a atividade da APX foi determinada pela atividade total em espectrofotômetro, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h. O padrão de atividade observado mostrou um aumento nas seis primeiras horas de exposição para a concentração de 0,750 mM e às 24h para 0,075mM. É possível verificar que as enzimas que tiveram um aumento da atividade nas primeiras horas de contato das células de fumo cv BY-2 com o Ni foram a GR, a GST e a APX, que participam do ciclo ascorbato-glutationa. Já nos períodos finais de exposição verificou-se uma elevada atuação das enzimas CAT e GPX.

O aumento da atividade da APX foi observado em células em suspensão de café, em raízes e plantas de milho e em plantas do gênero *Alyssum* sp expostas ao Ni, nas plantas de cevada e feijão expostas ao Cd e Cu, porém diminuiu para girassol (*Helianthus annuus* L.), *Pinus* sp e aveia (*Avena sativa* L.) expostas ao Cd (GALLEGO et al., 1996a,b; BACCOUCH et al., 1998; 2001; SCHICKLER; CASPI, 1999; HEGEDUS et al., 2001; SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001; GOMES-JUNIOR et al., 2005).

Neste estudo a quantificação das proteínas foi determinada em espectrofotômetro, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h e em SDS-PAGE, nos períodos de 12, 36 e 72h. O controle apresentou quantidade de proteína elevada com relação aos tratamentos. Nos períodos de 6h e 48h foram observados os maiores valores e às 12h e 72h, os menores. Para a concentração de 0,075 mM a quantidade de proteína foi maior do que a observada na concentração de 0,750 mM. Às 72h foi observado o menor valor para ambas as concentrações e para o controle.

Esta variação na quantidade de proteína provavelmente está relacionada com o estresse provocado pelo Ni, sendo que a redução da quantidade de proteína pode estar relacionada com a diminuição do metabolismo da célula, enquanto o aumento desta pode estar relacionado com a complexação com o metal e outros eventos metabólicos para indução de proteínas do

metabolismo celular mesmo que ao nível de SDS-PAGE e coloração com prata não tenham detectado alterações mais específicas e/ou significativas.

As células de fumo cv BY-2 expostas ao metal e o controle apresentaram, com exceção da GPX, diminuição significativa da atividade enzimática e da quantidade de proteína às 72h. Estas células possuem um ciclo de vida em cultura de sete dias, a coleta do material a ser analisado iniciou-se no terceiro dia, desta forma, às 72h de exposição das células representa o sexto dia de vida das mesmas. A diminuição da atividade enzimática e da quantidade de proteína pode estar relacionada com a proximidade da morte natural da célula.

A funcionalidade das proteínas pode ser afetada pelas EAOs através da oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos e/ou por reações secundárias com produtos aldeídicos da peroxidação lipídica. Em folhas de ervilha (*Pisum sativum* L.) foi observado que reações primárias e secundárias, resultantes do estresse, podem introduzir grupos carbonil em proteínas, modificando sua estrutura e conseqüentemente sua função (REINHECKEL et al., 1998; SCANDALIOS et al., 2000). A diminuição dos teores de proteína em situações de estresse foi observado no fungo *Aspergillus* sp na presença de 0,050 mM de Cd (GUELFY, 2002).

Kevresan et al. (2001) observaram em plantas de ervilhas, expostas a diferentes concentrações de Cd, Ni, chumbo (Pb) e molibdênio (Mo), redução da quantidade de proteína, sendo que esta variou conforme o metal. O metal considerado mais danoso foi o Cd, seguido do Pb, Ni e Mo. Entretanto, o metal que mais acumulou na planta foi o Pb, seguido do Cd, Ni e Mo.

A peroxidação da membrana celular pode afetar sua funcionalidade através da oxidação de aminoácidos, podendo resultar em danos irreversíveis às funções celulares. A indução de danos na membrana esta relacionada com a peroxidação lipídica provocada por radicais livres e H₂O₂ que acumulam-se nos tecidos das plantas onde a atividade das enzimas antioxidantes, como peroxidases, CAT e SOD, esteja suprimida (SCANDALIOS, 1994).

Neste estudo, danos nas membranas das células de fumo cv BY-2 foram estimados através da quantificação de espécies reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), que determina o malonaldeído (MDA), o maior produto da peroxidação lipídica (HEATH; PACKER, 1968; BUEGE; AUST, 1978), por espectrofotômetro, nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h.

Observou-se que até às 24h a concentração de MDA no controle foi elevada com relação aos tratamentos. Neste mesmo período a atividade das enzimas GR, GST e APX encontrava-se

elevada, sugerindo que não ocorreu a peroxidação da membrana porque estas degradaram as EAOs. A partir das 24h ocorreu uma elevação da concentração de MDA nas concentrações, que manteve-se superior ao controle até às 72h de exposição ao Ni. Nestes períodos, portanto, ocorreu a peroxidação da membrana. Nestes mesmos períodos as enzimas com elevada atividade foram a CAT e a GPX, que apresentaram ineficiência contra os danos oxidativos provocados pelo metal.

Apesar da ocorrência da peroxidação lipídica as células de fumo cv BY-2 continuaram a crescer, sendo que na concentração de 0,075 mM o crescimento foi semelhante ao demonstrado pelo controle e na concentração de 0,750 mM o crescimento diminuiu com relação ao controle, porém as células permaneceram em crescimento, sugerindo que o Ni tenha efeito fitotóxico secundário.

A peroxidação lipídica foi observada em células em suspensão de café expostas à 0,500 mM de Ni (GOMES-JUNIOR et al., 2005), em raízes de milho em 0,250 mM de Ni, em plantas de feijão expostas à diferentes concentrações de Cd e Zn e em plantas de soja com deficiência em cálcio (Ca) (CAKMAK; HORST, 1991; SOMASHEKARAIHAH et al., 1992; WECKX; CLIJSTERS, 1997; BACCOUCH et al., 2001). Em células de fumo cv BY-2 expostas às concentrações de 0,100 e 0,200 mM de Cd não observou-se a peroxidação, sugerindo que o sistema enzimático de defesa foi eficiente para estas concentrações e para o referido metal (GRATÃO, 2003).

3 CONCLUSÕES

1 - O mecanismo central envolvido na minimização dos danos causados pelo Ni varia com as concentrações e com os períodos de exposição das células de fumo cv BY-2;

2 - Do ponto de vista enzimático, foco principal desta dissertação, o estresse oxidativo gerado pelo Ni resultou em uma resposta inicial pelas enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (GR, GST e APX) para uma resposta tardia das enzimas CAT e GPX;

3 - O estresse causado pelo Ni aparentemente elevou as taxas de peroxidação lipídica provavelmente devido à ineficiência na etapa final do crescimento celular das enzimas CAT e GPX.

REFERÊNCIAS

ALCSHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ALLEN, R.D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 4, p. 1049-1054, 1995.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozymes profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 4, p. 1247-1257, 1995.

ANDREA, H.; FISCHIT, I.; BACH, T.J. Differential interaction of branch-specific inhibitors of isoprenoid biosynthesis with cell-cycle progression in tobacco BY-2 cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 110, p. 342-349, 2000.

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

ASADA, K. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 235-241, 1992.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Rockville, v. 50, p. 601-639, 1999.

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**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

BACCOUCH, S.; CHAOUI, E.L.; EL FERJANI, E. Nickel-induced oxidative damage antioxidant responses in *Zea mays* shoots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 36, n. 9, p. 689-694, 1998.

BACCOUCH, S.; CHAOUI, E.L.; EL FERJANI, E. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 7, p. 1085-1097, 2001.

BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relation as affected by heavy metal stress: a review. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 13, p. 1-37, 1990.

BEUCHAMP, C.; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase- Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 44, p. 276-282, 1971.

BOOMINATHAN, R.; DORAN, P.M. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. **New Phytology**, Rockville, v. 156, p. 205-215, 2002.

BOUSSAMA, N.; OUARITI, O.; GHORBAL, M.H. Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, p. 731-752, 1999a.

BOUSSAMA, N.; OUARITI, O.; SUZUKI, A.; GHORBAL, M.H. Cd-stress on nitrogen assimilation. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 155, p. 310-317, 1999b.

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

BOWLER, C.; VANCAMP, W.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide-dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Clare, v. 13, n. 3, p. 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**, New York, v. 72, p. 248-259, 1976.

BROWN, P.H.; WELCH, R.M.; CARY, E.E. Nickel: A micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 801-803, 1987.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, San Diego, v. 52, p. 302-310, 1978.

- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 83, p. 463-468, 1991.
- CALERA, J.A.; SANCHEZ-WEATHERBY, J.; LOPES-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 peroxidases: known and potential function. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.E.; GRISHAM, M.B. **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. v. 2, p. 25-50.
- CARDOSO, P.F.; GRATÃO, P.L.; GOMES-JUNIOR, R.A.; MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A. Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 267-272, 2005.
- CHAOUI, A.; GHORBAL, M.H.; EL FERJANI, E. Effects of cadmium-zinc interactions on hydroponically grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Clare, v. 126, p. 21-28, 1997a.
- CHAOUI, A. MAZHOUDI, S.; GHORBAL, M.H.; EL FERJANI, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidants enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Clare, v. 127, p. 139-147, 1997b.
- CHEN, J.J.; ZHOU, J.M.; GOLDSBROUGH, P.B. Characterization of phytochelatin synthase from tomato. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, n. 1, p. 165-172, 1997.
- CHEN, S.L.; KAO, C.H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 16/249, p. 252, 1995.
- CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.H. Effect of cadmium on activities of some enzymes of glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. **Biological Plantarum**, Praha, v. 42, p. 401-407, 1999.
- COBBETT, C.S. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 825-832, 2000.

CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; LEIDI, E.O.; HERNANDEZ, J.A.; SEVILLA, F.; DEL RIO, L.A. Subcellular-distribution of superoxide-dismutase in leaves of ureide-producing leguminous plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 82, n. 2, p. 285-291, 1991.

COX, R.M.; THURMAN, D.A.; BETT, M. Some properties of the soluble acid phosphatases of roots of zinc-tolerant and non-tolerant clones of *Anthoxanthum odoratum*. **New Phytology**, Rockville, v. 77, p. 547-552, 1976.

COWAN, C.K.; FOX, T.C.; GARVIN, D.F.; KOCHIAN, L.V. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 1063-1072, 1998.

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

CROOKE, W.M. Effect of soil reaction on uptake of nickel from a serpentine soil. **Soil Science**, Israel, v. 81, n. 4, p. 269-276, 1955.

CROOKE, W.M.; INKSON, R.H.E. Relation between nickel toxicity and major nutrient supply. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 49, n. 1, p. 1-15, 1956.

CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. The chemical behaviour of heavy metal plays a prominent role in the induction of oxidative stress. **Free Radical Research**, Londres, v. 31, p. S39-S43, 1999.

DE PINTO, M.; TOMMASI, F.; DE GARA, L. Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of tobacco BY-2. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 541-550, 2002.

DEMIREVSKA-KEPOVA, K.; SIMOVA-STOILOVA, L.; STOYANOVA, Z.; HOLZER, R.; FELLER, U. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 253-266, 2004.

DIXON, D.P.; LAPTHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, Londres, v. 3, p. 1-10, 2002.

DIXON, N.E.; GAZZOLA, C.; BLAKELY, R.L.; ZERNER, B. *Jack bean urease* (E.C.3.5.1.5.3.). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. **Journal of American Chemistry Society**, Washington D.C., v. 97, p. 4131-4133, 1975.

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

DUCIC, T.; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 113-112, 2005.

FADZILLAH, N.M.; GILL, V.; FINCH, R.P.; BURDON, R.H. Chilling oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. **Planta**, New York, v. 199, p. 552-556, 1996.

FERREIRA, R.R.; FORNAZIER, R.F.; VITORIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 2, p. 327-342, 2002.

FIELDES, 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**, Clare, v. 132, p. 89-99, 1998.

FORNAZIER, R.F.; FERREIRA, R.R.; VITÓRIA, A.P.; MOLINA, S.M.G.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. **Biologia Plantarum**, Netherlands, v. 45, n. 1, p. 91-97, 2002a.

FORNAZIER, R.F.; FERREIRA, R.R.; PEREIRA, G.J.G.; MOLINA, S.M.G.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 75, p. 125-131, 2002b.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 92, p. 696-717, 1994.

FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 241-254, 1997.

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

GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, Clare, v. 121, p. 151-159, 1996a.

GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Oxidative damage caused by cadmium choride in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Phyton-International Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 41-52, 1996b.

GALLI, U; SCHUEPP, H; BRUNOLD, C. Thiols in cadmium and copper-treated maize (*Zea mays* L.). **Planta**, New York, v. 198, p. 139-143, 1996.

GEELLEN, D.N.; INZÉ, D.G. A bright future for the bright yellow- 2 cell culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1375-1379, 2001.

GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKEY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **The Plant Journal**, Washington D.C., v. 13, p. 591-602, 1998.

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

GOLDBERG, R.; IMBEERTY, A.; LIBERMAN, M.; PRAT, R. Relationship between peroxidase activities and cell wall plasticity. In: GREEPIN, H.; PENEL, C.; GASPER JR, T. (Ed.). **Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases**. Switzerland: University of Geneva, 1986. p. 208–220.

GOMES-JUNIOR, R.A.; GRATÃO, P.L.; DELITE, F.S; POMPEU, G.B.; CARDOSO, P.F.; MOLDES, C.A.; MARQUEZI, M.C.; MAZZAFERA, P.; AZEVEDO, R.A. Análise da resposta antioxidante de células de café submetidas ao Ni. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 10; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE FISILOGIA VEGETAL, 12., 2005, Recife. Anais//Recife, SBFV, SLAFV, 2005. 1 CD-ROM.

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.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Sidney, v. 32, p. 481-494, 2005.

GRATÃO, P.L.; PRASSAD, M.N.V.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Phytoremediation: green technology for the clean up toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 53-64, 2005.

GRILL, E.; WINNACKER, E.L.; ZENK, M.H. Phytochelatins- the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. **Science**, Washington D.C., v. 230, n. 4726, p. 674-676, 1985.

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

GROSS, G.C.; JANSE, C.; ELSTNER, E.F. Involvement of malate, monophenols and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib). **Planta**, New York, v. 136, p. 271-276, 1977.

GUELFY, A. **Respostas das enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Aspergillus* sp. na presença do metal pesado cádmio**. 2002. 60p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GUO, Y.; MARSCHNER, H. Uptake, distribution, and binding of cadmium and nickel in different plant species. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 18, p. 2691-2706, 1995.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO₂. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, p. 952-957, 1989.

HAYAKAWA, T.; KANEMATSU, S.; ASADA, K. Occurrence of Cu, Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 25, p. 883-889, 1984.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch Biochemistry Biophysic**, New York, v. 125, p. 189-198, 1968.

HEGEDUS, A.; ERDEI, S.; HORVATH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Clare, v. 160, p. 1085-1093, 2001.

HERNÁNDEZ, J.A.; ESCOBAR, C.; CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P. M. Role of hydrogen peroxide and the redox state of ascorbate in the induction of antioxidant enzymes in pea leaves under excess light stress. **Functional Plant Biology**, Sidney, v. 31, p. 359-368, 2004.

HOUT, V.; ETIENNE, P.; PETITOT, A.S.; BARBIER, S.; BLEIN, J.P.; SUTY, L. Hydrogen peroxide induces cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1721-1730, 2001.

HOWDEN, R.; ANDERSEN, C.R.; GOLDSBROUGH, P.B.; COBBET, C.S. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 4, p. 1067-1073, 1995.

JEMAL, F.; ZARROUK, M.; GHORBAL, M.H. Effect of cadmium on lipid composition of pepper. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 28, p. 907-910, 2000.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC Press, 1984. 315 p.

KATO, H.A.; TARHAN, L. Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 321-329, 1999.

KERK, T.; FELDMAN, L.J. A biochemical-model for the initiation and maintenance of the quiescent center-implications for organization of root-meristems. **Development**, Oxford, v. 121, n. 9, p. 2825-2833, 1995.

KEVRESAN, S.; PETROVIC, N.; POPOVIC, M.; KANDRAC, J. Nitrogen and protein metabolism in young pea plants as affected by different concentrations of nickel, cadmium, lead and molybdenum. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 10, p. 1633-1644, 2001.

KLIEBENSTEIN, D.J.; MONDE, R.A.; LAST, R.L. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An acetic enzyme family with disparate regulation and protein localization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p. 637-650, 1998.

KLUCAS, R.V. Nickel, a micronutrient for hydrogen dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington D.C., v. 80, p. 2253-2257, 1983.

KNÖRZER, O.C.; DURNER, J.; BÖGER, J.P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, p. 388-396, 1996.

KRAUS, T.E.; McKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol induces tolerance on wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 145, p. 570-576, 1995.

KUBO, A.; SAJI, H.; TANAKA, K.; KONDO, N. Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 29, p. 479-489, 1995.

KÜPPER, H.; SETLIK, I.; SETLIKOVA, E.; FERIMAZOVA, N.; SPILLER, M.; KÜPPER F.C. Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of *in vivo* copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. **Functional Plant Biology**, Sidney, v. 30, p. 1187-1196, 2003.

LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; VANGRONSVELD, J.; MENCH, M. 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.

LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Clare, v. 159, p. 75-85, 2000.

LEE, S.M.; LEUSTEK, T. The effect of cadmium on sulphate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. **Plant Science**, Clare, v. 141, p. 201-207, 1999.

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 D.C., v. 56, p. 1530-1535, 1990.

L'HUILLIER, L.; D'AUZAC, J.; DURAND, M.; MICHAUD-FERRIERE, N. Nickel effects on two maize (*Zea mays*) cultivars: growth, structure, Ni concentration and localization. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, p. 1547-1554, 1996.

LOLKEMA, P.C.; DOORNHOF, M.; ERNEST, W.H.O. Interaction between a copper-tolerant and a sensitive population of *Silene cucubalus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 67, p. 654-658, 1986.

LOZANO-RODRIGUEZ, E.; HERNANDEZ, L.E.; BONAY, P.; CARPENA-RUIZ, R.O. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 306, p. 123-128, 1997.

McGRATH, S.P.; SMITH, S. Nickel. In: ALLOWAY; B.J. (Ed.). **Heavy metal in soils**. New York: John Wiley, 1990. p. 125-150.

MALAN, H.L.; FARRANT, J.M. Effects of the metal pollutants cadmium and nickel on soybean seed development. **Seed Science Research**, Oxon, v. 8, p. 445-453, 1998.

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 alga cells. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 157, p. 183-193, 2000.

MANNAZZU, I.; GUERRA, E.; FERRETI, R.; PEDICONI, D.; FATICHENTI, F. Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. **Biochimica et Biophysica Acta**, San Diego, v. 1475, p. 151-156, 2000.

MARQUES, T.C.L.L.S.M. **Crescimento e absorção mineral de mudas de espécies arbóreas em material de solo contaminado com metais pesados**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1996. 116 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, 1996.

MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferase in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Rockville, v. 47, p. 127-158, 1996.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic Press, 1995. v. 1, 889 p.

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.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M. E. **Comportamento de cobre, Cd, Cr, Ni e Zn adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH**. 1994. 197p. Tese (Livre-Docência)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

MAZHOUDI, S.; CHAOUI, A.; GHORBAL, M.H.; EL FERJAM, E. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato. **Plant Science**, Clare, v. 127, p. 129-137, 1997.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; SILVA, F.C.; BOARETTO, A.E. Uso de Resíduos Sólidos Urbanos na Agricultura e Impactos Ambientais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, 1997. Anais. Rio de Janeiro: S. Ed., 1997. 28p.

MENCH, M.; MARTIN, E.; SOLTA, P. After effects of metals derived from a highly metal-polluted sludge on maize (*Zea mays* L.). **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 75, p. 277-291, 1994.

MINORSKY, P.V. The hot and the classic. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 14-15, 2003.

MISHRA, D.; KAR, M. Nickel in plant growth and metabolism. **The Botanical Review**, v. 40, n. 4, p. 395-449, 1974.

MITTLER, R.; HERR, E.H.; ORVAR, B.L.; VAN CAMP, W.; WILLENKENS, H.; INZÉ, D.; ELLIS, B.E. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington D.C., v. 96, p. 14165-14170, 1999.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product the monodehydroascorbate radicals in thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 33, p. 541-553, 1992.

MORGUTTI, S.; SACCHI, G.A.; COCUCCI, S.M. Effects of Ni²⁺ on proton extrusion, dark CO₂ fixation and malate synthesis in maize roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 60, n. 1, p. 70-74, 1984.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473, 1962.

NAGATA, T.; NEMOTOT, Y.; HASEZAWA, S. Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 132, p. 1-30, 1992.

NAKAGAWA, N.; SAKURAI, N. Increase in the amount of cell A protein tobacco BY-2 cells by a cellulose biosynthesis inhibitor, 2-6 dichlorobenzonitrile. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 39, p. 779-785, 1998.

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

NAKAZAWA, R.; KAMEDA, Y.; ITO, T.; OGITA, Y.; MICHIHATA, R.; TAKENAGA, H. Selection and characterization of nickel-tolerant tobacco cells. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 48, n. 4, p. 497-502, 2004.

NIYOGI, K.K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Rockville, v. 50, p. 333-359, 1999.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Rockville, v. 49, p. 249-279, 1998.

PAIVA, H.N.; CARVALHO, J.G.; SIQUEIRA, J.O. Teor de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) submetidas a doses crescentes de níquel, em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 15-25, 2002.

PALACIOS, G.; MATAIX, J. The influence of organic amendment and nickel pollution on tomato fruit yield and quality. **Journal of Environmental Science and Health part b-pesticides food contaminants and Agricultural Wastes**, New York, v. 34, p. 133-150, 1999.

PALACIOS, G.; GOMEZ, I.; CARBONELL-BARRACHINA, A.; PEDRENO, J.N.; MATAIX, J. Effect of nickel concentration on tomato plant nutrition and dry matter yield. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 10, p. 2179-2191, 1998.

PAN, S.; YAU, Y. The isozymes of superoxide dismutase in rice. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Sinica, v. 32, p. 253-258, 1991.

PANDA, S.K.; CHOUDHURY, S. Chromium stress in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 95-102, 2005.

PANDA, S.K.; CHOUDHURY, I.; KHAN, M.H. Excess heavy metal toxicity induces lipid peroxidation and affects antioxidants in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Biologia Plantarum**, Praha, v.46, p.289-294, 2003.

PANDOLFIN, T.; GABBRIELLI, R.; CISCATO, N. Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, n. 12, p. 1611-1627, 1996.

PAVAN, M.A.; BINGHAM, F.T. Toxidez de metais pesados em plantas: II. Caracterização da toxidez de níquel em cafeeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 323-328, 1982.

PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L.; GOMEZ, E.; TIEMANN, K.J.; PARSONS, J.G.; CARRILO, G. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. **Environmental Pollution**, New York, v. 119, p. 291-301, 2004.

PEREIRA, G.J.G.; MOLINA, S.M.G.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 239, n. 1, p. 123-132, 2002.

POLACCO, J.C. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 827-830, 1977.

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

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.

RAO, K.V.M.; SRESTY, T.V.S. Antioxidative parameters in seedling of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) Millspaugh to Zn and Ni stress. **Plant Science**, Clare, v. 157, n. 1, p. 113-128, 2000.

RAUSER, W.E. Phytochelatins and related peptides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 1141-1149, 1995.

REINHECKEL, T.; NOACK, H.; LORENZ, S.; WISWEDEL, I.; AUGUSTIN, W. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. **Free Radical Research**, Londres, v. 29, n. 4, p. 297-305, 1998.

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. Techniques in free radical research. In: BURDON, R.H.; VAN KNIPPENBERG, P.H. (Eds.) **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. Amsterdam; London; New York; Tokio: Elsevier, 1991. v. 22, 291 p.

ROUT, G.R.; SAMANTARY, S.; DAS, P. Chromium, nickel and zinc tolerance in *Leucaena leucocephala* (K8). **Silvae Genetica**, Paris, v. 48, p. 151-157, 1999.

RUIZ, W.F.R. **Atividades de superóxido dismutase, catalase e peroxidase durante o desenvolvimento de micorrizas arbusculares em feijoeiro, sob condições de baixo e alto nível de fósforo**. 1998. 50p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

SAKAKI, T. Photochemical oxidants: Toxicity. In: DE KOK, L.J.; STULEN, I. (Ed). **Responses of plant metabolism to air pollution and global change**. Netherlands: Backhuys Publishers, 1998. p. 117-129.

SALT, D.E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N.P.B.A.; DUSENKOV, V.; ENSLEY, B.D.; CHET, I.; RASKIN, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in *Indian mustard*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 1427-1433, 1995.

SAMANTARY, S.; ROUT, G.R.; DAS, P. Chromium and nickel tolerance of *Trema orientalis* (Blume) L. in tissue culture. **Acta Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 27-35, 1999.

SANTOSH, T.R.; SREEKALA, M.; LALITHA, K. Oxidative stress during selenium deficiency in seedlings of *Trigonella foenum-graecum* and mitigation by mimosine-Part II. Glutathione metabolism. **Biological Trace Element Research**, Oxford, v. 70, p. 209-222, 1999.

SCANDALIOS, J.G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 28, p. 1-41, 1990.

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

SCANDALIOS, J.G.; ACEVEDO, A.; RUZSA, S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, Clare, v. 156, p. 103-110, 2000.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 39-44, 1999.

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

SEHMER, L.; DIZENGREMEL, P. Contribution to subcellular localization of superoxide dismutase isoforms of spruce needles and oak leaves. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 53, n. 5/6, p. 545-551, 1998.

SMITH, I.K.; KENDALL, A.C. KEYS, A.J.; TURNER, J.C.; LEA, P.J. The regulation of biosynthesis of glutathione in leaves of barley. **Plant Science**, Clare, v. 41, p. 11-17, 1985.

SMITH, I.K.; VIERHELLER, T.L.; THORNE, C.A. Assay of glutathione reductase include tissue-homogenates, using 5.5' *Dithiobis* (2-nitrobenzoic acid). **Annual Biochemistry**, San Diego, v. 125, p. 27-58, 1988.

SOMASHEKARAIHAH, B.V.; PADMAJA, K.; PRASAD, A.R.K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*) involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 85-89, 1992.

STROINSKI, A.; KUBIS, J.; ZIELEZINSKA, M. Effect of cadmium on glutathione reductase in potato tubers. **Acta Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 21, p. 201-207, 1999.

TSUJI, N.; HIRAYANAGI, N.; IWABE, O.; TAKASHI, N.; TAGAWA, M.; MIYAMOTO, S.; MIYASAKA, H.; MIYAMOTO, K. Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marina green alga, *Dunaliella tertiolecta*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, p. 433-459, 2003.

TUNA, A.L.; BÜRÜN, B.; YOKAS, I.; ÇOBAN, E. The effects of heavy metal on pollen germination and tube length in the tobacco plant. **Turk Journal Biological**, Turquia, v. 26, p. 109-113, 2002.

TURNER, R.G.; MARSHALL, C. The accumulation of zinc by subcellular fractions of roots of *Agrostis tenuis* Sibth. In relation to zinc tolerance. **New Phytology**, Rockville, v. 71, p. 671-676, 1972.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Pólo computacional - Departamento de ciências exatas. **Programa ESTAT**. Sistemas para análises estatísticas (softwares). Jaboticabal: FCAV - UNESP.

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

VAN ASSCHE, F.; PUT, C.; CLIJSTERS, H.M.M. Heavy metals induce specific isoenzyme patterns of peroxidase in *Phaseolus vulgaris* L. **Physiology Biochemistry**, New York, 1986. v. 94, 60p.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant Cell Environmental**, Oxon, v. 13, p. 195-206, 1990.

VITORELLO, V.A.; HAUG, A. Short-term aluminum uptake by tobacco cells: Growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, p. 536-544, 1996.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminium toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 129-143, 2005.

VITORIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 701-710, 2001.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 2ed. New York; Chichester; Brisbane; Toronto; Singapore: Wiley, 1995. 1361 p.

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.

WALKER, C. D. Effects of nickel deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 79, n. 2, p. 474-479, 1985.

WECKX, J.E.J.; CLIJSTERS, H.M.M. Phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 35, n. 5, p. 405-410, 1997.

WILLEKENS, H.; INZE, D.; VANMONTAGU, M.; VANCAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, San Diego, v. 1, p. 207-228, 1995.

WINGSLE, G.; GARDESTRÖM, P.; HALLGREN, J.; KARPINSKI, S. Isolation, purification, and subcellular localization of isozymes of superoxide dismutase from scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, p. 21-28, 1991.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S.R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Oxidative stress triggered by aluminium in plant roots. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 255, p. 239-243, 2003.

YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, K.; RIKIISHI, S.; HACHIYA, A.; YAMAGUCHI, Y.; MATSUMOTO, H. Aluminum tolerance acquired during phosphate starvation in cultured tobacco cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 217-227, 1996.

YANG, S.H. Plant tolerance to nickel toxicity: II. Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, n. 2, p. 265-279, 1996.

YANG, S.H.; BERBERICH, T.; SANO, H.; KUSANO, T. Specific association of transcripts of tbz F and tbz 17, tobacco genes encoding basic region leucine-zipper type transcriptional activators, with guard cells of senescing leaves and/or flowers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 23-32, 2001.

ZHU, Y.L.; PILON-SMITS, E.A.H.; JOUANIN, L.; TERRY, N. Over expression of glutathione synthetase in *Indian mustard* enhances cadmium accumulation and tolerance oxygen. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 73-79, 1999.