

FLÁVIA ANTUNES

ATIVIDADE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO ESTRESSE OXIDATIVO  
EM FRAÇÕES SUBCELULARES DE PLANTAS  
SUBMETIDAS À BAIXA TEMPERATURA

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia Vegetal, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2002

FLÁVIA ANTUNES

ATIVIDADE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO ESTRESSE OXIDATIVO  
EM FRAÇÕES SUBCELULARES DE PLANTAS  
SUBMETIDAS À BAIXA TEMPERATURA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 27 de março de 2002

---

Prof. Paulo Roberto Mosquim  
(Conselheiro)

---

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

---

Prof. Juraci Alves de Oliveira

---

Prof. Paulo Henrique Pereira Peixoto

---

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva  
(Orientador)

Aos meus pais Ivan e Leda,  
que são minha inspiração e orgulho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do Curso. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão das bolsas de estudo.

Ao professor Marco Aurélio Pedron e Silva, pela preciosa orientação, amizade e atenção dedicadas a mim, permitindo o bom desempenho deste trabalho.

Aos professores Carlos Alberto Martinez Y Huaman e Paulo Roberto Mosquim, pela valiosa co-orientação, por todas as críticas e sugestões feitas a este trabalho e pelo carinho.

Ao professor Paulo Henrique Pereira Peixoto, pela amizade, pelo carinho e incentivo desde a graduação.

Aos professores Fábio Da Matta, Juraci Alves de Oliveira, Marcelo Ehlers Loureiro e Raimundo Santos Barros, pela amizade, pelo agradável convívio e pelos ensinamentos.

A Antônio Cordeiro e Mercês, pelo agradável convívio diário, pelos ensinamentos e por toda atenção dedicada a mim.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, em especial a Carlos Raimundo, Geraldo, Beth, Glória e Cássia, pelo apoio técnico e pela amizade.

A Ather, Danilo e José Manoel, pela dedicação, por todos os dias de trabalho, pelo bom humor e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório, em especial a Agnaldo, Alberto, Hugo, Marilice, Wagner e Werner, por toda ajuda e por tornarem os meus dias mais agradáveis.

A Deus, pela minha existência repleta de conquistas.

Aos meus pais, Ivan e Leda, as minhas irmãs, Fabiana e Fabrina, aos meus sobrinhos, Ettore e Sophia, e a todos os meus familiares, pelo amor incondicional e incentivo à realização de mais uma etapa.

Às amigas Lucimara, Paula e Silvane, que sempre me ampararam e tornaram minha estadia em Viçosa muito mais alegre.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

FLÁVIA ANTUNES, filha de Ivan Antunes e Leda Maria Leoni Antunes, nasceu no dia 29 de abril de 1976, em Ribeirão Preto, São Paulo.

Em fevereiro de 2000, graduou-se em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora e, no mesmo mês, iniciou o Programa de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa.

## CONTEÚDO

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1. Obtenção do material vegetal e tratamentos.....	6
2.2. Isolamento de mitocôndrias.....	7
2.3. Constituição das frações subcelulares e obtenção dos extratos enzimáticos.....	10
2.4. Teor protéico.....	11
2.5. Atividade enzimática.....	11
2.6. Delineamento experimental e análise estatística.....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADP	- Adenosina-5'-difosfato
AOX	- Oxidase alternativa
APX	- Ascorbato peroxidase
ATP	- Adenosina-5'-trifosfato
B	- Extrato bruto
BSA	- Albumina de soro bovino
CAT	- Catalase
Cu/Zn-SOD	- Superóxido dismutase cobre/zinco
DNA	- Ácido desoxi-ribonucleotídico
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGTA	- Ácido etileno glicol-bis-(β-aminoetil éter)-NN-tetra acético
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
Fe-SOD	- Superóxido dismutase ferro
HEPES	- Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico
Mit	- Mitocôndrias purificadas
ML	- Mitocôndrias lavadas
Mn-SOD	- Superóxido dismutase manganês
mRNA	- Ácido ribonucleotídico mensageiro
NAD <sup>+</sup> -IDH	- Isocitrato desidrogenase
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NBT	- Azul de para-nitro-tetrazólio



POX	- Peroxidase
Pro	- Proplastídeos
PROT	- Proteína
PUMP	- Proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas
Px	- Peroxissomas
S	- Fração solúvel
SOD	- Superóxido dismutase

## RESUMO

ANTUNES, Flávia, M. S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2002. **Atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo em frações subcelulares de plantas submetidas à baixa temperatura.** Orientador: Marco Aurélio Pedron e Silva. Conselheiros: Carlos Martinez Y Huaman e Paulo Roberto Mosquim.

Neste trabalho, investigaram-se os efeitos da baixa temperatura sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e catalase (CAT), em mitocôndrias captadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  (isoladas de hipocótilos de soja e coleótilos de milho) em comparação com mitocôndrias incapazes de captar  $\text{Ca}^{2+}$  (isoladas de tubérculos de batata e raízes de beterraba). Adicionalmente, compararam-se as atividades dessas enzimas mitocondriais com suas isoenzimas presentes em outras frações celulares. Os tubérculos de batata e as raízes de beterraba foram mantidos à temperatura ambiente (controle) e a 5°C por dez dias. Para as plântulas de soja e milho, o tratamento controle correspondeu à sua manutenção à temperatura de 28°C, durante quatro dias após o plantio. O tratamento com frio consistiu em manter outro grupo de plântulas por mais dois dias, transferindo-as para temperatura de 5°C. A atividade da SOD, nas diversas espécies, foi maior na fração solúvel do que nas organelas isoladas. Na fração solúvel, a atividade da SOD foi reduzida pela baixa temperatura, apenas em beterraba, milho e soja, não apresentando diferença significativa em batata. Não foi detectada atividade de SOD nos peroxissomas na maioria das espécies estudadas, à exceção da beterraba. O frio não alterou a atividade da POX nas mitocôndrias e

nos proplastídeos de todas as espécies estudadas, porém houve redução na atividade dessa enzima em peroxissomas de batata e beterraba. O frio reduziu a atividade da CAT em mitocôndrias de batata e aumentou em soja, sem alterações significativas nas outras espécies. Nos tratamentos com baixa temperatura, não houve alterações significativas na atividade da CAT em proplastídeos. Em peroxissomas, houve redução em beterraba e milho. Esses resultados não permitem estabelecer um padrão de comportamento das enzimas estudadas em resposta ao frio, nem estabelecer uma relação direta entre a capacidade mitocondrial de captação de cálcio e a atividade das enzimas avaliadas.

## ABSTRACT

ANTUNES, Flávia, M. S. Universidade Federal de Viçosa, March 2002. **Enzyme activities as related to oxidative stress in subcellular fractions of plants under low temperature.** Adviser: Marco Aurélio Pedron e Silva. Committee Members: Carlos Martinez Y Huaman and Paulo Roberto Mosquim.

The effects of low temperatures on the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX) and catalase (CAT) were investigated in mitochondria capable of capturing  $\text{Ca}^{2+}$  (isolated from soybean hypocotyls and corn coleoptiles) as compared with non-capturing  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondria (from potato tubers and beet roots). Activities of the enzymes were also studied in other fractions such as soluble fraction, peroxisomes and proplastids. Potato tubers and beet roots were stored at room temperature (control) or under 5 °C during ten days. Soybean and corn seedlings were kept at 28 °C during four days after sowing, followed by more two days at 28 °C (control) or 5 °C. In general, SOD activity was higher in soluble fraction than in the fractions containing isolated organelles. SOD activity was diminished by low temperature in beet, corn and soybean, but not in potato. Except for beet, SOD activity in peroxisomes of the species studied was not detected. Chilling treatments did not change POX activity in mitochondria and proplastids fractions in the species studied, but activity of this enzyme was decreased in potato and beet peroxisome fractions. CAT activity was reduced by cold in mitochondria fractions from potato, but was enhanced in soybean, while in the other species no change was detected. As for proplastids, low temperature treatments did not affect CAT activity. Cold decreased

CAT activity only in peroxisomes from beet roots and corn coleoptiles. No general pattern for the behavior of the enzymes studied could be established by taking into account the chilling treatments and the groups of plants with and without mitochondria ability to capturing  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 1- INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas de grande importância nas células eucariotas, pois são as responsáveis pela fosforilação oxidativa, acoplada ao transporte de elétrons efetuado pela cadeia respiratória. Na matriz mitocondrial, ocorrem várias desidrogenases, responsáveis pelo ciclo do ácido cítrico, no qual os diversos intermediários metabólicos são oxidados, o que resulta no fornecimento de elétrons que iniciam o funcionamento da cadeia respiratória.

Diversos fatores controlam o funcionamento mitocondrial, destacando-se a disponibilidade de substratos e de intermediários metabólicos, os níveis de ADP e ATP, além das alterações na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (RUTTER et al., 1998; POZZAN e RIZZUTO, 2000).

A maioria dos trabalhos que correlacionam o envolvimento do  $\text{Ca}^{2+}$  em processos metabólicos referem-se às mudanças na concentração deste íon no citosol, onde o  $\text{Ca}^{2+}$  é considerado um mensageiro secundário (CARAFOLI, 1988; RASMUSSEN et al., 1990; GILROY et al., 1991; d'AUZAC, 1994). Para que sua atuação nos mecanismos de transdução de sinais seja efetiva, sua concentração basal no citosol deve ser mantida em níveis baixos, em torno de 10 a 200 nM (BUSH, 1993; TREWAVAS, 1999).

O maior reservatório de cálcio nas células vegetais é o vacúolo, porém esse íon também pode ser acumulado nos cloroplastos, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (TREWAVAS, 1999). Os mecanismos que permitem o controle das concentrações citosólicas de cálcio são diversos. Por exemplo, na membrana plasmática, existem bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  que o excretam para o meio extracelular

(ALBERTS et al., 1994). Transportadores com a mesma função também ocorrem nas membranas dos vacúolos e do retículo endoplasmático, cuja atuação promove o acúmulo de cálcio no interior dessas organelas (BUSH, 1993). O pouco cálcio presente no citosol não se encontra completamente livre, uma vez que existem proteínas como as calmodulinas, que se ligam fortemente ao  $\text{Ca}^{2+}$ , participando, assim, do controle de sua concentração na célula (GILROY et al., 1987; BUSH, 1993).

Estudos têm mostrado que a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias vegetais depende da espécie, do tecido e da idade do mesmo. Por exemplo: mitocôndrias isoladas de coleótilos de milho e de hipocótilos de soja são capazes de acumular  $\text{Ca}^{2+}$ , de modo análogo às mitocôndrias animais, porém, nesses casos, o transporte está acoplado ao de íons fosfato (MARTINS e VERCESI, 1985; CARNIERI, 1986; SILVA et al., 1992). Por outro lado, mitocôndrias isoladas de folhas de repolho, tubérculos de batata e raízes de beterraba são incapazes de transportar e acumular cálcio em seus interiores (MARTINS e VERCESI, 1985; SILVA, 1991).

Uma das possíveis funções do  $\text{Ca}^{2+}$  é a regulação da atividade das enzimas desidrogenativas presentes na matriz mitocondrial, conforme observado em células animais. Três enzimas do ciclo de Krebs são ativadas pelo cálcio, a piruvato desidrogenase, a isocitrato desidrogenase e a 2-oxoglutarato desidrogenase (HANSFORD, 1991; RUTTER et al., 1998). Em células de vegetais, o controle da atividade dessas enzimas pelo cálcio não está esclarecido. Em um estudo com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata e de raízes e hipocótilos de soja, BORGES (1999), ao avaliar a possível relação entre o acúmulo de cálcio e a atividade da isocitrato desidrogenase ( $\text{NAD}^+$ -IDH), observou que não houve um controle diferencial do cálcio sobre a atividade desta enzima. Analizando o gráfico de MICHAELIS-MENTEN, para a oxidação do isocitrato catalisada pela enzima  $\text{NAD}^+$ -IDH, extraída tanto de mitocôndrias de tubérculos de batata como de raízes e hipocótilos de soja, BORGES (1999) não observou diferenças significativas nos valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ . Porém, outros cátions divalentes como o manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ) e o magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) estimularam a atividade da isocitrato desidrogenase dessas mesmas espécies.

Os íons cálcio também podem estar relacionados com o estresse oxidativo e com o sistema antioxidante em plantas. GONG et al. (1997) observaram maiores atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) em plântulas de milho, cujas sementes foram pré-tratadas com solução de  $\text{CaCl}_2$ , quando comparadas com plântulas cujas sementes não receberam o respectivo pré-tratamento. A excessiva captação e acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  pode levar ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias e, possivelmente, alterar a atividade de enzimas antioxidantes (KOWALTOWSKI et al., 1996; VERCESI et al., 1997; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999).

Diversos tipos de estresses podem estar relacionados com o aumento da produção de radicais livres altamente tóxicos nas células. No estresse oxidativo, várias enzimas estão envolvidas nos mecanismos de proteção do protoplasma e da integridade celular. Esta defesa inclui enzimas antioxidantes capazes de remover ou neutralizar os radicais livres e compostos intermediários, que possibilitam a sua produção. Dentre essas enzimas, destacam-se a peroxidase (POX), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (SCANDALIOS, 1993).

Os mecanismos de eliminação de radicais ativos de oxigênio envolvem a SOD, cuja síntese é induzida, provavelmente, pelo aumento de produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). No processo, a SOD converte  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e, então, a peroxidase e a catalase removem o peróxido formado (SIEGEL, 1993). O peróxido de hidrogênio e os radicais superóxidos livres podem exercer efeitos deletérios nas células, atuando na peroxidação de lipídeos das membranas, como também danificando seu DNA (CAKMAK e HORST, 1991), e, ainda, em presença de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , reagir para formar radicais hidroxilas, os quais são compostos altamente reativos (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). A catalase, que converte  $2\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , é considerada a principal enzima removedora de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , em plantas, o que pode também oxidar substratos como metanol, etanol e formaldeído (BREUSEGEM et al., 2001). As peroxidases compreendem diversas isoenzimas que diferem na especificidade pelo substrato, composição aminoacídica e localização nos tecidos da planta (SIEGEL, 1993). As POXs eliminam o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , transformando-o em  $\text{H}_2\text{O}$  na presença de um substrato. Uma das principais funções das peroxidases é a proteção celular contra reações oxidativas.



Essas enzimas envolvidas no estresse oxidativo podem estar localizadas tanto no citosol como nas mitocôndrias, nos peroxissomas e nos cloroplastos (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977; Del RIO et al., 1983; DOULIS et al., 1997; Del RIO et al., 1998; JIMÉNEZ et al., 1998). As mitocôndrias são consideradas um dos maiores sítios de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Durante o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, a redução do O<sub>2</sub> em água ocorre em etapas que podem resultar na produção de radicais superóxidos, provavelmente produzidos no complexo desidrogenase do NADH e no complexo III (PURVIS, 1997; VERCESI et al., 1997; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999; KOWALTOWSKI, 2000; MØLLER, 2001). Em condições normais, a desintoxicação dessas espécies reativas de oxigênio é feita por um eficiente sistema mitocondrial de antioxidantes (KOWALTOWSKI, 2000; BREUSEGEM et al., 2001). Porém, sob condições de estresse, pode ocorrer o aumento na produção de EROs, o que leva a danos mitocondriais e celulares.

O frio é um dos fatores que levam ao estresse oxidativo. PINHEIRO (2000), analisando a atividade das SOD, CAT e APX, em mitocôndrias de tubérculos de batata, sob condições de estresse por frio, observou aumentos nas atividades da CAT e da APX, que foram diretamente proporcionais ao tempo de incubação à baixa temperatura. Contudo, a atividade da SOD foi reduzida sob estas mesmas condições. FADZILLAH et al. (1996), avaliando os efeitos do frio sobre a cultura de brotos de arroz, observaram um aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos expostos ao frio. Porém, houve um decréscimo na atividade da catalase nestes tecidos, quando comparados ao controle. Os efeitos da baixa temperatura, em mitocôndrias isoladas de milho, foram avaliados por De SANTIS et al. (1999). Eles mostraram que, em plântulas mantidas na temperatura limite de crescimento (14°C), houve um aumento na atividade da POX mitocondrial, quando comparadas às plântulas crescidas a 25°C.

Diferentes respostas das isoenzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo, diante dos diversos estresses ambientais, são encontradas na literatura, o que sugere comportamento diferencial entre essas isoenzimas antioxidantes (TSANG et al., 1991; BOWLER et al., 1992; PROCHAZKOVA et al., 2001). Pouco se conhece

sobre as respostas das isoformas aos diferentes estresses, sendo necessários mais estudos (LEE e LEE, 2000).

Diante da possibilidade dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  atuarem no controle da atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, foi avaliada, neste trabalho, a possível relação entre o acúmulo desses íons e a atividade das enzimas SOD, POX e CAT, em frações subcelulares de tubérculos de batata, raízes de beterraba, hipocótilos de soja e coleótilos de milho, submetidos à baixa temperatura. Adicionalmente, compararam-se as atividades dessas enzimas mitocondriais com suas isoenzimas presentes em outras frações celulares.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção do material vegetal e tratamentos

Utilizaram-se, neste experimento, tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L., cv. Binje), obtidos em mercado local, e raízes de beterraba (*Beta vulgaris* L.), obtidas na Horta Nova da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], variedade UFV 16 e as sementes de milho (*Zea mays* L.), variedade AG122, foram fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da UFV e mantidas em câmara refrigerada a 5°C até a sua utilização.

Para obtenção de hipocótilos de soja, as sementes foram lavadas em água corrente, imersas em hipoclorito de sódio 0,5% (v/v), por 15 min e, posteriormente, lavadas cinco vezes em água destilada. Para obter os coleótilos de milho, lavaram-se, também, as sementes em água corrente, a quais foram imersas em hipoclorito de sódio 0,5% (v/v), por 60 min, lavadas cinco vezes em água destilada e, posteriormente, embebidas em água destilada por 120 min. Após lavagem, as sementes foram colocadas para germinar dentro de caixas plásticas, contendo areia umedecida e previamente tratada com hipoclorito de sódio 0,5% (v/v), mantidas no escuro, a 28°C. Quatro dias após terem sido colocadas para germinar, as plântulas encontravam-se estioladas, prontas para a retirada dos hipocótilos e dos coleótilos, que foram utilizados para extração das mitocôndrias.

Mantiveram-se os tubérculos de batata e as raízes de beterraba à temperatura ambiente (controle) e a 5°C por dez dias. Para as plântulas de soja e de milho, o tratamento controle correspondeu aos quatro dias após as sementes terem

sido colocadas para germinar à temperatura de 28°C. O tratamento com frio consistiu em manter um grupo de plântulas por mais dois dias à temperatura de 5°C.

## **2.2. Isolamento de mitocôndrias**

Para obtenção de mitocôndrias parcialmente purificadas (mitocôndrias lavadas), foi feita centrifugação diferencial, conforme descrito por DIOLEZ e MOREAU (1983), com as modificações descritas por PINHEIRO (2000).

Os tubérculos de batata, as raízes de beterraba e os hipocótilos de soja foram homogeneizados em 600 mL de tampão de extração gelado, composto por manitol 400 mM, albumina de soro bovino (BSA) 0,1% (p/v), cisteína 3 mM, ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico (HEPES) 10 mM e ácido etileno glicol-bis-( $\beta$ -aminoetil éter)-NN-tetra acético (EGTA) 1 mM, em pH 7,6, e os coleótilos de milho, homogeneizados em 900 mL do mesmo tampão. Cortaram-se, finamente, os hipocótilos de soja (aproximadamente 200g) com um estilete, os quais foram homogeneizados, utilizando-se um Polytron, durante 5 segundos, no nível cinco de intensidade. Para coleótilos de milho, totalizando, aproximadamente, 400g, a homogeneização foi feita em liquidificador doméstico por um período aproximado de 1 min, na velocidade máxima. Para a homogeneização dos tubérculos de batata e das raízes de beterraba, 600g de cada material, aproximadamente, foram fatiados e centrifugados em uma centrífuga doméstica, extratora de sucos, utilizando-se o mesmo tampão de extração descrito anteriormente.

Filtraram-se os extratos obtidos das homogeneizações, através de oito camadas de gaze e uma de seda, sendo o pH ajustado para 7,2. Em seguida, centrifugados a 700 g por 5 min. Os sobrenadantes foram centrifugados a 1.200 g durante 10 min, resultando em novos sobrenadantes, sendo estes centrifugados a 9.000 g por 10 min. Os precipitados foram ressuspensos em, aproximadamente, 40 mL de meio de isolamento gelado, composto por manitol 300 mM, EDTA 0,1 mM, BSA 0,1% (p/v), HEPES 10 mM, em pH 7,2, e centrifugados a 6.000 g, por 10 min, o que resultou em novos precipitados, ricos em mitocôndrias, ressuspensos em, aproximadamente, 6 mL de um meio de suspensão gelado, composto por manitol

300 mM, BSA 0,1% (p/v), HEPES 10 mM, em pH 7,2. Para os extratos de raízes de beterraba, fizeram-se duas centrifugações adicionais a 6.000 g para eliminação dos pigmentos hidrossolúveis.

Nas suspensões mitocondriais obtidas, denominadas frações de mitocôndrias lavadas, também ocorreram peroxissomas e proplastídeos, necessitando, portanto, de purificações adicionais com gradiente contínuo de percol, conforme descrito por NEUBURGER et al. (1982) para os tubérculos de batata, as raízes de beterraba e os hipocótilos de soja. Para tal, alíquotas de 5,0 mL de suspensão de mitocôndrias lavadas foram colocadas, em tubos de centrífuga, sobre 36 mL de meio contendo percol 28% (v/v), sacarose 0,3 M, tampão fosfato 10 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM e BSA 0,1 % (p/v). Centrifugaram-se os tubos em rotor de ângulo fixo a 40.000 g, por 30 min. Obtiveram-se três frações: a superior, correspondente aos proplastídeos; a mediana, constituída pelas mitocôndrias purificadas; e a inferior, contendo peroxissomas. Como não houve a separação completa entre a banda de proplastídeos e as mitocôndrias (Figura 1-I), foi necessária uma nova separação em gradiente descontínuo de percol (JACKSON et al., 1979). Para isso, a banda superior que estava mesclada com a mediana, foi retirada, diluída em 30 mL de meio de lavagem, constituído de manitol 0,3 M, tampão fosfato 10 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM e BSA 0,1 % (p/v) e centrifugada a 12.000 g, por 15 min. O precipitado foi ressuspenso em, aproximadamente, 5 mL do meio de lavagem. Esta suspensão foi adicionada sobre o gradiente descontínuo de percol, contendo, de baixo para cima, as seguintes concentrações finais de percol: 6 mL de 45% (v/v), 12 mL de 21% (v/v) e 12 mL de 13,5% (v/v), cada banda, com sacarose 0,25 M, BSA 0,2% (p/v) e HEPES 10 mM pH 7,2. Realizou-se a centrifugação em rotor de ângulo fixo a 7.500 g, por 30 min. Observaram-se duas frações (Figura 1-II): a superior, correspondente aos proplastídeos, e a segunda, que se apresentava bem difusa, constituída pelas mitocôndrias purificadas. Para coleóptilos de milho, a purificação adicional foi feita através de um gradiente descontínuo de percol, seguindo-se a descrição de JACKSON et al. (1979), com modificações. Uma alíquota de 5 mL de mitocôndria lavada foi adicionada em tubo de centrífuga, contendo, de baixo para cima, as seguintes concentrações finais de percol: 5 mL de 70% (v/v), 6 mL de 45% (v/v), 11 mL de 21% (v/v) e 11 mL de 13,5% (v/v), cada banda com sacarose 0,25 M, BSA

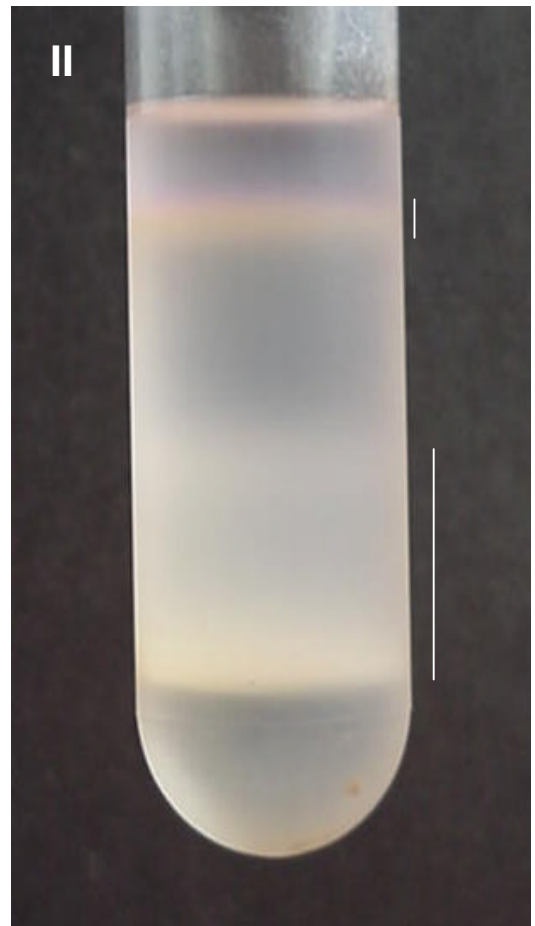
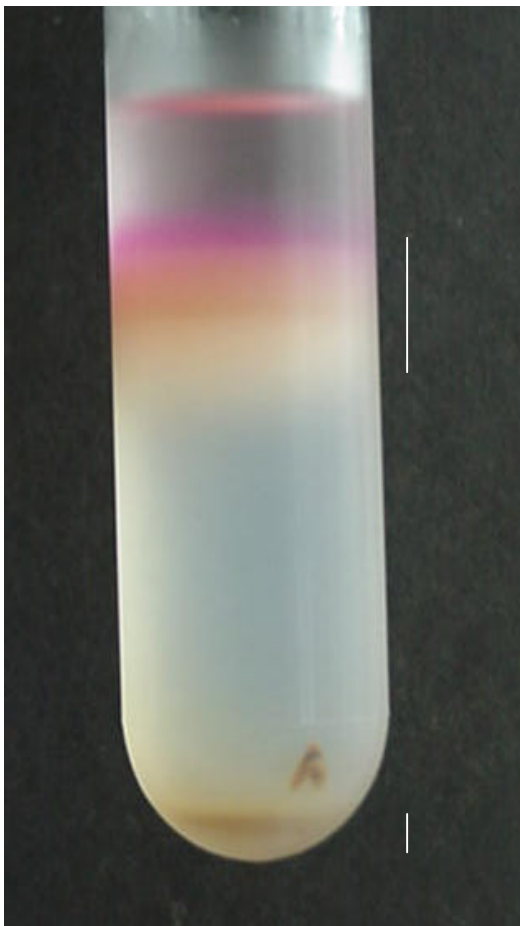


Figura 1- Bandas obtidas após separação em gradientes contínuo (I) e descontínuo (II) de percol. Banda (A): proplastídeos e mitocôndrias mesclados; (B): peroxissomas; (C): proplastídeos e (D): mitocôndrias.

0,2% (p/v) e HEPES 10 mM pH 7,2. A centrifugação foi realizada em rotor de ângulo fixo a 7.500 g, por 30 min. Observaram-se quatro frações: a superior, correspondente aos proplastídeos; a segunda e a terceira, constituídas pelas mitocôndrias purificadas; e a inferior, contendo peroxissomas. Cada uma das frações obtidas, tanto no gradiente contínuo, como no gradiente descontínuo, foi recolhida com pipeta pasteur e diluída em, aproximadamente, 30 mL de meio de lavagem, como descrito anteriormente. A fração superior e a fração mediana do gradiente contínuo e as frações superior, segunda e terceira do gradiente descontínuo, após diluição, foram precipitadas a 12.000 g, por 15 min. A fração inferior, obtida nas duas metodologias acima descritas, foi precipitada a 4.000 g, por 10 min. Cada precipitado foi ressuspensão no menor volume possível (entre 0,5 e 1,0 mL) de meio de lavagem já descrito anteriormente.

Todo o procedimento de isolamento das diversas frações foi conduzido a 4°C. Mantiveram-se as amostras em banho de gelo, até o momento da realização das reações enzimáticas.

### **2.3. Constituição das frações subcelulares e obtenção dos extratos enzimáticos**

*Extrato bruto:* refere-se à suspensão obtida, após a homogeneização do material vegetal com meio de extração, seguida de filtração através de oito camadas de gaze e uma de seda.

*Fração solúvel:* refere-se ao sobrenadante obtido, após a centrifugação do extrato bruto a 9.000 g.

*Fração de mitocôndrias lavadas:* refere-se à suspensão do precipitado, obtido após centrifugação a 6.000 g e ressuspensão em, aproximadamente, 5 mL do meio de suspensão.

*Fração de mitocôndrias purificadas:* corresponde à banda mediana, após a purificação adicional em gradiente de percol.

*Fração de proplastídeos:* corresponde à banda superior, após a purificação adicional em gradiente de percol.

*Fração de peroxissomas:* corresponde à banda inferior, após a purificação adicional em gradiente de percol.

Todos os extratos acima foram acrescidos de Triton X-100 a 0,02%, e utilizados nas avaliações das atividades enzimáticas.

## **2.4. Teor protéico**

Realizou-se a determinação do teor protéico dos extratos enzimáticos pelo método de Bradford, modificado por FANGER (1987). Foi utilizada uma solução de BSA 0,1% (p/v) como padrão.

## **2.5. Atividade enzimática**

### **Ensaio para peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)**

A atividade foi avaliada de acordo com a metodologia de KAR e MISHRA (1976), modificada. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de cada extrato enzimático (obtido conforme descrição no item 2.3) foi adicionada a um volume de 5 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 20 mM. A reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5% (v/v), após incubação por 2 min a 25°C. A absorbância das amostras foi lida a 420 nm. Determinou-se a atividade da POX pela medição da quantidade de purpurogalina formada, utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 2,47  $\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$  (CHANCE e MAEHLI, 1995).



### **Ensaio para catalase (CAT, EC 1.11.1.6)**

Realizou-se o ensaio, segundo metodologia de HAVIR e McHALE (1987), modificada. A reação foi iniciada pela adição de 25  $\mu\text{L}$  de cada extrato enzimático (obtido conforme descrição no item 2.3) a 3 mL de meio de reação, contendo peróxido de hidrogênio 12,5 mM em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, a 30°C. A atividade da CAT foi determinada a 240 nm pela medição da taxa de decréscimo na absorbância das amostras, durante 2 min, em decorrência do consumo do  $\text{H}_2\text{O}_2$  do meio de reação, utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (ANDERSON et al., 1995).

### **Ensaio para superóxido-dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

Uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  de cada extrato enzimático (obtido conforme descrição no item 2.3) foi adicionada a 3 mL de uma mistura de reação constituída de tampão fosfato 50 mM, pH 7,8, L-metionina 13 mM, riboflavina 2  $\mu\text{M}$ , cloreto de azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$  e EDTA 100 nM (Del LONGO et al., 1993). A reação foi conduzida em uma câmara, com interior revestido em papel-alumínio, sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 22 W. Realizou-se a reação à temperatura de 25°C, cujo início se deu pela ligação da lâmpada e, após 10 min, pelo desligamento da mesma. A atividade da SOD foi medida pela diferença no incremento da absorbância das amostras a 560 nm, subtraída do branco (amostra sem adição de extrato). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977).

## **2.6. Delineamento experimental e análise estatística**

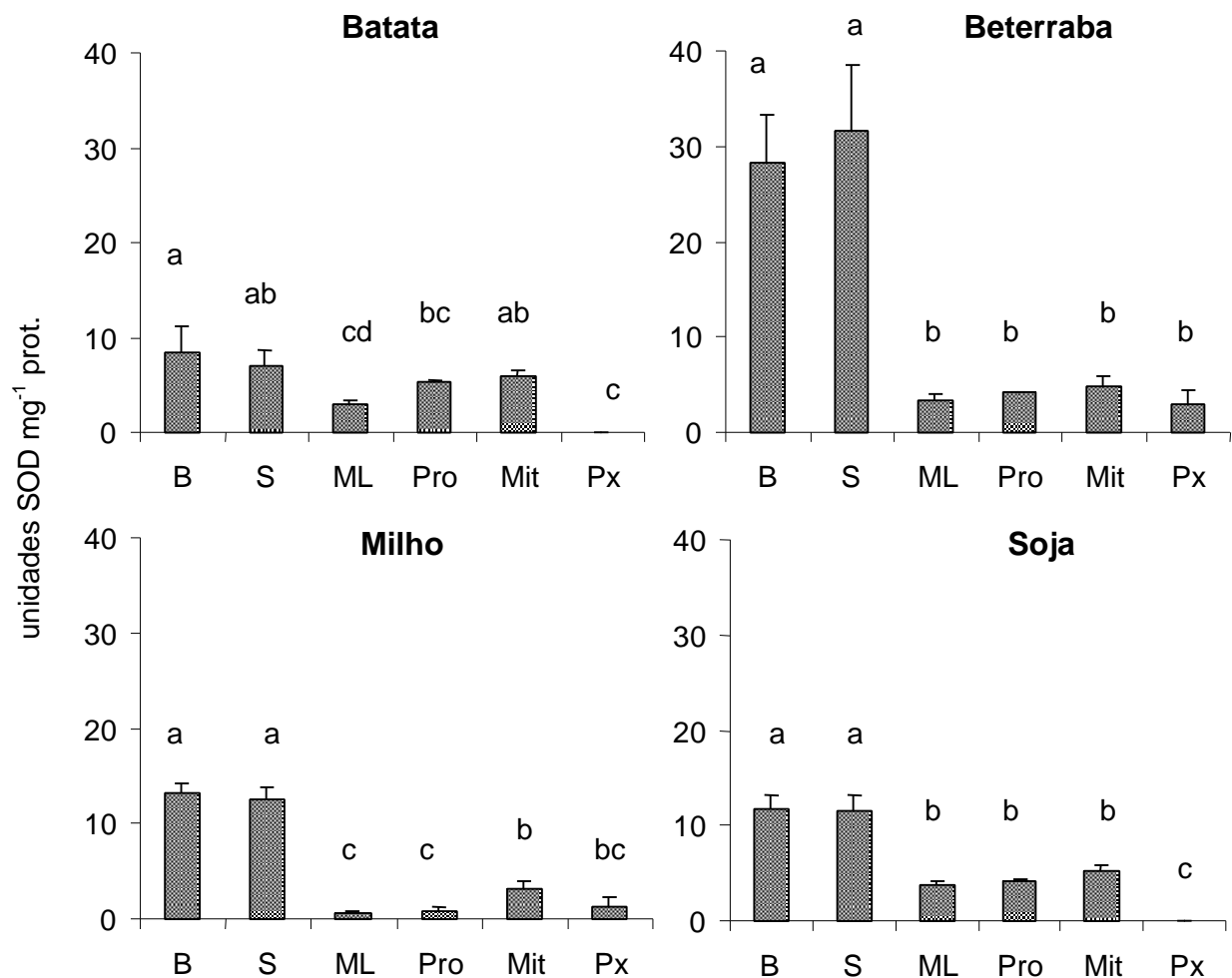
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro cultivares (batata, beterraba, soja e milho), dois tratamentos (controle e frio) e quatro repetições. As diferenças significativas entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste-*t* de Student, a 5% de probabilidade. Utilizou-se o teste Tukey, a 5% de probabilidade, para avaliar as diferenças significativas entre as frações celulares dentro de cada material vegetal.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades da superóxido dismutase (SOD) encontradas nas frações subcelulares, obtidas dos diferentes materiais, na condição controle, encontram-se representadas na Figura 2. Observa-se que, em todas as espécies analisadas, as maiores atividades foram encontradas no extrato bruto e na fração solúvel, especialmente no caso da beterraba, em que a atividade na fração solúvel foi, em média, cerca de seis vezes superior à atividade encontrada nas demais frações. Resultados semelhantes foram encontrados em extratos de folhas de tabaco, onde a CuZn-SOD citosólica geralmente apresenta maior atividade (VAN CAMP et al., 1997). Em extratos de folhas de pepino, LEE e LEE (2000) detectaram seis isoformas da SOD, sendo que a Cu/Zn-SOD 1 apresentou maior expressão que as demais.

A SOD apresenta-se em várias isoformas dentro da célula, que caracterizam-se pelo metal ligado ao seu sítio ativo. A Fe-SOD encontra-se em maior quantidade nos cloroplastos e citosol, a Cu/Zn-SOD, predominantemente no citosol, e a Mn-SOD, localizada especialmente em mitocôndrias (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977; BOWLER et al., 1992; Del RIO et al., 1998). A localização e a atividade das SODs pode variar dentro dos compartimentos celulares de espécie para espécie. As SODs citoplasmática e mitocondrial são geralmente mais abundantes em plântulas germinando e em material estiolado, enquanto que a SOD cloroplastídica é mais abundante em folhas verdes (BOWLER et al., 1992).

No presente trabalho, destaca-se o fato de não terem sido detectadas atividades da SOD nos peroxissomas de batata e soja, além de atividades muito



**Figura 2-** Atividades da superóxido dismutase (SOD) nas diversas frações subcelulares, B (extrato bruto), S (fração solúvel), ML (mitocôndrias lavadas), Pro (proplastídeos), Mit (mitocôndrias purificadas), Px (peroxissomas), isoladas de tubérculos de batata, raízes de beterraba, coleótilos de milho e hipocótilos de soja na condição controle. Barras representam os desvios-padrão das médias de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, entre as frações da mesma espécie, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

baixas também em mitocôndrias lavadas, proplastídeos e peroxissomas de coleótilos de milho (Figura 2). Nos peroxissomas, uma atividade ligeiramente mais elevada da SOD foi observada apenas em raízes de beterraba, embora esta atividade tenha sido, significativamente, menor que a atividade encontrada no extrato bruto e na fração solúvel dessa espécie. De modo semelhante, VAN CAMP et al. (1997) também não detectaram a presença de SOD em peroxissomas isolados de folhas de tabaco.

Vários autores relatam que a SOD está preferencialmente localizada no citosol, em mitocôndrias e cloroplastos, estando ausente nos peroxissomas (FRIDOVICH, 1986; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; BOWLER et al., 1992). Entretanto, Del RIO et al. (1983) e SANDALIO et al. (1987) detectaram a ocorrência de SOD em peroxissomas de plantas, utilizando métodos imunocitoquímicos e fracionamento celular. Além disso, Del RIO et al. (1996) verificaram a presença dessa enzima em peroxissomas isolados de sete espécies: folhas de ervilha, pétalas de cravo, endosperma de mamona, melancia, algodão, pepino e cotilédones de girassol. Segundo CORPAS et al. (2001), o principal processo metabólico, responsável pela produção do radical superóxido, na matriz dos peroxissomas de folhas de ervilha, é a atuação da xantina-oxidase, enzima envolvida no catabolismo de purinas.

As diferenças em relação aos dados da literatura podem ser devidas aos diferentes tipos de materiais utilizados. A maior parte dos registros da literatura refere-se a peroxissomas isolados de folhas, endospermas ou cotilédones, nos quais essas organelas têm papel importante na fotorrespiração ou no ciclo do glioxilato (CORPAS et al., 2001), o que, provavelmente, não devem estar ocorrendo nos materiais utilizados no presente experimento.

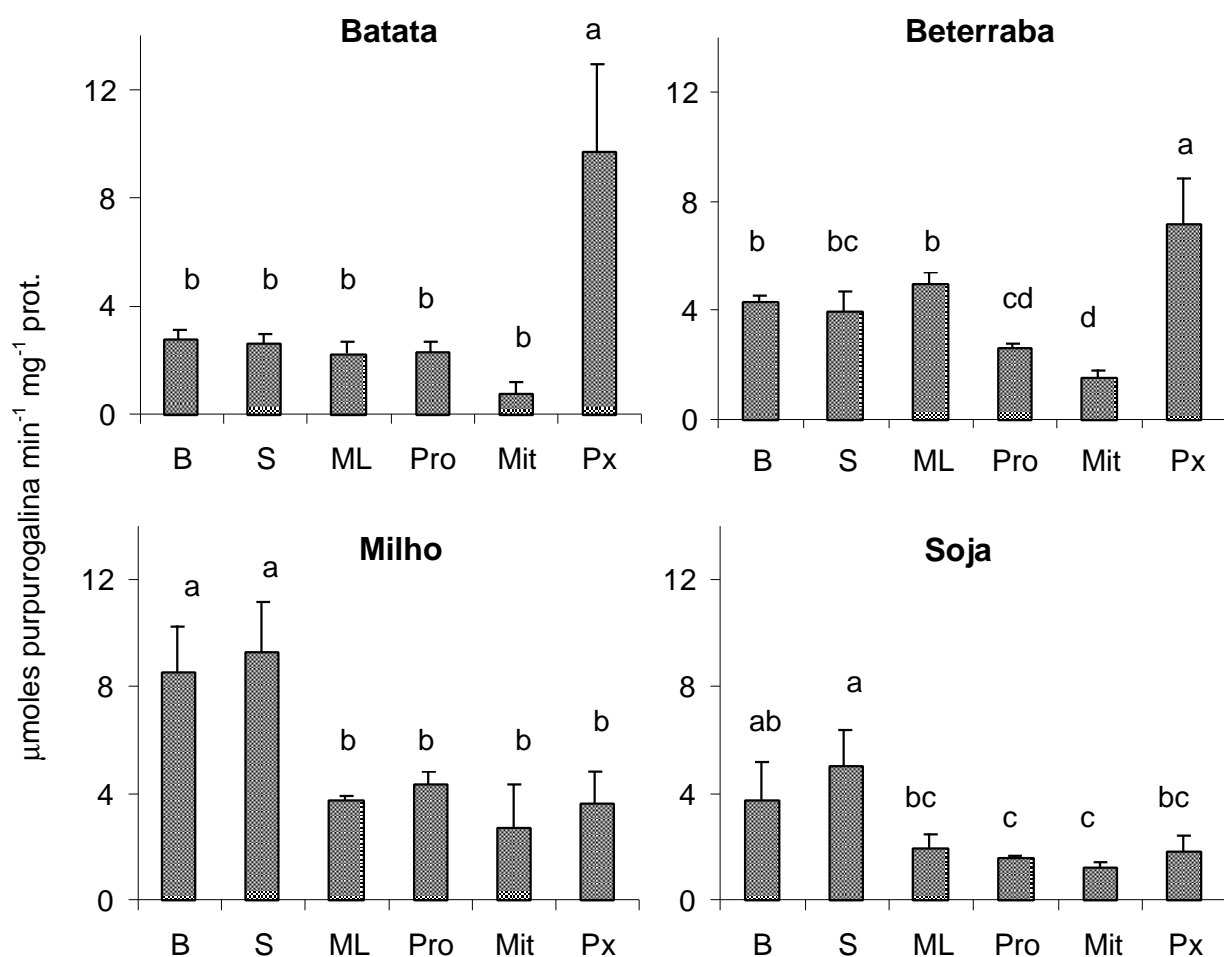
A maior atividade da SOD, obtida na fração solúvel, indica que as mitocôndrias, os plastídeos e os peroxissomas não estão sendo capazes de eliminar todo o superóxido que produzem, e que este radical pode estar sendo difundido para outros compartimentos celulares, além de poder estar sendo produzido, em maior escala, no lado citosólico da membrana dos peroxissomas (CORPAS et al., 2001).

Considerando-se as atividades de peroxidase (POX), apresentadas na Figura 3, notam-se valores mais elevados nos peroxissomas de batata e beterraba. No caso das frações obtidas de batata, a atividade nos peroxissomas foi cerca de três vezes superior àquelas obtidas nas demais frações, nas quais não foram observadas diferenças significativas. Nas frações obtidas de beterraba, nota-se que menores atividades foram encontradas em mitocôndrias purificadas e em proplastídeos. JIMÉNEZ et al. (1998) também encontraram maiores atividades da ascorbato peroxidase em peroxissomas isolados de folhas de ervilha, em comparação com as atividades na fração solúvel e em mitocôndrias. Os resultados, obtidos no presente trabalho, concordam com os dados da literatura que relatam a existência de diversas isoenzimas das POXs, as quais são caracterizadas por sua especificidade, pelo substrato e, também, por sua localização nos diversos compartimentos celulares, sendo abundantes nos peroxissomas, onde, juntamente com outras enzimas, constituem um sistema antioxidante. Com isso, elimina o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado nesta organela (SIEGEL, 1993; Del RIO et al., 1998; JIMÉNEZ et al., 1998).

Em milho e soja, entretanto, as maiores atividades da POX foram encontradas no extrato bruto e na fração solúvel (Figura 3). Em milho, as atividades da POX nas frações de mitocôndrias lavadas, proplastídeos, mitocôndrias purificadas e peroxissomas não foram, significativamente, diferentes. Em soja, encontraram-se as menores atividades nos proplastídeos e nas mitocôndrias purificadas. Porém, elas não diferiram, significativamente, das atividades encontradas em mitocôndrias lavadas e em peroxissomas.

Considera-se a flexibilidade de funções uma característica de peroxissomas de plantas tal como ocorre em cotilédones de certas sementes. Nestas, os peroxissomas são transformados em glioxissomos, passando a atuar intensamente na conversão das reservas lipídicas em carboidratos solúveis, e mais tarde retransformados em peroxissomas (HAYASHI et al., 2000). Em tecidos foliares, os peroxissomas têm participação fundamental na fotorrespiração.

Além disso, as peroxidases englobam uma gama muito ampla de isoformas, podendo estar envolvidas em atividades metabólicas tão diversas desde a formação de lignina até a participação no ciclo ascorbato/glutationa, especialmente presente em plastídeos e mitocôndrias, onde atua na eliminação do peróxido de hidrogênio



**Figura 3-** Atividades da peroxidase (POX) nas diversas frações subcelulares, B (extrato bruto), S (fração solúvel), ML (mitocôndrias lavadas), Pro (proplastídeos), Mit (mitocôndrias purificadas), Px (peroxissomas), isoladas de tubérculos de batata, raízes de beterraba, coleótilos de milho e hipocótilos de soja na condição controle. Barras representam os desvios-padrão das médias de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, entre as frações da mesma espécie, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

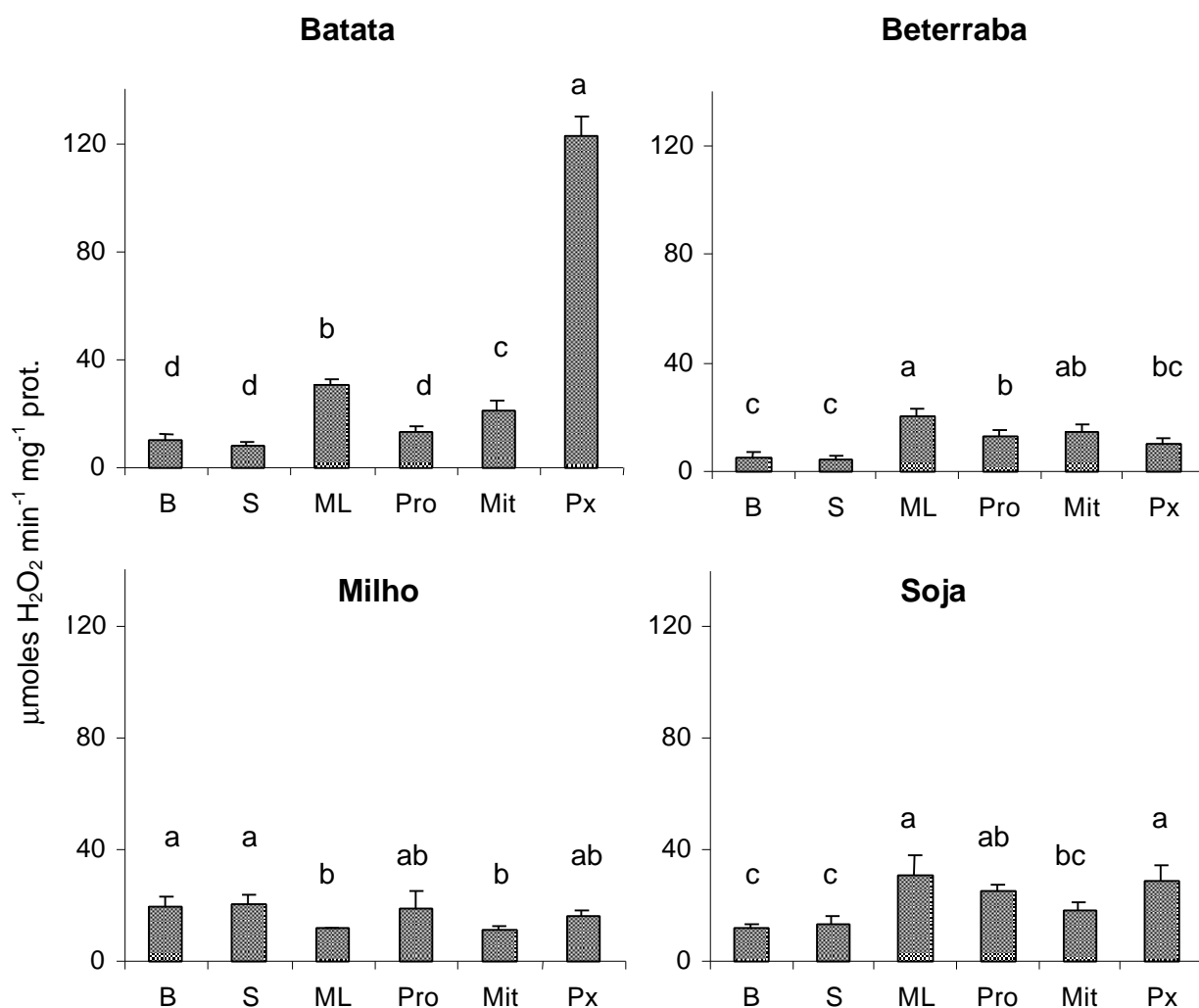
formado na célula (BUCHANAN et al., 2000). Essa diversidade funcional pode ter contribuído para os diferentes resultados obtidos, considerando-se os peroxissomas de milho e soja, em comparação com aqueles obtidos para batata e beterraba. Esses materiais, provenientes de diferentes tecidos e espécies, encontram-se em diferentes estádios de desenvolvimento, o que pode apresentar vias metabólicas distintas, com menor ou maior produção de  $H_2O_2$  e, conseqüentemente, menores ou maiores atividades das POXs.

Em todas as espécies analisadas, os menores valores de atividade da POX foram sempre encontrados na fração das mitocôndrias purificadas (Figura 3). Por ser as mitocôndrias consideradas um dos principais sítios de produção de espécies reativas dentro da célula, a eliminação do peróxido de hidrogênio no interior dessas organelas, nas condições experimentais do presente trabalho, pode estar sendo feita por outras enzimas presentes na matriz, como a catalase, as enzimas do ciclo ascorbato/glutationa e do sistema ferredoxina/tiorredoxina. Além disso, o  $H_2O_2$  pode estar se difundindo através da membrana, sendo eliminado em outros locais da célula (MØLLER, 2001).

Neste trabalho, um outro fator que pode explicar a baixa atividade da POX nas mitocôndrias purificadas, quando comparada com as demais frações, é o tipo de substrato que foi utilizado para o ensaio enzimático. O pirogalol permite detectar diversos tipos de peroxidase e não apenas a ascorbato peroxidase, considerada uma das principais peroxidases mitocondriais, por estar diretamente envolvida na eliminação de  $H_2O_2$  (JIMÉNEZ et al., 1998; De LEONARDIS, et al., 2000; MØLLER, 2001). Portanto, outros tipos de peroxidases, presentes em diferentes compartimentos celulares, podem estar mais ativos que o sistema envolvido na eliminação de  $H_2O_2$  nas mitocôndrias.

A atividade da catalase (CAT) em peroxissomas de batata foi 4 a 10 vezes maior que nas demais frações (Figura 4). Em beterraba e soja, observaram-se maiores atividades nas frações organelares que nas frações solúveis e nos extratos brutos. Em beterraba, as maiores atividades da CAT encontraram-se nas mitocôndrias lavadas, sendo que as mitocôndrias purificadas foram as organelas que mais contribuíram para isso. Porém, em soja, os peroxissomas e os proplastídeos foram as organelas que mais contribuíram para as maiores atividades encontradas





**Figura 4-** Atividades da catalase (CAT) nas diversas frações subcelulares, B (extrato bruto), S (fração solúvel), ML (mitocôndrias lavadas), Pro (proplastídeos), Mit (mitocôndrias purificadas), Px (peroxissomas), isoladas de tubérculos de batata, raízes de beterraba, coleótilos de milho e hipocótilos de soja na condição controle. Barras representam os desvios-padrão das médias de quatro repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, entre as frações da mesma espécie, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

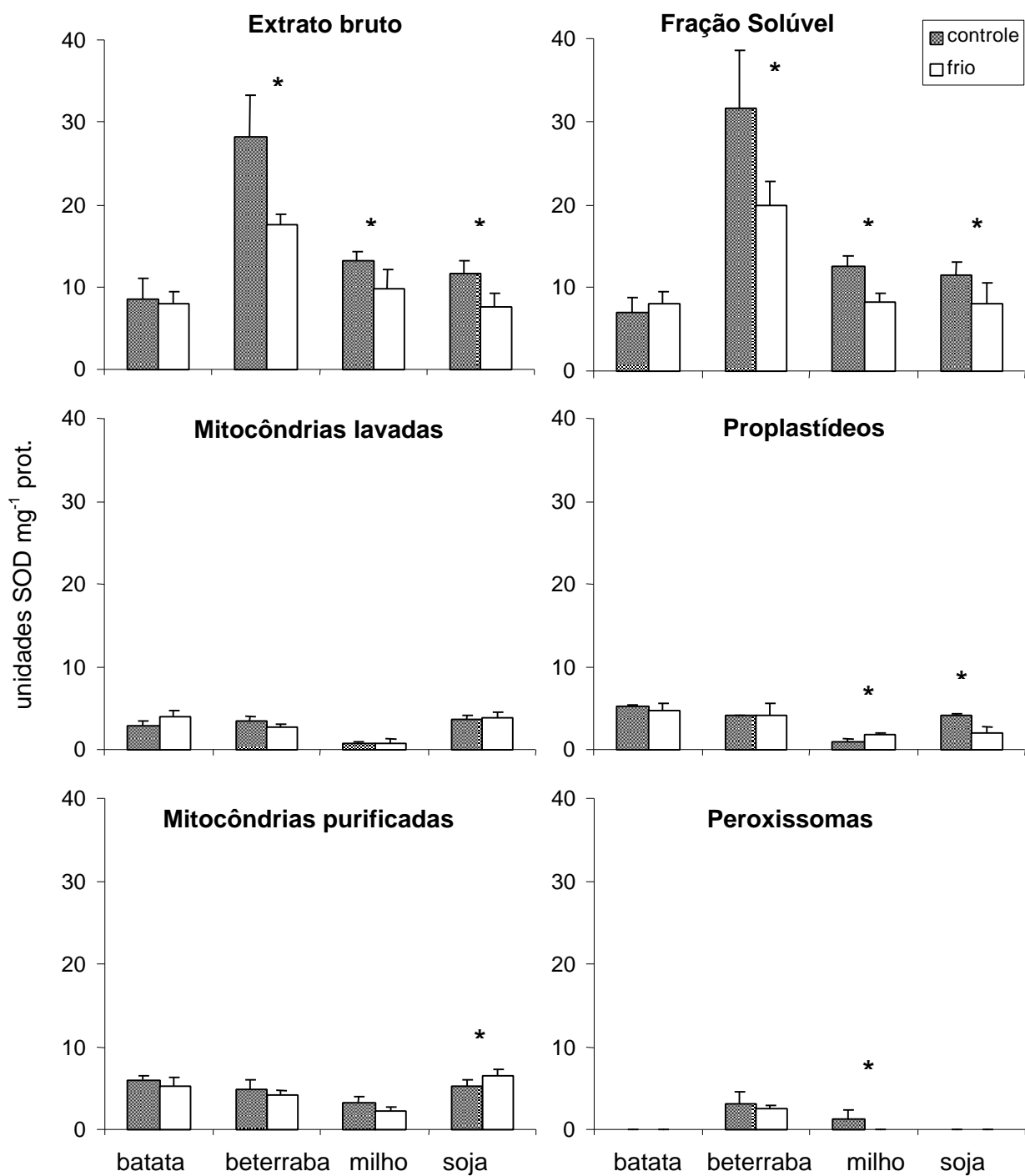
na fração de mitocôndrias lavadas. Em milho, as maiores atividades da CAT foram observadas no extrato bruto e na fração solúvel, embora as diferenças encontradas não tenham significância evidente.

A CAT é uma importante enzima do metabolismo oxidativo, que participa do processo de eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado dentro da célula. Ela apresenta-se em várias isoformas e pode estar presente nos diversos compartimentos celulares, localizando-se especialmente nos peroxissomas e glioxissomas, sendo considerada enzima marcadora desse tipo de organela (PRASAD et al., 1994; BESTWICK et al., 2001; BREUSEGEM et al., 2001).

No presente experimento, foi observada atividade de CAT nas mitocôndrias purificadas em todas as espécies avaliadas (Figura 4). SCANDALIOS et al. (1980) encontram atividade de uma isoforma de catalase, codificada pelo gene *cat3*, em mitocôndrias isoladas de folhas de milho. Porém, MØLLER (2001) questiona a presença de CAT em mitocôndrias vegetais, alegando que o domínio N-terminal da seqüência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA da *cat3* não indica que esta proteína seja destinada às mitocôndrias.

Os efeitos dos tratamentos com baixas temperaturas sobre as atividades da SOD, nas diversas frações celulares das quatro espécies avaliadas, encontram-se na Figura 5. As atividades da SOD no extrato bruto e na fração solúvel foram reduzidas em resposta à baixa temperatura, em beterraba, milho e soja, sem alterações significativas em batata. Na fração de mitocôndrias lavadas, o frio não resultou em diferenças significativas na atividade da SOD, em nenhuma das espécies analisadas. A baixa temperatura aumentou a atividade da SOD em proplastídeos de milho, porém reduziu a atividade da mesma nos proplastídeos de soja. O frio aumentou a atividade da SOD, apenas em mitocôndrias purificadas de soja. Em peroxissomas de beterraba, a atividade da SOD não foi, significativamente, diferente entre os tratamentos. Entretanto, em milho, a atividade caiu a zero em resposta à baixa temperatura.

PINHEIRO (2000) avaliou a atividade da SOD em mitocôndrias lavadas de tubérculos de batata expostos a 4°C, durante um, cinco ou dez dias. Ele observou um decréscimo na atividade da SOD, apenas no décimo dia de tratamento. As diferenças em relação aos resultados do presente trabalho, referentes à fração de



**Figura 5-** Atividades da superóxido dismutase (SOD) nas frações subcelulares: extrato bruto, fração solúvel, mitocôndrias lavadas, proplastídeos, mitocôndrias purificadas e peroxissomas, isoladas de tubérculos de batata, raízes de beterraba, coleótilos de milho e hipocótilos de soja. Barras representam os desvios-padrão das médias de quatro repetições. Asteriscos (\*) representam diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste-*t* de Student, a 5% de probabilidade.

mitocôndrias lavadas, talvez possam ser devidas às diferenças no grau de contaminação da fração utilizada, considerando-se a participação de proplastídeos e peroxissomas.

Outro fator que poderia explicar a ausência de efeitos na atividade da SOD, em resposta ao frio para a maioria dos extratos obtidos de beterraba, milho e soja, é o momento após o início do estresse, no qual as avaliações foram feitas. Um estudo com extrato bruto de folhas de pepino, submetidas a 4°C por períodos de 6h e 12h, mostrou aumentos na atividade da SOD. Porém, 12h após o período de pós-estresse, houve redução da atividade da SOD, que foi acompanhada do aumento na formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (LEE e LEE, 2000). Em plântulas de pêsego, submetidas à baixa temperatura, LENG e QI (2002) observaram que a atividade da SOD aumentou, atingindo o máximo, após 8h de exposição ao frio. Posteriormente, houve um decréscimo, sendo que após 48h não havia mais diferença entre os tratamentos. Como no presente experimento, as avaliações foram feitas com dois dias após o início do tratamento com frio, para milho e soja, e no caso de beterraba, com dez dias de tratamento, não foi possível estabelecer se ocorreu alguma resposta imediata da SOD, o que indicaria um possível estresse oxidativo, causado pelo tratamento aplicado e uma posterior aclimação do metabolismo dessas espécies.

Em geral, a aclimação ao frio resulta em aumento na atividade de enzimas envolvidas na proteção contra as espécies reativas de oxigênio, como a SOD, dentre outras (KARPINKI et al., 1993; MISHRA et al., 1993; LEE e LEE, 2000; LENG e QI, 2002).

Entretanto, em folhas de *Nicotiana plumbaginifolia* expostas ao frio na presença de luz, o nível de mRNA total da Mn-SOD não se alterou, e só houve aumento desse mRNA, quando as plantas retornaram à temperatura ambiente (TSANG et al., 1991). A atividade da Mn-SOD, avaliada em mitocôndrias isoladas de folhas de ervilha em senescência, foi 78% maior do que a encontrada em mitocôndrias de folhas jovens (JIMÉNEZ et al., 1998).

No presente trabalho, não foram feitas avaliações dos níveis das espécies reativas de oxigênio produzidas em consequência dos tratamentos com baixa temperatura. Adicionalmente, as reduções nas atividades da SOD nos extratos brutos e nas frações solúveis, da maioria das espécies analisadas, indicam que,

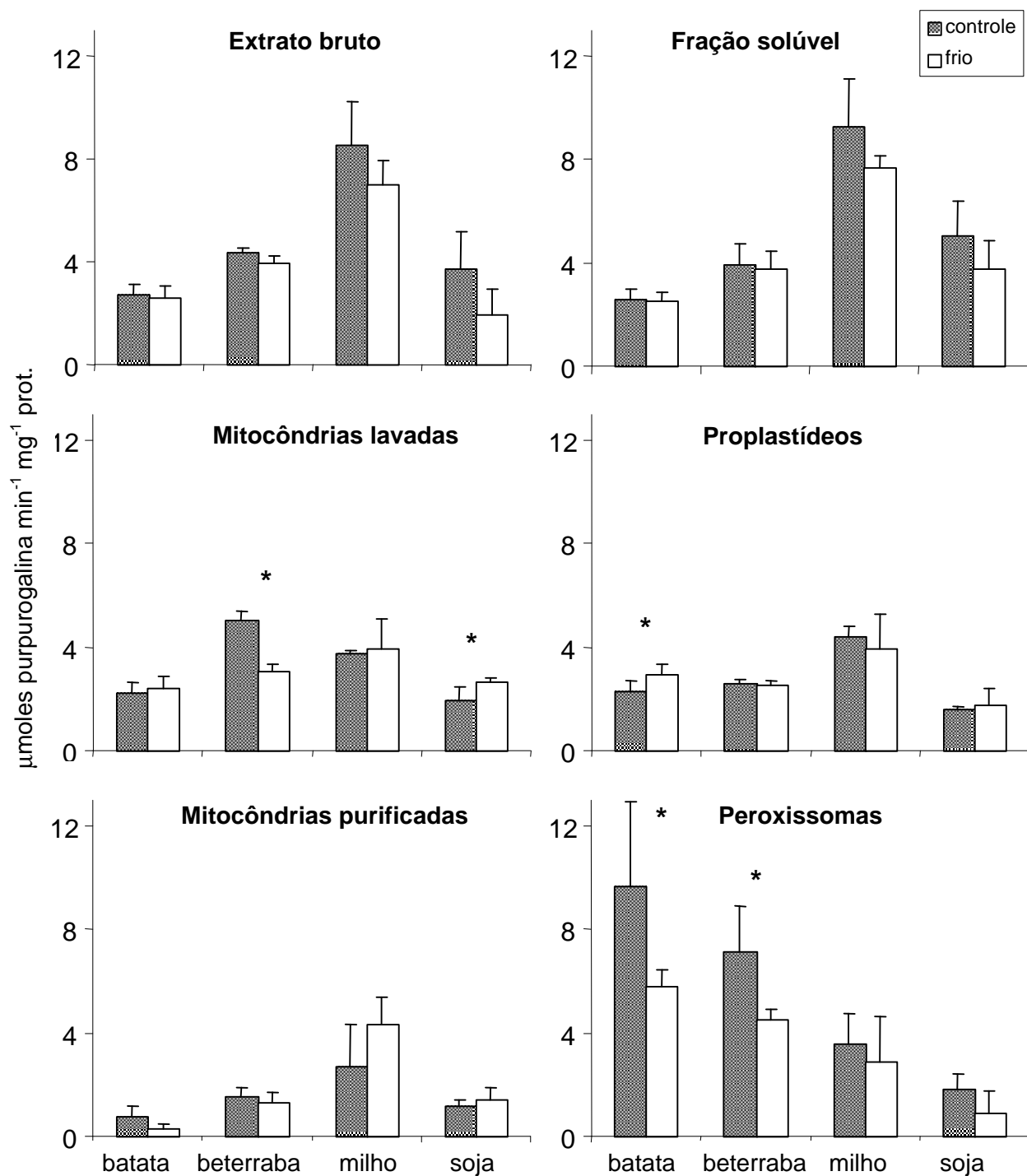
provavelmente, os tratamentos com baixa temperatura não tenham sido suficientes para promover o nível de estresse oxidativo esperado.

O comportamento da atividade de peroxidase (POX), nas frações celulares das diversas espécies estudadas, sob a condição de estresse por frio, encontra-se na Figura 6. A atividade da POX não mostrou diferença significativa entre os tratamentos nas frações do extrato bruto, na fração solúvel e nas mitocôndrias purificadas, em todas as espécies analisadas. O frio diminuiu a atividade da POX na fração de mitocôndrias lavadas de beterraba, porém teve um efeito contrário em soja, onde aumentou a atividade da mesma. O frio aumentou a atividade da POX, somente em proplastídeos isolados de tubérculos de batata. Em peroxissomas de batata e beterraba, houve uma redução na atividade da POX nas plantas submetidas ao frio.

Alguns trabalhos relatam aumentos da atividade da POX em diversas situações de estresse. LEE e LEE (2000) observaram aumento da atividade de uma POX no extrato bruto de folhas de pepino, submetidas ao frio. KAR e MISHRA (1976) verificaram aumento da atividade da POX, em folhas senescentes de arroz, em comparação com folhas jovens. PROCHAZKOVA et al. (2001) observaram aumentos da atividades da POX, em folhas senescentes de milho. Em mitocôndrias isoladas de plântulas de milho crescidas à temperatura limite de 14°C, a atividade da POX foi maior que a encontrada em mitocôndrias das plântulas crescidas a 25°C (De SANTIS et al., 1999).

Semelhante ao encontrado para a POX em tubérculos de batata e em hipocótilos de milho (Figura 6), PINHEIRO (2000) também não observou alterações significativas na atividade da peroxidase do ascorbato, na fração de mitocôndrias lavadas de tubérculos de batata, submetidos ao frio.

A comparação dos resultados da literatura com os obtidos no presente trabalho, onde não foram observados aumentos da atividade da POX em consequência dos tratamentos com baixa temperatura, na maioria das espécies avaliadas, reforça a possibilidade de que os tratamentos com frio não tenham sido suficientes para promover o estresse oxidativo esperado.



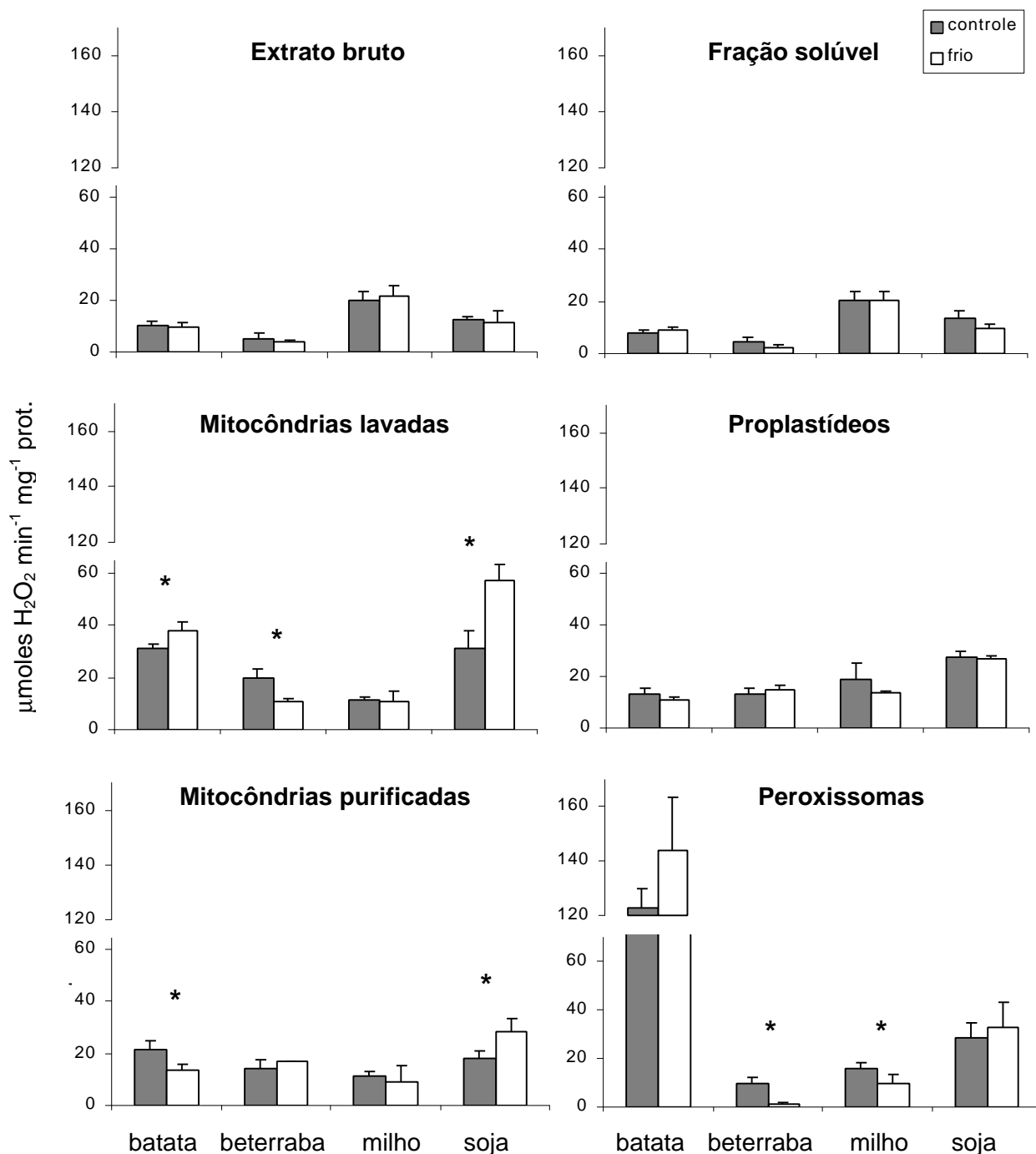
**Figura 6-** Atividades da peroxidase (POX) nas frações subcelulares: extrato bruto, fração solúvel, mitocôndrias lavadas, proplastídeos, mitocôndrias purificadas e peroxissomas, isoladas de tubérculos de batata, raízes de beterraba, coleótilos de milho e hipocótilos de soja. Asteriscos (\*) representam diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste-*t* de Student, a 5% de probabilidade.

Os efeitos do frio sobre a atividade da CAT, nas várias frações obtidas dos diversos materiais avaliados, encontram-se na Figura 7. A atividade da CAT não foi alterada, significativamente, no extrato bruto, na fração solúvel e nos proplastídeos das diversas espécies estudadas, quando elas foram submetidas ao frio. Nas frações de mitocôndrias lavadas, o frio provocou um aumento da atividade da CAT em batata e soja e reduziu em beterraba. A atividade da CAT foi reduzida em peroxissomas de beterraba e milho submetidos ao frio. Nos peroxissomas de batata e soja, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

PRASAD et al. (1994) avaliaram a atividade da CAT em plântulas de milho estressadas por frio. Durante o período de aclimação, por três dias, a 14°C, observou-se um aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, logo nas primeiras horas, enquanto a atividade da CAT mantinha-se basal. Posteriormente, iniciou-se um lento declínio nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acompanhado de um grande aumento na atividade da CAT, o que indica a atuação dessa enzima na eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formado em situações de estresse por frio. Um exemplo de diminuição da atividade da CAT, pela exposição ao frio, foi registrado, em extratos de folhas de pepino, por LEE e LEE (2000). Em culturas de arroz, o frio também promoveu queda na atividade da CAT (FADZILLAH et al., 1996).

Semelhante ao encontrado para batata e soja, PINHEIRO (2000) observou um aumento da atividade da CAT, em suspensão, de mitocôndrias lavadas de tubérculos de batata submetidos ao frio. Neste caso, ocorreram também aumentos na atividade da AOX e PUMP, enzimas particulares de vegetais, que podem exercer uma função protetora contra as espécies reativas de oxigênio, em situações de estresse oxidativo mitocondrial (McINTOSH et al., 1998; MØLLER, 2001).

O estresse oxidativo pode ser claramente evidenciado em um tecido, quando os teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são determinados. Geralmente, os aumentos nos teores desses peróxidos são seguidos de aumentos nas atividades da catalase e peroxidase do ascorbato (OKUDA et al., 1991; O'KANE et al., 1996). Porém, existem trabalhos que mostram um comportamento oposto, onde ocorre a diminuição da atividade da CAT e de outras enzimas antioxidantes, concomitante aos aumentos nos teores de peróxido de hidrogênio (PRASAD et al., 1994; FADZILLAH et al., 1996; PROCHAZKOVA et al., 2001).



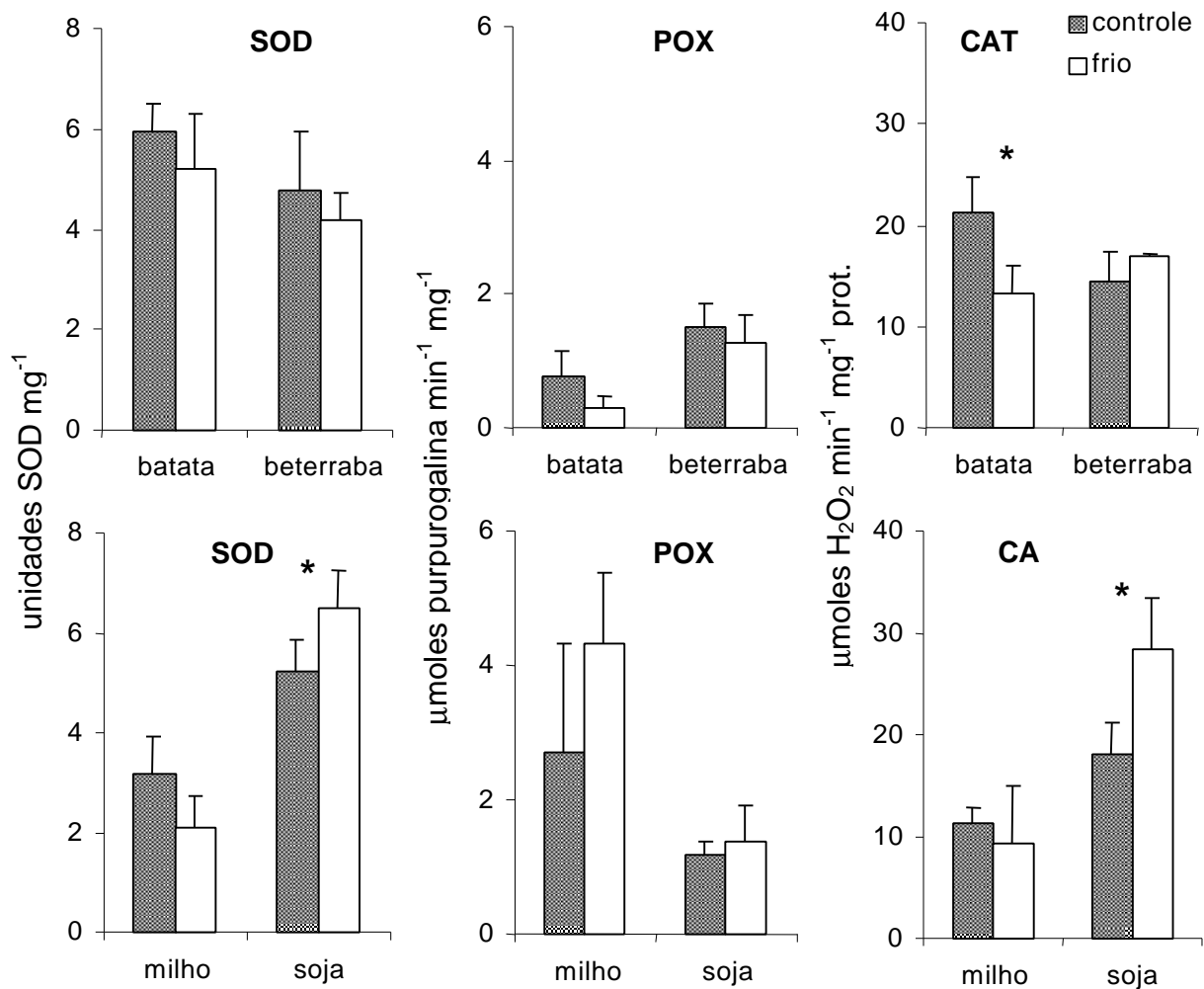
**Figura 7-** Atividades da catalase (CAT) nas frações subcelulares: extrato bruto, fração solúvel, mitocôndrias lavadas, proplastídeos, mitocôndrias purificadas e peroxissomas, isoladas de tubérculos de batata, raízes de beterraba, coleótilos de milho e hipocótilos de soja. Barras representam os desvios-padrão das médias de quatro repetições. Asteriscos (\*) representam diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste-*t* de Student, a 5% de probabilidade.



A avaliação das atividades das enzimas SOD, CAT e POX, nas mitocôndrias purificadas dos diversos materiais estressados por frio, encontra-se apresentada na Figura 8. Observa-se que a atividade da SOD, nas espécies em que as mitocôndrias não captam  $\text{Ca}^{2+}$  (batata e beterraba), não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Para as espécies cujas mitocôndrias são captadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  (milho e soja), apenas em soja observou-se um aumento da atividade da SOD no tratamento com frio. Para a atividade da POX, não observaram diferenças significativas entre os tratamentos em nenhuma das quatro espécies avaliadas. A atividade da CAT diminuiu nas mitocôndrias purificadas de tubérculos de batata tratados com frio, porém nenhuma diferença significativa ocorreu entre os tratamentos em mitocôndrias purificadas de raízes de beterraba. A atividade da CAT não apresentou diferença significativa entre os tratamentos para as mitocôndrias de milho, embora um aumento da atividade dessa enzima tenha sido observado, no tratamento com frio em mitocôndrias de soja.

Vários fatores podem influenciar a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias: alterações do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (RUTTER e RIZUTO, 2000); presença de inibidores da cadeia de transporte de elétrons (FERGUSON et al., 1985; GUNTER e PFEIFFER, 1990; GUNTER e GUNTER, 1994), bem como as condições que levam aos estresses oxidativos, dentre eles o estresse por frio (FERGUSON et al., 1985). A excessiva captação e acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  podem levar ao aumento na produção de EROs nas mitocôndrias e, possivelmente, alterar a atividade de enzimas antioxidantes (KOWALTOWSKI et al., 1996; KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999).

Porém, entre as espécies avaliadas e com o tipo de tratamento utilizado no presente trabalho, não foi possível observar um padrão de comportamento característico para as enzimas avaliadas, considerando tanto as mitocôndrias que captam cálcio (soja e milho), quanto as mitocôndrias que não captam cálcio (batata e beterraba). Dessa forma, os resultados não permitem estabelecer uma relação entre a capacidade mitocondrial de captação de cálcio e as atividades das enzimas avaliadas. Este fato talvez possa ser justificado pela irregularidade nas respostas das enzimas avaliadas diante do estresse aplicado, bem como pela incapacidade de indução de um estresse oxidativo mais severo, em decorrência do tratamento com frio aplicado nos experimentos.



**FIGURA 8-** Atividades da SOD, POX e CAT em mitocôndrias purificadas de tubérculos de batata, raízes de beterraba, coleótilos de milho e hipocótilos de soja. Barras representam os desvios-padrão das médias de quatro repetições. Grupos seguidos de asteriscos (\*) diferem, estatisticamente, entre os tratamentos, pelo teste-*t* de Student, a 5 % de probabilidade.

#### 4- RESUMO E CONCLUSÕES

Foram avaliados os efeitos de tratamentos à baixa temperatura sobre as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e catalase (CAT), em mitocôndrias captadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  (isoladas de hipocótilos de soja e coleótilos de milho), em comparação com mitocôndrias incapazes de captar  $\text{Ca}^{2+}$  (isoladas de tubérculos de batata e raízes de beterraba). Adicionalmente, compararam-se as atividades dessas enzimas mitocondriais com suas isoenzimas presentes em outras frações celulares.

Os tubérculos de batata e as raízes de beterraba foram mantidos à temperatura ambiente (controle) e a 5°C, por dez dias. Para as plântulas de soja e de milho o tratamento controle correspondeu à sua manutenção à temperatura de 28°C, durante quatro dias após o plantio. O tratamento com frio consistiu em manter outro grupo de plântulas por mais dois dias, transferindo-as para temperatura de 5°C.

A atividade da SOD, nas diversas espécies, foi maior na fração solúvel e no extrato bruto do que nas organelas isoladas. A atividade da SOD foi reduzida pelo frio no extrato bruto e na fração solúvel de beterraba, milho e soja e, também, nos peroxissomas de milho. Por outro lado, ocorreu um aumento na atividade da SOD em resposta ao frio em mitocôndrias purificadas de soja e nos proplastídeos de milho. A atividade de SOD, nos peroxissomas, foi detectada apenas em beterraba e milho.

A atividade da POX, em peroxissomas de beterraba e batata, foi, significativamente, maior que nas demais frações, e, também, significativamente,

mais intensa no extrato bruto e na fração solúvel de milho e soja. O frio não alterou a atividade da POX nas mitocôndrias e nos proplastídeos de todas as espécies estudadas, exceção feita ao aumento da atividade da POX nos proplastídeos de batata. Além disso, houve redução na atividade da POX em peroxissomas de batata e beterraba.

A atividade da CAT, nos peroxissomas de batata, foi, significativamente, mais elevada que nas demais frações. O frio reduziu a atividade da CAT em mitocôndrias purificadas de batata e aumentou em soja, sem alterações significativas nas outras espécies. Em proplastídeos, não houve alterações significativas, mas, em peroxissomas, houve redução da atividade da CAT nos tratamentos à baixa temperatura, apenas em beterraba e milho.

Os resultados sugerem que os tratamentos com frio não foram suficientes para promover estresse oxidativo nos materiais estudados. Diante da irregularidade nas respostas das enzimas avaliadas, também não foi possível estabelecer uma relação entre a capacidade mitocondrial de captação de cálcio e a atividade das enzimas avaliadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, K.R., WATSON, J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing. New York & London, 3<sup>rd</sup> ed., pp. 721-782.
- ANDERSON, M.D., PRASAD, T.K., STEWART, C.R. (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiol.* **109** (4): 1247-1257.
- BESTWICK, C.S., ADAM, A.L., PURI, N., MANSFIELD, J.W. (2001) Characterisation of and changes to pro- and anti-oxidant enzyme activities during the hypersensitive reaction in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Science* **161**: 497-506.
- BORGES, R. (1999) *Caracterização cinética da Isocitrato Desidrogenase de mitocôndrias de batata e de soja*. Viçosa, MG: UFV, 1999. 34p. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa.
- BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INÉS, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 83-116.
- BREUSEGEM, F.V., VRANOVÁ, E., DAT, J.F., INZÉ, D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science.* **161**: 405-414.

- BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 1189-1193.
- BUSH, D.S. (1993) Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* **103**: 7-13.
- CAKMAK, I., HORST, J. H. (1991) Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum.* **83**: 463-468.
- CARAFOLI, E.G.S. (1988) The role of calcium in the control of cell function. In: Lemasters, J.J.; Hackenbrok, R.; Thurman, R.G. & Westerhof, H.V. (eds.), *Integration of mitochondrial function*. Plenum Press, New York, pp. 475-485.
- CARNIERI, E.G.S. (1986) *Transporte de Ca<sup>2+</sup> por mitocôndrias vegetais*. Curitiba: UFPR, 1986. 74p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná.
- CHANCE, B., MAEHLEY, A.C. (1995) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzimol.* **2**: 764-775.
- CORPAS, F.J., BARROSO, J.B., Del RIO, L.A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plants cells. *TRENDS in Plant Science* **6** (4): 145-150.
- d'AUZAC J. (1994) Le calcium: un messenger dans la réponse des plantes aux stimuli. *Plantation Recherche et Développement.* **1** (1): 22-27.
- De LEONARDIS, S., DIPIERRO, N., DIPIERRO, S. (2000) Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 773-779.

- Del LONGO, O.T., GONZÁLEZ, C.A., PASTORI, G.M., TRIPPI, V.S. (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol.* **34** (7): 1023-1028.
- Del RIO, L.A., LYON, D.S., OLAH, I., GLICK, B., SALIN, M.L. (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. *Planta.* **158**: 216-224.
- Del RIO, L.A., PALMA, J.M., SANDALIO, L.M., CORPAS, F.J., PASTORI, G.M., BUENO, P., LÓPEZ-HUERTAS, E (1996) Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 434-438.
- Del RIO, L.A., SANDALIO, L.M., CORPAS, F.J., LÓPEZ-HUERTAS, E., PALMA, J.M., PASTORI, G.M. (1998) Activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes. *Physiol. Plant.* **104**: 673-680.
- De SANTIS, A., LANDI, P., GENCHI, G. (1999) Changes of mitochondrial properties in maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid composition, cytochrome c oxidase, and adenine nucleotide translocase activities. *Plant Physiol.* **119**: 743-754.
- DIOLEZ, P., MOREAU, F. (1983) Effect of bovine serum albumine on membrane potential in plant mitochondria. *Physiol. Plant.* **59**: 177-182.
- DOULIS, A.G., DEBIAN, N., KINGSTON-SMITH, A.H., FOYER, C.H. (1997) Differential localization of antioxidants in maize leaves. *Plant Physiol.* **114**: 1031-1037.

- FADZILLAH, N. M., GILL, V., FINCH, R. P., BURDON, R. H. (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Planta*. **199**: 552-556.
- FANGER, B. O. (1987) Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. *Anal. Biochem.* **162**: 11-17.
- FERGUSON, I.B., REID, M.S., ROMANI, R.J. (1985) Effects of low temperature and respiratory inhibitors on calcium flux in plant mitochondria. *Plant Physiol.* **77**: 877-880.
- FRIDOVICH, I. (1986) Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **58**: 61-97.
- GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **59**: 309-314.
- GILROY, S., FRICKER, M.D., READ, N.D., TREWAVAS, A.J. (1991) Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells. *The Plant Cell*. **3**: 333-344.
- GILROY, S., HUGHES, W.A., TREWAVAS A.J. (1987) Calmodulin antagonists increase free cytosolic calcium levels in plant protoplasts in vivo. *FEBS Letters*. **212**: 133-137.
- GONG, M., CHEN, S.Z., SONG, Y.Q., LI, Z.G.(1997) Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.* **24**: 371-379.
- GUNTER, K.K., GUNTER, T.E., (1994) Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg. Biomemb.* **26**: 471-485.



- GUNTER, T.E., PFEIFFER, D.R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *American J. Physiol.* **258**: C755-C786.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1989) Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford. ISBN 0-19-855291-2.
- HANSFORD, R. G. (1991) Dehydrogenase activation by Ca<sup>2+</sup> in cells and tissues. *J. Bioenerg. Biomemb.* **23** (6): 823-854.
- HAVIR, E.A., McHALE, N.A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* **84**: 450-455.
- HAYASHI, M., TORIYAMA, K., KONDO, M., KATO, A., MANO, S., DE BELLIS, L., HAYASHI-ISHIMARU, Y., YAMAGUCHI, K., HAYASHI, H., NISHIMURA, M. (2000) Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochem. Biophys.* **32**: 295-304.
- JACKSON, C., DENCH, J.E., HALL, D.O., MOORE, A.L. (1979) Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica sol gradient centrifugation. *Plant Physiol.* **64**: 150-153.
- JIMÉNEZ, A., HERNÁNDEZ, J.A., PASTORI, G., del RIO, L.A., SEVILLA, F. (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* **118**: 1327-1335.
- KAR, M., MISHRA, D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* **57**: 315-319.
- KARPINKI, S., WINGSLE, G., KARPINSKA, B., HALLGREN, J. (1993) Molecular responses to photooxidative stress in *Pinus sylvestris* (L.) II. Differential expression of Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione reductase. *Plant Physiol.* **103**: 1385-1391.

- KOWALTOWSKI, A.J. (2000) Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33** (2): 241-250.
- KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. (1996) Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett.* **378**: 150-152.
- KOWALTOWSKI, A.J., VERCESI, A.E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* **26** (3/4): 463-471.
- LEE, D.H., LEE, C.B. (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science* **159**: 75-85.
- LENG, P., QI, J.X. (2002) Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress. *Scientia Horticulturae* **1755**: 1-12. (in press)
- MARTINS, I.S., VERCESI, A.E. (1985) Some characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in plant mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **129** (3): 943-948.
- McINTOSH, L., EICHLER, T., GRAY, G., MAXWELL, D., NICKELS, R., WANG, Y. (1998) Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Bioch. Biophys. Acta* **1365**: 278-284.
- MISHRA, N.P., MISHRA, R.K., SINGHAL, G.S. (1993) Changes in activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol.* **102**: 903.

- MØLLER, I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 561-591.
- NEUBURGER, M., JOURNET, E., BLIGNY, R., CARDE, J., DOUCE, R. (1982) Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of percoll. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**: 312-323.
- O'KANE, D., GILL, V., BOYD, P., BURDON, R. (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* **198**: 371-377.
- OKUDA, T., MASUDA, Y., YAMANAKA, A., SAGISAKA, S. (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* **97**: 1265-1267.
- PINHEIRO, H.A. (2000) *Atividades da oxidase alternativa e da proteína desacopladora em mitocôndrias de tubérculos de batata submetidos à baixa temperatura*. Viçosa, MG: UFV, 2000. 41p. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa.
- POZZAN, T., RIZZUTO, R. (2000) The renaissance of mitochondrial calcium transport. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5269-5237.
- PRASAD, T.K., ANDERSON, M.D., MARTIN, B.A., STEWART, C.R. (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* **6**: 65-74.
- PROCHAZKOVA, D., SAIRAM, R.K., SRIVASTAVA, G.C., SINGH, D.V. (2001) Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science* **161**: 765-771.

- PURVIS, A. C. (1997) Role of alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol. Plant.* **100**: 165-170.
- RASMUSSEN, H., BARRET, P., SMALLWOOD, J. (1990) Calcium ion as intracellular messenger and cellular toxin. *Environ. Health Perspect.* **84**: 17-25.
- RUTTER, G.A., FASOLATO, C., RIZZUTO, R. (1998) Calcium and Organelles: A Two-Sided Story. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **253**: 549-557.
- RUTTER, G.A., RIZZUTO, R. (2000) Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca<sup>2+</sup> release: an intimate connection. *TIBS* **25**: 215-221.
- SANDALIO, L.M., PALMA, J.M., DEL RIO, L.A. (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Science* **51**: 1-8.
- SCANDALIOS, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxid dismutases. *Plant Physiol.* **101**: 7-12.
- SCANDALIOS, J.G., TONG, W-F., ROUPAKIAS, D.G. (1980) *Cat3*, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: genetics, intracellular location, and some biochemical properties. *Mol. Gen. Genet.* **179**: 33-41.
- SIEGEL, B.Z. (1993) Plant peroxidase - an organismic perspective. *Plant Growth Regulation* **12**: 303-312.
- SILVA, M.A.P. (1991) *Características do transporte de cálcio, fosfato e prótons em mitocôndrias de plantas*. Campinas: UNICAMP, 1991. 185p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas.
- SILVA, M.A.P., CARNIERI, E.G., VERCESI, A.E. (1992) Calcium transport by corn mitochondria. Evaluation of the role of phosphate. *Plant Physiol.* **98** (2): 452-457.

- TREWAVAS, A. (1999) Le calcium, C'est la vie: Calcium makes waves. *Plant Physiol.* **120**: 1-6.
- TSANG, E.W.T., BOWLER, C., HÉROUART, D., VAN CAMP, W., VILLARROEL, R., *et al.* (1991) Differential regulation of superoxide dismutase in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* **3**: 783-792.
- VAN CAMP, W., INÉS, D., VAN MONTAGU, M. (1997) The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. *Free Rad. Biol. Med.* **23** (3): 515-520.
- VERCESI, A.E., KOWALTOWSKI, A.J., GRIJALBA, M.T., MEINICKE, A.R., CASTILHO, R.F. (1997) The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosc. Reports.* **17**: 43-52.